

**Magna Cristina de Paiva**

**TESE**

**Diversidade de bactérias, genes de resistência a  
Quinolonas e abundância do gene *intl1* em uma estação  
de tratamento de esgoto  
revelada por abordagens de cultivo e metagenômica**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia).

**Orientadora:**

Prof. Dra. Regina Maria Nardi Drummond (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG)

**Co-orientadora:**

Prof. Dra. Andrea Maria Amaral Nascimento (Departamento Biologia Geral/ICB/UFMG)

**Belo Horizonte/MG**

**2015**

## **Dedicatória**

À Ismael, que pacientemente me apoiou e me deu forças pra concluir este trabalho e aos meus pequenos, Luiza e Gabriel, como um exemplo bom!

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade de aprendizado, que foi além do científico; e a toda equipe espiritual que me direciona e instrui, na qual eu sei, está minha mãe querida, em prece contínua por mim.

Ao meu pai, presente em todos os momentos da minha vida e não medindo esforços para me encorajar.

Ao meu irmão Rinaldo, mesmo que meio distante, porém me apoiando sempre.

Ao meu cunhado Pablo, pelo apoio e por cuidar tão bem daqueles que são a razão e inspiração para que eu busque fazer da vida sempre o melhor.

A minha filha-irmã Mara, que com tanto carinho arruma um tempo pra cuidar de mim, só posso te dizer que agora já me acostumei e vou precisar pra sempre do seu cuidado.

A Ismael, quem mais sabe como foi difícil conduzir de forma equilibrada este trabalho e que, nos meus dias de desânimo, sempre tinha uma palavra de força e apoio. Na verdade, os acertos da minha vida só têm acontecido porque você está ao meu lado!

Aos meus projetos de gente, Luiza e Gabriel, que colorem e dão sentido a minha vida.

A minha irmã microbiológica e doutora nata Lucienne, meu eterno exemplo, pelo incentivo.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia Aplicada, todos sempre gentis e animadores.

Ao meu LGM Tão Amado, por ser um lugar de vibração ímpar e que me acolheu, confesso que foi empatia a primeira vista! A todos os meus amigos do LGM, em especial, Mari, Pat, Paulinho, Marcelo, Lelê, Rosa, Mônica e Paixão que tornaram meu trabalho um prazer, com muitos sorrisos e solidariedade. Aprendi muito com cada um de vocês!

Preciso repetir um agradecimento: as minhas queridas orientadoras de plantão Mari e Pat, que com muito calma e carinho me ensinaram tanto e me possibilitaram a finalização deste trabalho.

As minhas meninas Carina, Juliana, Luisa e Raquel, pela disponibilidade e boa vontade em me ajudar.

Ao Prof. Lucas Bleicher e Larissa Lopes, que tanto contribuíram para este trabalho.

Ao Juliano do NAGE e ao Prof. Marcelo Santoro, que não estão mais presentes entre nós, meu muito obrigado por toda ajuda.

A Prof<sup>a</sup> Paula Prazeres, que também entra na lista das minhas orientadoras queridas, por sempre contribuir para melhorar a qualidade dos meus trabalhos.

A Prof<sup>a</sup> Vera, sempre disponível e disposta a me ajudar.

A UFSJ, pelo apoio e incentivo e a todos os meus novos amigos da UFSJ, especialmente Bulé, Dany, Marcelo, Mari, Carlos Jensen, André, Cris, Roberta, Frank, Letícia e Maria, por toda ajuda e injeção diária de ânimo.

As minhas duas grandes amigas, orientadoras, exemplos de pessoa e profissional, Regina e Andrea, sem vocês seria impossível idealizar e concretizar este trabalho. Estes são nomes os quais sempre pronunciarei com imenso respeito, admiração e gratidão.

Enfim, termino concordando com a Regina: eu sou mesmo uma pessoa “iluminada”, não tem outro adjetivo pra alguém que tem uma lista de agradecimentos desta. Antes, eu ouvia um trecho de uma música (“Como foi que eu cheguei aqui? Quem me diria que esse era o meu fim?”, Milton Nascimento) e, pensando em mim, não conseguia a resposta. Mas hoje compreendo facilmente.... e tenho absoluta consciência da importância e contribuição de todos vocês nessa minha caminhada.

Minha gratidão a todos que participaram de alguma forma deste trabalho!

À FAPEMIG pelo apoio financeiro.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
ESTRUTURA DA TESE.....	3
1. JUSTIFICATIVA.....	4
2. INTRODUÇÃO.....	7
2.1. Resistência bacteriana aos antimicrobianos.....	8
2.2. Quinolonas.....	11
2.2.1. Farmacocinética e mecanismo de ação das Quinolonas.....	13
2.2.2. Resistência bacteriana as Quinolonas.....	16
2.2.3. Resistência cromossômica as Quinolonas.....	17
2.2.4. Resistência as Quinolonas mediados por elementos genéticos móveis.....	20
2.2.4.1. Gene <i>qnr</i> .....	20
2.2.5. Resistência bacteriana as Quinolonas em ambientes naturais e origem dos genes <i>qnr</i> ..	23
2.3. Aminoglicosídeos.....	25
2.3.1. Genes <i>aac(6')Ib</i> e variante <i>cr</i> .....	27
2.4. Estação de tratamento de esgotos e diversidade microbiana.....	29
3. OBJETIVOS.....	33
3.1. Objetivo Geral.....	34
3.2. Objetivos Específicos.....	34
4. CAPÍTULO 1.....	35
5. CAPÍTULO 2.....	50
6. DISCUSSÃO GERAL.....	91
7. CONCLUSÃO GERAL.....	99
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101

## LISTA DE FIGURAS

### Introdução:

- Figura 1.** Estrutura Química Básica das Quinolonas.....12
- Figura 2.** Mecanismo de Ação das Quinolonas.....16
- Figura 3.** Contexto Genético do Gene *qnr* em Plasmídio pMG252.....22
- Figura 4.** Contexto Genético do Gene *aac(6')Ib-cr* em Plasmídio pMG252 .....28

### Capítulo 1:

- Figure 1.** Cumulative Relative Frequency of the OTUs of Raw Sewage (RS) and Activated Sludge (AS).....39
- Figure 2.** Distribution of the Community Members in Raw Sewage (RS) and Activated Sludge (AS).....40
- Figure 3.** Venn Diagram Showing the Exclusive and Shared OTUs from Raw Sewage (RS) and Activated Sludge (AS).....43
- Supplementary Figure 1.** Standard Curves for the 16S rRNA (A) and *intI1* (B) Genes...48
- Supplementary Figure 2.** The Ct Values of the 16S rRNA (A) and *intI1* (B) Genes.....48

### Capítulo 2:

- Figure 1.** Neighbor-joining Tree of Bacterial Isolates Recovered from NAL-enrichment cultures of Raw Sewage (RS) and Activated Sludge (AS) based on the partial 16S rRNA.....60
- Figure 2.** Taxonomic Distribution of Bacterial Isolates Recovered from NAL-enrichment cultures of Raw Sewage (RS) and Activated Sludge (AS).....61
- Figure 3.** Resistance of Enterobacterial Isolates from Raw Sewage (RS) and Activated Sludge (AS) to Fluoroquinolone (a) and Aminoglycoside (b) compounds at MIC concentrations.....65
- Figure 4:** Evolutionary relationships of Quinolone Resistance Genes (*qnrS*).....71

<b>Figure 5:</b> Evolutionary Aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase nucleotide sequences.....	72
<b>Figure 6.</b> Location of Mutation Sites found in this study in a Computational Model for QnrS .....	76
<b>Figure 7.</b> Mutation Sites as mapped in the Structure of AAC(6')-Ib as bound to Kanamycin and Acetyl coA.....	77

## LISTA DE TABELAS

### Introdução:

<b>Tabela 1.</b> Mecanismos de Resistência as Quinolonas.....	17
---	----

### Capítulo 1:

<b>Table 1.</b> The top 21 OTUs classified in Raw Sewage (RS) and Activated Sludge (AS).....	42
--	----

<b>Supplementary Table 1.</b> Summary of the Dataset Quality Control from the Raw Sewage (RS) and Activated Sludge (AS) libraries.....	49
--	----

<b>Supplementary Table 2.</b> General Features of the Raw Sewage (RS) and Activated Sludge (AS) libraries.....	49
--	----

<b>Supplementary Table 3.</b> Taxonomic Affiliation of 16S rRNA gene OTUs based on Silva Database: disponível em <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4482650/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4482650/</a>	
--	--

### Capítulo 2:

<b>Table 1.</b> Antimicrobial Resistance for Isolates from Raw Sewage (RS) and Activated Sludge (AS).....	64
---	----

<b>Table 2.</b> Distribution of <i>qnrS</i> , <i>aac(6')Ib</i> and <i>aac(6')Ib-cr</i> among Isolates of NAL-enrichment culture from Raw Sewage (RS) and Activated Sludge (AS).....	68
---	----

<b>Table 3.</b> Alterations Detected in <i>QnrS</i> and <i>Aac(6')Ib</i> Sequences of libraries from RS and AS and from NAL- enrichment culture from RS and AS.....	75
---	----

<b>Supplementary Table 1.</b> Identification, Distribution of <i>qnrS</i> , <i>aaac(6')Ib</i> and <i>aac(6')Ib-cr</i> Genes and Minimum Inhibitory Concentration to Quinolones and Aminoglycosides from NAL-enrichment culture of Raw Sewage (RS).....	85
--	----

<b>Supplementary Table 2.</b> Identification, Distribution of <i>qnrS</i> , <i>aac(6')Ib</i> and <i>aac(6')Ib-cr</i> Genes and Minimum Inhibitory Concentration to Quinolones and Aminoglycosides from NAL-enrichment culture of Activated Sludge (AS).....	86
---	----

<b>Supplementary Table 3.</b> General Features of the <i>qnrS</i> and <i>aac(6')Ib</i> from Raw Sewage (RS) and Activated Sludge (AS) libraries.....	88
--	----

<b>Supplementary Table 4.</b> Phylogenetic Afiliation of <i>qnrS</i> OTUs and Isolates Based on Blastx Protein Database.....	89
--	----

<b>Supplementary Table 5.</b> Phylogenetic Affiliation of <i>aac(6')Ib</i> OTUs and Isolates Based on Blastx Protein Database.....	90
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AAC</b>	Aminoglicosídeo N-acetiltransferase
<b>Ac-CoA</b>	Acetil- coenzima A
<b>ANT</b>	Aminoglicosídeo O-nucleotidiltransferase
<b>APH</b>	Aminoglicosídeo O-fosfotransferase
<b>CIM</b>	Concentração inibitória mínima
<b>CIP</b>	Ciprofloxacina
<b>Cr</b>	Ciprofloxacina resistente
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>EB</b>	Esgoto Bruto
<b>ETE</b>	Estação de tratamento de esgoto
<b>Inc</b>	Grupos de incompatibilidade
<b><i>intl</i></b>	Gene integron classe 1
<b>ITU</b>	Infecção do trato urinário
<b>LA</b>	Lodos ativados
<b>LVX</b>	Levofloxacina
<b>MFS</b>	<i>Major Facilitators Family</i>
<b>MOB</b>	<i>Mobility</i>
<b>MPF</b>	<i>Mating pair formation</i>
<b>NAL</b>	Ácido nalidíxico
<b>NOR</b>	Norfloxacina
<b>OFX</b>	Ofloxacina
<b><i>OqxAB</i></b>	<i>Quinolone and olaquinox efflux pump</i>
<b>Orf</b>	<i>Open reading frame</i>
<b>OTU</b>	<i>Operational Taxonomic Units</i>
<b>Pb</b>	Pares de base
<b>PBP</b>	<i>Protein binding penicilin</i>
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase
<b>PMQR</b>	<i>Plasmid mediated quinolone resistance</i>
<b>qPCR</b>	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
<b>qepA</b>	<i>Quinolone efflux pump</i>
<b>QNR</b>	<i>Quinolone resistance</i>
<b>QRDR</b>	<i>Quinolone resistance-determining region</i>

<b>RAFA</b>	Reatores Anaeróbios de Fluxo Ascendente
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucléico
<b>T4SS</b>	Sistema de secreção tipo IV
<b>UASB</b>	<i>Upflow anaerobic sludge blanket</i>

### Lista de Aminoácidos

<b>A</b>	Alanina	<b>M</b>	Metionina
<b>C</b>	Cisteína	<b>N</b>	Asparagina
<b>D</b>	Aspartato	<b>P</b>	Prolina
<b>E</b>	Glutamato	<b>Q</b>	Glutamina
<b>F</b>	Fenilalanina	<b>R</b>	Arginina
<b>G</b>	Glicina	<b>S</b>	Serina
<b>H</b>	Histidina	<b>T</b>	Treonina
<b>I</b>	Isoleucina	<b>V</b>	Valina
<b>K</b>	Lisina	<b>W</b>	Triptofano
<b>L</b>	Leucina	<b>Y</b>	Tirosina

## RESUMO

As quinolonas são antimicrobianos de grande relevância clínica humana e veterinária. Dentre os mecanismos de resistência as quinolonas, a aquisição de genes de resistência (*qnr*, *aac(6')Ib-cr*, *qepA* e *OqxAB*) transferidos via elementos genéticos móveis destaca-se devido ao seu potencial de disseminação interespecíes. Uma grande diversidade de bactérias de origem humana, animal e ambiental são encontradas em estações de tratamento de esgotos (ETEs), onde as transferências horizontais de genes são favorecidas. Neste estudo foi investigada a presença de integron classe 1 e a diversidade bacteriana e dos genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* e *aac(6')Ib* em amostras de esgoto bruto (EB) e lodos ativados (LA) coletadas na ETE Arrudas, Belo Horizonte-MG, utilizando abordagens baseadas em cultivo e metagenômica. Proteobacteria foi o filo dominante das comunidades de EB e LA. Além disso, houve uma redução de Firmicutes e um enriquecimento de Bacteroidetes em LA. Unidades operacionais taxonômicas (OTUs) relacionadas aos gêneros *Neisseria*, *Acinetobacter* e *Streptococcus*, foram detectadas, no entanto, foi observada uma redução de *reads* em LA. Células bacterianas abrigando integrons classe 1 foram encontradas, porém em menor proporção em LA. A abordagem baseada em cultivo também revelou o domínio do filo Proteobacteria em ambos os ambientes, predominando membros da família Enterobacteriaceae. As espécies mais abundantes foram *Escherichia coli*, *Morganella morganii* e *Proteus mirabilis*. Deve ser destacada a detecção de *E. coli* afiliadas aos grupos B<sub>2</sub> e D. As Enterobactérias recuperadas de EB foram mais resistentes as quinolonas e aminoglicosídeos do que as de LA. Bactérias abrigando *aac(6')Ib* e seu variante *cr* predominaram em EB, enquanto *qnrS* foi encontrado apenas em LA. Destaca-se a primeira detecção dos genes *qnrS* em *M. morganii*, *Providencia rettgeri* e *Pseudomonas guangdongensis* e *aac(6')Ib-cr* em *Alcaligenes faecalis* e *P. rettgeri* de origem ambiental. Observou-se que esses genes exibiram baixa diversidade em ambos os ambientes, mas *qnrS* parece ser mais diverso que *aac(6')Ib*. Análises das sequências de QnrS e Aac(6')Ib revelaram diversas alterações na sequência de aminoácidos não relatadas previamente, a maioria sem uma implicação óbvia na estrutura da proteína. Os dados deste estudo alertam para a presença de bactérias resistentes as quinolonas e aminoglicosídeos em EB e LA e dos genes *qnrS*, *aac(6')Ib* e seu variante *cr* circulando nestes ambientes, os quais têm potencial de disseminação interespecíes e poderá comprometer o uso terapêutico destes antimicrobianos.

## ABSTRACT

Quinolones are antimicrobial drugs of great clinical relevance, both in human and veterinary. Among the mechanisms of quinolones resistance, the acquisition of resistance genes (*qnr*, *aac(6')Ib-cr*, *qepA* and *OqxAB*) mediated by mobile genetic elements is highlighted because of its potential of interspecies dissemination. A wide diversity of bacteria of human, animal and environmental are found in wastewater treatment plants (WWTPs), where horizontal genes transfer is favored. In this study, we investigated the abundance of class 1 integron and bacterial and *qnA*, *qnrB*, *qnrS* and *aac(6')Ib-cr* genes diversities from raw sewage (RS) and activated sludge (AS) from the WWTP Arrudas, Belo Horizonte – MG, using culture-based and metagenomic approaches. Proteobacteria was the dominant phylum of RS and AS communities. Moreover, there were a reduction of Firmicutes and Bacteroidetes enrichment in AS. Operational Taxonomic units (OTUs) related to *Neisseria*, *Acinetobacter* and *Streptococcus* genera were detected, however, there was a reduction of reads in AS. Bacterial cells harboring class 1 integrons were found, but with a lesser proportion in AS. The culture-based approach also revealed that the Proteobacteria phylum were dominant in both environments, with predominance of Enterobacteriaceae. The most abundant species were *Escherichia coli*, *Morganella morganii* and *Proteus mirabilis*. It should be noted that the *E. coli* detected were from phylogenetic groups B2 and D. Overall, Enterobacteriaceae isolates from RS were more resistant to quinolones and aminoglycosides than those from AS. Bacteria harboring the *aac(6')Ib* and its variant *cr* genes predominated in RS, whereas *qnrS* were specific from AS. It must be highlighted the first detection of *qnrS* genes in *M. morganii*, *Providencia rettgeri* and *Pseudomonas guangdongensis* and of *aac(6')Ib-cr* in *Alcaligenes faecalis* and *P. rettgeri* from environment source. It was observed that these genes exhibit low diversity, but the diversity of *qnrS* genes appear to be wider than *aac(6')Ib* genes. The molecular analysis of sequences obtained revealed several unprecedented amino acid changes in QnrS and Aac(6')Ib proteins, whose structural implication is not straightforward. The findings of this study warn for the presence of resistant bacteria to quinolones and aminoglycosides from RS and AS and the *qnrS*, *aac(6')Ib* and its variant *cr* genes circulating in these environments, which have the potential interspecies dissemination and may compromise the therapeutic use of these antimicrobials.

## **ESTRUTURA DA TESE**

Esta tese apresenta a justificativa, a introdução geral e os objetivos gerais e específicos. Em seguida, serão apresentados o artigo e o manuscrito na forma de capítulos:

**Capítulo 1:** Artigo publicado na revista *Plos One*: DOI 10.1371 /journal.pone.01315312, intitulado: **“The Microbiota and Abundance of the Class 1 Integron-Integrase Gene in Tropical Sewage Treatment Plant Influent and Activated Sludge”**.

**Capítulo 2:** Manuscrito intitulado: **“WWTP: a source of new bacteria harboring *qnrS*, *aac(6')Ib* and its *cr* variant, and mutations possibly involved in quinolone resistance”**.

Para finalizar, são apresentadas uma discussão e conclusão geral, seguida do tópico referências bibliográficas.

# **1- Justificativa**

## 1. Justificativa

Quinolonas são antimicrobianos amplamente utilizados para o tratamento de infecções em seres humanos e animais. Além disso, algumas quinolonas, como olaquinox, tem o seu uso estendido como promotores de crescimento, acrescidas à ração animal, com a finalidade de aumentar o ganho de peso diário ou a eficiência alimentar de animais destinados à produção de alimentos. No entanto, o alto consumo das quinolonas, tanto no âmbito clínico quanto veterinário, tem sido considerado um fator responsável pelo rápido desenvolvimento de resistência bacteriana. Vários mecanismos estão envolvidos na resistência a estes fármacos, sendo o principal as mutações em genes cromossômicos que codificam a DNA girase e a topoisomerase IV. Entretanto, em 1998 foi descrito o primeiro gene de resistência as quinolonas veiculado por plasmídios, o que é de particular preocupação devido ao potencial de disseminação interespecíes desses genes. Até o momento, são descritos quatro genes que codificam mecanismos distintos de resistência a quinolonas: *qnr*, *aac(6')Ib-cr*, *qepA* e *oqxAB*. A aquisição destes genes leva à diminuição da susceptibilidade as quinolonas além de apresentar uma vantagem para a seleção de mutantes com resistência cromossômica, resultando em alto nível de resistência as quinolonas (aumento entre 10 a 100 vezes na concentração inibitória mínima - CIM).

De uma maneira geral, o ambiente é importante para as trocas de genes entre as bactérias, incluindo genes de resistência aos antimicrobianos. Ambientes como estação de tratamento de esgoto (ETE) abrigam uma grande diversidade bacteriana composta tanto por microrganismos exclusivamente ambientais como por patógenos em potencial para seres humanos e animais. Esses microrganismos estão continuamente expostos aos resíduos de compostos provenientes da ação antrópica, dentre estes, aqueles com atividade antimicrobiana. Fármacos como os da classe das quinolonas são parcialmente metabolizadas pelo organismo humano e animal, o que significa que uma parte destes chega ainda inalterado ao esgoto. Os estudos mostram que concentrações residuais de quinolonas são encontradas em ambientes aquáticos e terrestres, e atualmente estes antimicrobianos são considerados micropoluentes ambientais. Assim, estes resíduos exercem uma pressão seletiva sobre a comunidade bacteriana presente e podem favorecer a emergência e disseminação de microrganismos resistentes. Vale ressaltar que os genes de resistência as quinolonas da família *qnr* têm sua origem atribuída a bactérias do ambiente aquático, e possivelmente sua emergência foi favorecida pela presença de resíduos destes compostos no ambiente.

No Brasil, poucos grupos vêm estudando o contexto da resistência as quinolonas e dentre eles, a maioria investiga amostras de origem humana e animal. Em um trabalho prévio, nosso grupo revelou a presença dos genes *qnrS1*, *qnrB19* e *aac(6')Ib-cr* em amostras clínicas de *E.*

*coli* resistentes a ciprofloxacina, recuperadas de urina de mulheres com ITU diagnosticada clínica e laboratorialmente. Pela relevância dos dados, o grupo teve o artigo intitulado “*The first report of the qnrB19, qnrS1 and aac(6’)-Ib-cr genes in urinary isolates of ciprofloxacin-resistant Escherichia coli in Brazil*” publicado na revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, em 2012. Além disso, considerando a literatura pesquisada, não existem ainda relatos brasileiros da diversidade bacteriana de amostras coletadas nas ETEs.

Considerando a importância dos ambientes, fora do contexto clínico, na emergência e disseminação de genes de resistência as quinolonas, é relevante estudar a diversidade bacteriana em ambientes como as ETEs, sabidamente impactada por resíduos destes compostos. Além disso, avaliar a distribuição e a diversidade dos genes de resistência as quinolonas mais frequentemente descritos em espécies bacterianas poderá contribuir para o conhecimento dos problemas associados à resistência nestes ambientes. Possivelmente, permitirá ainda desenvolver estratégias que minimizem o impacto da disseminação da resistência e da seleção de linhagens resistentes a estes compostos.

## **2- Introdução**

## 2- Introdução

### 2.1. Resistência bacteriana aos antimicrobianos

A resistência bacteriana aos antimicrobianos constitui um dos grandes desafios à humanidade e a contenção da disseminação global de bactérias multirresistentes vem exigindo um esforço contínuo da comunidade científica. Vários são os fatores que contribuem para a disseminação da resistência bacteriana, tais como uso abusivo de antimicrobianos em humanos, animais e agricultura, aumento do fluxo de pessoas entre países e expansão da industrialização, além de outras atividades antrópicas (HAWKEY & JONES, 2009). No entanto, o verdadeiro impacto destes fatores no desenvolvimento e disseminação da resistência ainda não é completamente esclarecido.

Continuamente, as bactérias são expostas a alguma pressão seletiva para resistência aos antimicrobianos nos mais diversos ambientes, clínico e ambiental. Bactérias apresentam alta plasticidade genômica, o que favorece a sua adaptação em ambientes diversos. Eventos mutacionais contribuem para esta adaptação, porém, a transferência horizontal de genes é considerada a causa da rápida disseminação de genes de resistência aos antimicrobianos (STALDER et al., 2013). Dessa forma, a resistência bacteriana é considerada um fenômeno natural, relacionado ao *fitness* e a evolução bacteriana (FERREIRA DA SILVA et al., 2007; RODRIGUEZ-ROJAS et al., 2013).

Uma população bacteriana pode desenvolver resistência aos antimicrobianos como resposta adaptativa à pressão exercida pelo antimicrobiano, seja por seleção natural e disseminação clonal ou por aquisição de determinantes de resistência carregados por elementos genéticos móveis. No primeiro caso, a resistência está associada com modificações cromossômicas, a disseminação da resistência ocorrerá mais lentamente e resultará em resistência a compostos estruturalmente relacionados. Ao contrário, a transferência horizontal de genes de resistência ocorre rapidamente e entre bactérias de diferentes filos, ampliando a possibilidade de disseminação da resistência (GIEDRAITIENE et al., 2011; WELLINGTON et al., 2013).

A resistência bacteriana adquirida aos antimicrobianos, considerada de maior complexidade e preocupação, envolve a transferência de genes codificadores de resistência por três vias principais: via bacteriófagos (transdução), via plasmídios conjugativos (conjugação) e via incorporação de DNA exógeno (transformação) (GIEDRAITIENE et al., 2011). Além disso, elementos cromossômicos integrativos e conjugativos, passíveis de serem excisados do cromossomo bacteriano e transferidos por conjugação, vem sendo descritos (WOZNIAK & WALDOR, 2010). A aquisição dos determinantes de resistência

resulta em expressão de mecanismos bioquímicos diversos, sendo os principais a diminuição da incorporação do antimicrobiano pela célula bacteriana, degradação enzimática do antimicrobiano, efluxo ativo do antimicrobiano e alteração ou hiperprodução do alvo do antimicrobiano (GIEDRAITIENE et al., 2011).

De acordo com Perry & Wright (2013), a mais frequente e importante via de transferência de genes de resistência aos antimicrobianos é a conjugação, envolvendo mobilização de plasmídios, transposons e integrons. Plasmídio é um fragmento de DNA de dupla fita, circular ou linear, extra-cromossômico, autoreplicativo, presente em números de cópias que variam de 1 a 200 por célula bacteriana (NORDSTROM, 2005; CARATOLLI, 2013). Estes elementos abrigam genes não essenciais e contribuem para a evolução das espécies por facilitar a disseminação horizontal destes genes. Os plasmídios possuem também a habilidade para adquirir sequências de inserção e transposon e mobilizar genes de resistência a antimicrobianos entre espécies não relacionadas, conferindo resistência as maiores classes de antimicrobianos, como betalactâmicos, aminoglicosídeos, tetraciclina, macrolídeos e quinolonas (THOMAS & NIELSEN, 2005; CARATOLLI, 2009). Os plasmídios são classificados, desde 1970, segundo seu sistema de replicação e separação em grupos de incompatibilidade (Inc), onde dois plasmídios do mesmo grupo não podem existir na mesma célula bacteriana (PERRY & WRIGHT, 2013; SHINTANI et al., 2015). Os plasmídios que mobilizam genes de resistência aos antimicrobianos são encontrados em bactérias de origem ambientais e patogênicas e pertencem aos grupos Inc P, Q, N e W com alguns subgrupos carreando também genes de resistência para metais pesados (PERRY & WRIGHT, 2013). Novas classificações dos plasmídios foram propostas por Smillie et al. (2010) de acordo com a sequência de aminoácidos da proteína relaxase em seis tipos de mobilidade (MOB, do inglês *mobility*), e em quatro classes (MPF, do inglês *mating pair formation*) segundo a sequência de aminoácidos do sistema de secreção tipo IV (T4SS). Plasmídios encontrados em bactérias recuperadas de ambiente hospitalar são também encontrados em bactérias ambientais, o que mostra a grande importância destes elementos na disseminação de genes de resistência aos antimicrobianos nestes dois ambientes (PERRY & WRIGHT, 2013).

Integrons são elementos genéticos bacterianos, compostos de três elementos, o gene *intI*, um sítio de recombinação específico *attI* e um promotor, *Pc*; que codificam uma proteína integrase. Estes elementos são capazes de promover a aquisição e expressão de genes cassetes, nos quais estão inseridos genes, tais como aqueles que codificam resistência aos antimicrobianos (HALL & COLLIS, 1995). Os integrons são classificados em dois grupos. O primeiro, integrons cromossômicos, é frequentemente descrito em bactérias de ambiente

marinho e terrestre, de localização cromossômica e são referidos como super integrons, uma vez que podem carrear até 200 genes cassetes, muitos codificando proteínas com função desconhecida. No segundo grupo, estão os integrons móveis, transponíveis e disseminados dentro de elementos genéticos móveis como plasmídios e transposons. Integrons móveis contêm um menor número de genes cassetes que usualmente codificam determinantes de resistência aos antimicrobianos e tem sido descritos em diversas bactérias Gram-negativas, porém com menor frequência em Gram-positivas (SHI et al., 2006; BARRAUD et al., 2011). De acordo com a sequência de aminoácidos da proteína IntI, são descritas cinco classes de integrons móveis, sendo as classes 1, 2 e 3 as mais relacionadas com genes de resistência (CAMBRAY et al., 2010). Integrons classe 1 são mais comumente detectados tanto em amostras bacterianas clínicas quanto ambientais e mais de 130 genes cassetes conferindo resistência aos antimicrobianos já foram detectados nestes elementos (PARTRIDGE et al., 2009). Nos integrons classe 1 são descritos genes cassetes conferindo resistência a aminoglicosídeos, betalactâmicos, cloranfenicol, tetraciclina, sulfonamidas, trimetoprim, rifampicina, eritromicina, fosfomicina, quinolonas e compostos de amônio quaternário (FLUIT & SCHMITZ, 2004; CAMBRAY et al., 2010; DU et al., 2014). Integron classe 1 tem sido descrito em várias amostras ambientais e, considerando sua importância na disseminação da resistência bacteriana, sua distribuição e o consequente impacto no contexto de infecções bacterianas, constitui objeto de vários estudos (GUO et al., 2011; STALDER et al., 2013; MA et al., 2013).

Para a transferência de genes via conjugação é necessário o contato físico entre bactérias doadoras e receptoras. Dessa forma, quanto maior a diversidade da comunidade bacteriana de um determinado ambiente, maiores as trocas de genes. O resistoma ambiental, o qual é definido como coleção de todos os genes que contribuem direta ou indiretamente para a resistência aos antimicrobianos, sofre forte impacto das atividades humanas, desencadeando mudanças na sua composição e favorecendo a transferência destes genes (PERRY & WRIGHT, 2013). Ambientes como solo e água são importantes para as trocas de genes entre as bactérias, uma vez que apresentam propriedades físicas e biológicas que favorecem estes eventos, destacando-se a diversidade, abundância e origem destes organismos (AMINOV, 2011; PERRY & WRIGHT, 2013). Nestes ambientes são encontradas bactérias produtoras de antibióticos, as quais possuem também genes que codificam resistência contra estes compostos e que são frequentemente multiresistentes. Deste fato é sugerido que a resistência bacteriana tem origem ambiental e que o ambiente é um grande reservatório de genes de resistência aos antimicrobianos (PELLEGRINI et al., 2011). Constituem exemplos bem documentados a resistência aos aminoglicosídeos, produzidos por bactérias do gênero

*Streptomyces*, amplamente encontradas em solo (SCHATZ et al., 1944) e os genes da família *qnr* que codificam resistência as quinolonas, relacionados a bactérias dos gêneros *Shewanella*, *Vibrio* e *Aeromonas* de ambientes aquáticos (POIREL et al., 2005; BAQUERO et al., 2008).

Segundo Schlüter e colaboradores (2007), os ambientes aquáticos como os das Estações de Tratamento de Esgotos (ETEs) promovem excelentes condições para a disseminação de genes de resistência por meio da transferência horizontal. Vários trabalhos relatam a presença de integrons e genes de resistência a antimicrobianos como betalactâmicos e aminoglicosídeos em amostras de esgoto e lodo de ETEs (HENRIQUES et al., 2006; MESA et al., 2006; GAZE et al., 2011). No Brasil, Prado e colaboradores (2008) mostraram que genes que codificam enzimas betalactamase foram encontrados em *Klebsiella pneumoniae* recuperadas de amostras coletadas em todos os estágios do tratamento de esgoto. Em nossa recente publicação (PAIVA et al., 2015), relatamos a complexidade da comunidade bacteriana do esgoto bruto e dos lodos ativados de uma ETE em Belo Horizonte – MG, bem como a presença de integrons classe 1 nestes ambientes, o que contribui e favorece a troca e disseminação dos genes de resistência aos antimicrobianos.

## 2.2. Quinolonas

As quinolonas surgiram como uma opção terapêutica em 1962, com a síntese do ácido nalidíxico (NAL), cujo uso clínico foi liberado a partir de 1967. Entretanto, devido ao seu emprego limitado para o tratamento de indivíduos com infecção do trato urinário (ITU), novas classes de quinolonas foram desenvolvidas objetivando-se a ampliação do espectro antimicrobiano (BLONDEAU, 2004). No final da década de 1980 e princípio da década de 1990, grande número de fluoroquinolonas foi desenvolvido, as quais apresentavam atividade potente contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, incluindo anaeróbias obrigatórias (RUIZ, 2003; ALDRED et al., 2014).

As quinolonas constituem um grupo de antimicrobianos sintéticos potentes relacionados com o ácido nalidíxico, obtidas por modificações estruturais do esqueleto da molécula 4-quinolona. A estrutura básica das quinolonas é formada por dois anéis, com um átomo de nitrogênio na posição 1, um grupo carbonila na posição 4 e um grupo carboxila na posição 3 do anel (SMITH et al., 2001, PACHECO et al., 2009). A FIGURA 1 mostra a estrutura química básica das quinolonas. As modificações na estrutura do fármaco interferem na atividade antimicrobiana, aumentando a afinidade pelo sítio alvo, melhorando a penetração nas células e alterando a farmacocinética ou a toxicidade das quinolonas (PACHECO et al., 2009).

Substituições em R1 do anel quinolônico por grupos etila, ciclopropila, terc-butila e derivados fenílicos estão relacionadas com a ligação da quinolona ao sítio alvo e com a atividade antimicrobiana. Alterações em R2 são limitadas e podem levar a inatividade do fármaco. Nas posições R3 e R4, os grupos 3-carboxila e 4-carbonila não devem ser alterados, pois são essenciais para a união das topoisomerases e o transporte através da membrana bacteriana. Substituições em R5 por grupo metila, hidroxila ou amina melhoram a atividade contra Gram-positivas. A adição de um átomo de flúor na posição 6 eleva consideravelmente a atividade antibacteriana, aumentando a afinidade pela enzima e a penetração nas células. Substituintes em carbono 7 determinam maior espectro antimicrobiano e controlam a permeabilidade da célula bacteriana, enquanto que substituição do carbono 8 por um átomo de nitrogênio confere potente atividade aos compostos e controla a farmacocinética (ZHANG & HAEMERS, 1991, PACHECO et al., 2009).

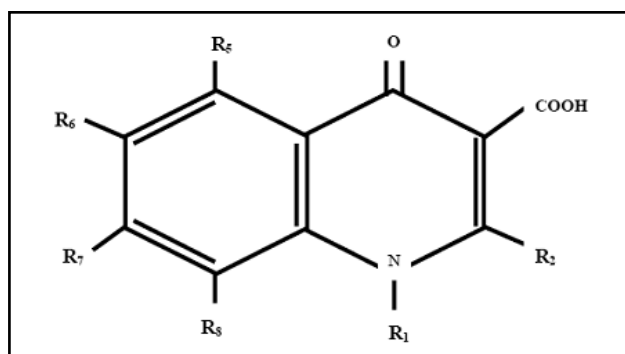


FIGURA 1 - ESTRUTURA QUÍMICA BÁSICA DAS QUINOLONAS  
Fonte – Pacheco et al. (2009)

Após a síntese do ácido nalidíxico, que apresenta atividade restrita contra bactérias Gram-negativas, compostos como ácido oxolínico, cinoxacina e ácido pipemídico foram desenvolvidos para expandir o espectro de atividade, porém permaneciam sem eficácia contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas anaeróbias obrigatórias (BLONDAEU, 2004).

As fluoroquinolonas são quinolonas de segunda geração e caracterizam-se quimicamente pela presença de um átomo de flúor ligado à posição 6 da molécula, o que lhes confere maior potência contra bactérias Gram-negativas, atividade ampliada para Gram-positivas, mas sem eficácia contra microrganismos anaeróbios obrigatórios (HOOPER & WOLFSON, 1985; GUAN et al., 2013). Norfloxacin, a primeira fluoroquinolona, apresenta além do átomo de flúor em C6, um grupamento piperazina diamina na posição C7. Fazem parte deste grupo ciprofloxacina, ofloxacina, pefloxacina, lomefloxacina e enofloxacina, desenvolvidas no final da década de 1970 e início da década de 1980 (PACHECO et al., 2009). Nenhuma delas possui substituições no carbono C8 no anel quinolônico fluorado,

porém diferem na posição R1, onde ciprofloxacina tem um anel ciclopropano e norfloxacina tem um grupo etil (BOYD et al., 2009).

A terceira geração de quinolonas foi desenvolvida devido ao surgimento de resistência bacteriana aos compostos de outras gerações e para melhorar a atividade frente a bactérias Gram-positivas e anaeróbias obrigatórias (APPELBAUM & HUNTER, 2000; PACHECO et al., 2009). Pertencem a esta geração moxifloxacina, levofloxacina e gatifloxacina, as quais possuem substituições oxigenadas, com um grupo metoxi ligado no carbono C8 (BOYD et al., 2009).

Uma quarta geração de quinolonas vem sendo desenvolvida desde a década de 1990, com o objetivo de melhorar a atividade frente a bactérias Gram-positivas e alguns patógenos intracelulares, além de manter a atividade contra bactérias Gram-negativas e anaeróbias obrigatórias. Algumas destas moléculas, porém, apresentaram efeitos adversos importantes, tais como a toxicidade cardíaca, renal e hepática relacionada, respectivamente, com o uso de grepafloxacina, temafloxacina e trovafloxacina, comprometendo o uso clínico (PACHECO et al., 2009).

Novas modificações da estrutura básica das quinolonas têm sido propostas, destacando-se o desenvolvimento das quinolonas não fluoradas ou desfluorquinolonas, as quais, como o nome sugere, carecem do átomo de flúor na posição 6 e apresentam uma alta afinidade pelas topoisomerasas. Estas quinolonas não fluoradas possuem um átomo de hidrogênio na posição 6 e o principal representante desta classe é o garenoxacino (BMS - 284756) (PACHECO et al., 2009).

As quinolonas, devido ao amplo espectro de ação e capacidade de alcançar e manter altas concentrações no trato urinário têm sido extensivamente utilizadas no tratamento de ITU. Além disso, são utilizadas no tratamento de infecções do trato respiratório, gastrointestinal, bacteremia e osteomielite. Fluoroquinolonas, sobretudo aquelas de segunda e terceira gerações, são utilizadas para o tratamento de infecções do trato respiratório adquiridas na comunidade causadas por *Haemophilus influenzae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* e *Legionella pneumophila*, com boa resposta terapêutica (DALHOFF et al., 2012). No âmbito veterinário, as quinolonas são usadas acrescidas nas rações, para tratamento de doenças infecciosas e/ou como promotores de crescimento, destacando-se neste último caso o uso do olaquinox (RODRIGUEZ-MARTINES, 2003; RUIZ, 2003, GUAN et al., 2013).

### 2.2.1. Farmacocinética e mecanismo de ação das quinolonas

As quinolonas são amplamente utilizadas na terapêutica, disponibilizadas em formulações oral e endovenosa. As quinolonas via oral são rapidamente absorvidas via trato gastrointestinal e prontamente distribuídas nos tecidos e líquidos corporais, com exceção do fluido cérebro-espinhal, onde a penetração é menor. As concentrações séricas máximas são alcançadas entre uma e seis horas após a administração, e geralmente estes antimicrobianos atingem concentrações maiores no trato urinário, fezes, bile e pulmões (GOMES et al., 2003).

A maioria das quinolonas é eliminada por via renal [ofloxacina (OFX), levofloxacina (LVX), ácido pipemídico], onde alcançam altas concentrações, justificando o amplo emprego destas para tratamento de indivíduos com ITU. Outras quinolonas são eliminadas por via hepática, como no caso de moxifloxacina, enquanto norfloxacina (NOR) e ciprofloxacina (CIP) são eliminadas por ambas as vias, renal e hepática (PACHECO et al., 2009). As quinolonas não são completamente metabolizadas no organismo humano e animal, o que significa que uma parte destes compostos chegam ainda ativos no meio ambiente (RODRIGUES-SILVA et al., 2014). Sabe-se que o ácido carboxílico (grupo funcional carboxila –COOH) das quinolonas é degradado pela luz solar quando em solução aquosa (TORNIAINEN et al., 1997). No entanto, ausência de luz, presença de aeração, variação de temperatura não alteram este composto (KEMPER, 2008). Além disso, quinolonas não são degradadas e ou removidas completamente por processos de compostagem de resíduos sólidos e aqueles utilizados em ETEs (RODRIGUES-SILVA et al., 2014). Vários estudos relatam a presença de resíduos de quinolonas contaminando solo, água superficial, afluentes e efluentes de ETEs, além de água disponibilizada para consumo humano (YIRUHAN et al., 2010; TAMTAM et al., 2011; JIA et al., 2012; XIE et al., 2012). Segundo Rodrigues-Silva e colaboradores (2014), os métodos de eliminação das quinolonas do ambiente ainda precisam ser mais estudados e ressaltam que os processos de tratamento de água e esgoto convencionais não são totalmente eficientes na remoção destes compostos. Alguns autores ainda ressaltam a possível interferência das concentrações das quinolonas na eficiência do lodo ativado, uma vez que pode conferir toxicidade à biomassa essencial ao processo de tratamento (BACKHAUS et al., 2000; HERNANDO et al., 2007). Desta forma, os resíduos de quinolonas presentes no esgoto, originados da crescente utilização em tratamentos de doenças infecciosas de humanos e de animais, indústrias farmacêutica e de alimentos, podem se dispersar pelo ambiente, contribuindo para a seleção de microrganismos resistentes, com grande impacto clínico e ambiental (JIA et al., 2012).

Geralmente, os antimicrobianos agem sobre os microrganismos interferindo em processos vitais para a sobrevivência dos mesmos, sendo estes, alteração da permeabilidade

da membrana citoplasmática e inibição da síntese da parede celular, da síntese de proteínas no nível de ribossomos ou da síntese de ácidos nucléicos. As quinolonas são antimicrobianos bactericidas que interferem na síntese do DNA bacteriano, inibindo enzimas essenciais para sua replicação (TAVARES et al., 2007, ALDRED et al., 2014). As principais enzimas envolvidas no processo de replicação bacteriana pertencem à classe das topoisomerases (topoisomerase II ou DNA girase e a topoisomerase IV), as quais regulam as mudanças conformacionais do DNA bacteriano. Essas enzimas são estruturalmente relacionadas. A forma primária da enzima DNA girase é um tetrâmero com duas subunidades A e duas subunidades B, denominadas GyrA e GyrB, respectivamente, e ambas possuem uma região que liga a enzima ao DNA bacteriano. A DNA girase age sobre o DNA, convertendo sua hélice em uma forma super-helicoidal negativa necessária para a separação das fitas. Já a topoisomerase IV, formada por duas subunidades ParC e duas subunidades ParE, promove a separação dos círculos ligados resultantes da duplicação do DNA bacteriano (PACHECO et al., 2009). A subunidade GyrA e GyrB da DNA girase são respectivamente homólogas às subunidades ParC e ParE da topoisomerase IV (HOOPER, 2001). Os sítios de ação das quinolonas são diferentes em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, nas primeiras o alvo principal é a DNA girase enquanto em Gram-positivas é a enzima topoisomerase IV (RUIZ, 2003).

As quinolonas atuam no DNA bacteriano inibindo a atividade das topoisomerases II e/ou IV, além de promover um efeito tóxico para a célula por capturar uma ou ambas as enzimas do cromossomo bacteriano, criando um complexo ternário (quinolona-topoisomerase-DNA) (FIGURA 2). O complexo ternário ao entrar em contato com as forquilhas de replicação do DNA é clivado. O DNA clivado é convertido em quebra cromossômica permanente pelos sistemas de reparo do DNA. As extremidades livres do DNA de dupla fita, resultantes da quebra, desencadeiam a expressão da resposta SOS e outras vias de reparo do DNA, de forma dependente ou independente de proteínas induzidas por *stress*. No entanto, o grande número de DNA clivado pode resultar em comprometimento desse processo, podendo levar a morte celular (KOHANSKI et al., 2010; ALDRED et al., 2014).

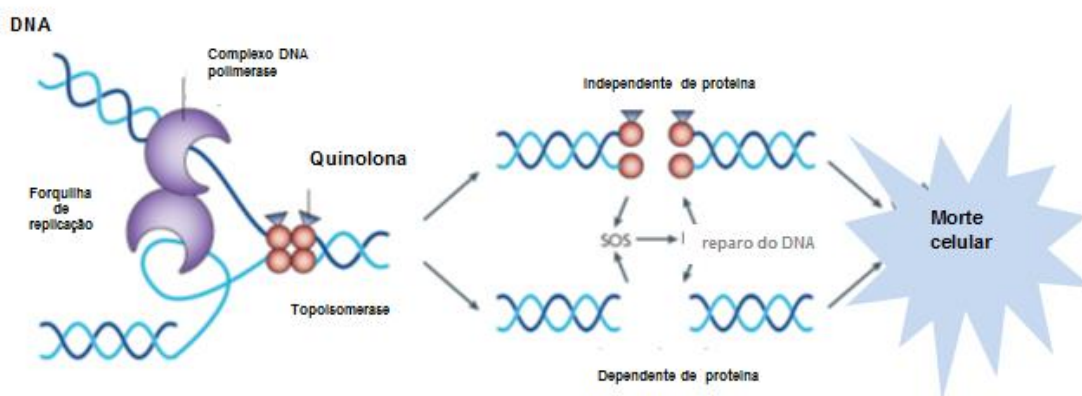


FIGURA 2 - MECANISMO DE AÇÃO DAS QUINOLONAS

Quinolonas (duas moléculas) se ligam as topoisomerases, formando um complexo ternário. Este, ao contato com as forquilhas de replicação é clivado, liberando as duplas fitas de DNA. As extremidades livres das fitas de DNA desencadeiam a expressão do sistema SOS e podem levar a morte celular.

Fonte - Adaptada de Kohanski et al., 2010.

### 2.2.2. Resistência bacteriana as Quinolonas

As quinolonas representam uma classe de antimicrobianos com amplo espectro de ação, apresentam boa farmacocinética e farmacodinâmica e são disponibilizadas para administração via oral. Por esta razão são amplamente utilizadas no tratamento de várias infecções humanas e animais, além da utilização nas fazendas de criação de animais como promotores de crescimento. Porém, o desenvolvimento de mecanismos de resistência bacteriana a estes antimicrobianos ameaça a sua utilização clínica e tem sido descrito em diversos patógenos, possivelmente devido ao uso indiscriminado destes antimicrobianos (CHENIA et al., 2006, ALDRED et al., 2014).

A resistência as quinolonas e fluoroquinolonas na América Latina, de uma maneira geral, têm aumentado tanto em bactérias Gram-positivas quanto Gram- negativas (JONES et al., 2013; BONELLI et al, 2014). O Brasil apresenta uma das maiores taxas de resistência a quinolonas (MINARINI et al., 2012). GALES e colaboradores (2012) reportaram alta resistência a fluoroquinolonas em isolados nosocomiais de *K. pneumoniae*, no período de 2008 - 2010, com taxas de 51,7%, 44,4% e 47,3% respectivamente na Argentina, Brasil e Chile. No Brasil, a prevalência de resistência a ciprofloxacina em *E. coli* associada a ITU variou de 9 a 17% entre 2011 e 2012 (ARAUJO et al., 2011; ROCHA et al., 2012). No entanto, um estudo de MINARINI e colaboradores (2012) em isolados clínicos pertencentes à família Enterobacteriaceae, mostrou que 72,3% (81/112) destes isolados foram resistentes a cirpofloxacina, incluindo *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Providencia stuartii* e *Serratia marcescens*.

Vários mecanismos estão envolvidos no desenvolvimento de resistência bacteriana às quinolonas, como mostrado na TABELA 1 (HAWKEY & JONES, 2009; RUIZ et al., 2012, ALDRED et al. 2014). Originalmente, a resistência as quinolonas era atribuída a mutações em genes cromossômicos que codificam a DNA girase e a topoisomerase IV ou mutações em genes regulatórios da expressão de bombas de efluxo e porinas (RUIZ, 2012). Entretanto, desde que um mecanismo de resistência que confere proteção ao alvo das quinolonas mediado por plasmídios foi descrito em 1998, o número de genes de resistência a quinolonas descritos tem aumentado (STRAHILEVITZ et al., 2009). Estudos têm mostrado a rápida disseminação destes genes entre amostras bacterianas clínicas e como consequência, um grande interesse tem surgido referente aos reservatórios dos genes de resistência as quinolonas e o potencial risco do uso destes antimicrobianos em ambientes não clínicos (YANG et al., 2010; HERNANDEZ et al., 2011).

TABELA 1 – MECANISMOS DE RESISTÊNCIA ÀS QUINOLONAS

RESISTÊNCIA CROMOSSÔMICA AS QUINOLONAS	RESISTÊNCIA TRANSFERÍVEL ÀS QUINOLONAS
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Alterações de alvo: DNA girase e Topoisomerase IV</li> <li>○ Diminuição da permeabilidade da membrana externa</li> <li>○ Hiperexpressão de sistemas de bomba de efluxo AcrAB</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Aquisição de genes veiculados por elementos genéticos móveis: <ul style="list-style-type: none"> <li>gene <i>qnr</i> (variantes A,B,C,D,S, VC)</li> <li>variante <i>cr</i> do gene <i>aac(6')-Ib</i></li> <li>gene <i>qepA</i></li> <li>gene <i>oqxAB</i></li> </ul> </li> <li>○ Trocas exógenas de DNA – <i>gyrA/parC</i></li> </ul>

*qnr* (quinolone resistance), *cr* (ciprofloxacina), *qepA* (quinolone efflux pump), *oqxAB* (quinolone and olaquinox efflux pump)

Fonte – Adaptado de Ruiz et al., 2012

### 2.2.3. Resistência cromossômica as Quinolonas

A resistência cromossômica as quinolonas é mais frequentemente associada a mutações específicas nas enzimas DNA girase e topoisomerase IV, em uma região denominada região determinante de resistência à quinolona (QRDR, do inglês, *quinolone resistance-determining region*) (RUIZ, 2003; ALDRED et al., 2014).

Os genes *gyrA* e *gyrB* codificam, respectivamente, as subunidades GyrA e GyrB da DNA girase bacteriana, ambas requeridas para a plena atividade da enzima. (PACHECO et al., 2009, RODRIGUEZ-MARTINEZ et al. 2011). As alterações descritas na subunidade GyrA que resultam em diminuição da susceptibilidade as quinolonas ocorrem nos aminoácidos entre as posições 67 e 106 (YOSHIDA et al., 1990, RODRIGUEZ-MARTINEZ

et al., 2011). Dentre estas posições, a mais frequente em amostras clínicas de *E. coli* é observada na posição 83, com substituição de serina (S) por leucina (L), triptofano (W), alanina (A) ou valina (V). A segunda mais frequente é descrita na posição 87, com substituição de aspartato (D) por asparagina (N), glicina (G), tirosina (Y), histidina (H) ou valina (V) (PACHECO et al., 2009). No entanto, FRIEDMAN e colaboradores (2001) descreveram uma alteração em GyrA (posição 51), fora da QRDR, a qual resultou em diminuição da susceptibilidade as quinolonas. Já Lindgren e colaboradores (2003) descreveram outra alteração, também fora da QRDR (posição 196) de GyrA, no entanto a interferência desta alteração na susceptibilidade as quinolonas não foi esclarecida. Alterações na subunidade B da DNA girase (GyrB) são menos frequentes que na subunidade A e também levam à diminuição da susceptibilidade as fluoroquinolonas (EVERETT et al., 1996; KIM et al., 2009). Em GyrB as substituições são descritas mais frequentemente nos aminoácidos nas posições 426 e 447 da QRDR, e podem conferir resistência ao ácido nalidíxico, mas susceptibilidade variável às fluoroquinolonas (RUIZ, 2003; CESARO et al., 2008).

A topoisomerase IV é formada por duas subunidades ParC e ParE, codificadas pelos genes *parC* e *parE*, respectivamente. A maioria das alterações descritas nesta enzima em Enterobacteriaceae são encontradas na região situada entre os aminoácidos 64 e 103 em ParC e 420 e 441 em ParE (PACHECO et al., 2009). Em *E. coli*, a subunidade ParC é a mais frequentemente alterada, ocorrendo substituições nos aminoácidos 78, 80 e 84, enquanto em ParE as alterações são encontradas fora da QRDR. Solorzano e colaboradores (2007) descreveram uma mutação em *parE* a qual estava associada com aumento da CIM para fluoroquinolonas. Em 2010, Moon e colaboradores descreveram novas mutações em ParE fora da região QRDR (posições 445 e 458), as quais interferiram na susceptibilidade as quinolonas.

A presença de alteração em quaisquer das posições já mencionadas na QRDR de GyrA geralmente confere um nível de resistência as quinolonas  $\leq 10$  vezes a concentração inibitória mínima (CIM), mas, para obter alto nível de resistência (entre 10 a 100 vezes) é necessária a presença de mutações adicionais no gene *gyrA* e/ou em outro alvo, como no gene *parC* (RUIZ, 2003; DRLICA et al., 2009; ALDRED et al., 2014). Bansal & Tandon (2011) estudando 54 isolados clínicos de *E. coli* sugeriram que resistência a ciprofloxacina era devido ao acúmulo de mutações na QRDR de *gyrA* e *parC*, bem como fora da QRDR de *parE*. As avaliações das mutações nos genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* e *parE*, realizadas por Moon e colaboradores (2010), permitiram a esses autores concluir que duplas mutações em *parC* ou uma combinação de mutação única em *parC* e *parE* também aumentam significativamente as CIMs das fluoroquinolonas.

Aquisição de fragmentos de *gyrA* ou *parC* de bactérias carreando alterações na QRDR, pode também resultar em resistência as quinolonas. Testes *in vitro* realizados por Janoir e colaboradores (1999), evidenciaram a troca destes determinantes de resistência a quinolonas entre *Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus mitis*. Em amostras clínicas de espécies *Streptococcus*, após análise das sequências de *gyrA* e *parC*, Ferrandiz e colaboradores (2000) e Duesberg e colaboradores (2008) sugeriram que os padrões de recombinação encontrados foram adquiridos pelo processo de transformação.

As alterações nos genes que codificam a DNA girase e a topoisomerase IV geralmente são localizadas em domínios específicos de cada subunidade. Nas subunidades GyrA e ParC as alterações nos aminoácidos são, geralmente, localizadas na região amino terminal que contém o sítio ativo da enzima, a tirosina, que é covalentemente ligada ao DNA bacteriano durante a ação da enzima. Para as subunidades GyrB e ParE, as alterações apesar de menos comuns, usualmente são localizadas na porção média da subunidade, no domínio envolvido na interação com suas subunidades complementares, GyrA e ParC, respectivamente (HOOPER, 2001). As alterações dos aminoácidos podem afetar a capacidade de formação de ligações de hidrogênio e a presença de carga negativa dos mesmos, o que parece ser importante para as interações das quinolonas com o complexo DNA girase-DNA bacteriano. Além disso, alguns aminoácidos dentro da QRDR podem ser mais importantes para a associação das subunidades GyrA e GyrB do que para a atividade da enzima (HOPKINS et al., 2005). Estas considerações ajudam a entender porque algumas substituições influenciam mais na resistência as quinolonas do que outras (PACHECO et al., 2009).

A resistência cromossômica as quinolonas também está relacionada com a concentração das quinolonas dentro da célula bacteriana, a qual é regulada pela absorção mediada por difusão e expulsão do antimicrobiano via bomba de efluxo. Em bactérias Gram negativas, a absorção é dificultada pela membrana externa, porém, canais proteicos (porinas) permitem o influxo das quinolonas (ALDRED et al, 2014). As mutações que afetam a permeabilidade da membrana externa conferem resistência em baixo nível as quinolonas (JACOBY et al., 2006; PACHECO et al., 2009, ALDRED et al, 2014). Já o sistema de efluxo ativo, o qual se localiza na membrana interna das bactérias Gram-negativas é frequentemente multiresistente (MDR)(NIKAIDO et al., 2001; HERNANDEZ, et al., 2011). Para quinolonas, tem sido descrito também a bomba de efluxo mediada por plasmídios, o que pode levar à resistência as quinolonas, além de melhorar a expressão das bombas de efluxo codificadas cromossomicamente (STRAHILEVITZ et al., 2009, ALDRED et al., 2014).

#### 2.2.4. Resistência as quinolonas mediados por elementos genéticos móveis

Apesar da resistência as quinolonas resultar mais frequentemente de mutações cromossômicas com disseminação clonal, aquisição de genes de resistência carregados por elementos genéticos móveis tem sido descrita. Os genes de resistência a quinolonas mediados por plasmídios levam a resistência em baixos níveis ( $\leq 10$  vezes a CIM) a esta classe de antimicrobianos, além disso favorecem o desenvolvimento de resistência completa por adição de outros mecanismos (CAVACO et al., 2009a; STRAHILEVITZ et al., 2009).

A maioria dos estudos investiga a presença de genes de resistência a quinolonas em membros da família Enterobacteriaceae, no entanto estes genes tem sido descritos em outros microrganismos como *Aeromonas* spp., *Haemophilus parasuis*, *Pseudomonas* spp. e *Staphylococcus aureus*, alguns de origem ambiental (AHMED et al., 2007; NAKAMINAMI et al., 2010; XIA et al., 2010; GUO et al., 2011; TRAN et al., 2011; RUIZ et al., 2012).

A resistência as quinolonas devido a determinantes de resistência plasmidiais (PMQR, do inglês, *plasmid mediated quinolone resistance*) em Gram-negativo é atualmente atribuída aos genes *qnr*, *aac(6')Ib-cr*, *qepA* e *oqxAB* (HERNANDEZ et al., 2011; RUIZ et al., 2012). Os dois últimos genes estão associados com o sistema de efluxo ativo das quinolonas, e foram descritos, respectivamente, em uma amostra clínica de *E. coli* no Japão (YAMANE et al., 2007) e em uma amostra de *E. coli* ambiental, na Dinamarca (SORENSEN et al., 2003; HANSEN et al., 2004). Os genes da família *qnr* e *aac(6')Ib-cr*, os quais constituem objetos deste estudo, serão detalhados a seguir.

##### 2.2.4.1. Gene *qnr*

O mecanismo de resistência as quinolonas mediado por plasmídios foi descrito pela primeira vez em uma amostra clínica de *K. pneumoniae* nos EUA, em 1998 (MARTINEZ-MARTINEZ et al., 1998). Nesta amostra foi encontrado o plasmídio pMG252, mas alterações de proteínas de membrana externa, mudança no acúmulo intracelular ou inativação enzimática das fluoroquinolonas não foram detectadas (TRAN & JACOBY, 2002). Tran & Jacoby (2002) demonstraram posteriormente que esse plasmídio continha um novo gene, o gene *qnr* (*qnrA1*) associado a um integron. O sequenciamento do gene *qnr* mostrou se tratar de uma janela aberta de leitura de 657 pb que codifica uma proteína de 218 aminoácidos da família pentapeptídeos repetidos denominada proteína QNR (do inglês, *quinolone resistance*), a qual protege a DNA girase da inibição pelas quinolonas (STRAHILEVITZ et al., 2009; RUIZ et al., 2012). É descrito que os plasmídios carregando o gene *qnrA* podem variar em tamanho de 20 a 320 kb e pertencer a pelo menos três grupos de incompatibilidade (Inc)A (STRAHILEVITZ et al., 2009).

Além do gene *qnrA*, que apresenta sete variantes (*qnrA1* a *qnrA7*), quatro outros grupos de determinantes *qnr* são conhecidos *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* e *qnrS* (JACOBY et al., 2008; RUIZ et al, 2012). Segundo o site <http://www.lahey.org/qnrStudies> (JACOBY et al., 2008), acessado 11 de novembro de 2015, os genes *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* e *qnrS* possuem, respectivamente, 80, um, dois e nove variantes. Um novo grupo de determinante *qnr*, denominando *qnrVC*, foi descrito em 2008 em *Vibrio cholerae* (FONSECA et al., 2008), apresentando 70% de identidade com QnrC (WANG et al., 2009). Vários estudos descrevem variantes de *qnrVC* (10), em *Vibrio* spp., *Aeromonas punctata* e outros microrganismos, carregados por integron ou plasmídios (XIA et al., 2010; PONS et al., 2013). Em função da diversidade de variantes descritos para os genes *qnr*, Jacoby e colaboradores (2008) propuseram um consenso para a nomenclatura destes. As famílias de *qnr* (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* ou *qnrS*) são definidas por uma diferença de 30% ou mais na sequência de nucleotídeos ou aminoácidos e, dentro de cada família, os alelos diferem em pelo menos um aminoácido. Genes similares aos genes *qnr* podem ser encontrados no cromossomo de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, entretanto para serem classificados como pertencentes à família *qnr*, segundo o consenso proposto, devem apresentar pelo menos 70% de identidade com esta família. Em 2008, Shimizu e colaboradores, analisando a sequência genômica de *Stenotrophomonas maltophilia*, detectaram o gene *smqnr*, o qual influencia a susceptibilidade as quinolonas quando expressado em outros microrganismos. *Smqnr* apresenta mais de 87 variantes e alguns destes já detectados em *S. maltophilia* no Brasil (WHAREHAM et al., 2011; GRACIA-PAEZ, et al. 2013).

O gene *qnrB* foi detectado na Índia, em um plasmídio de 340 kb encontrado em um isolado clínico de *K. pneumoniae* (JACOBY et al., 2006). As proteínas QnrB codificadas por este gene apresentaram 40 % de homologia com QnrA (NORDMANN & POIREL, 2005). QnrB e outras proteínas variantes da mesma família têm sido identificadas em amostras de *Citrobacter koseri*, *E. coli*, *Enterobacter cloacae* e *K. pneumoniae* recuperadas de amostras nos EUA e na Índia, com várias delas apresentando ao mesmo tempo os genes *qnrA* e *qnrB* (JACOBY et al., 2006; STRAHILEVITZ et al., 2009).

O gene *qnrS1*, de, aproximadamente 657 pb, foi descrito em 2003 no Japão, em um plasmídio pAH0376 de aproximadamente 47 kb de *Shigella flexneri*. Este plasmídio conferiu resistência em baixo nível as quinolonas e a proteína codificada pelo gene mostrou 59% de identidade com a proteína Qnr (HATA et al., 2005). Os alelos de *qnrS* (*qnrS2* e *qnrS3*), cujas proteínas apresentam 92,2 % de identidade com QnrS1, tem sido frequentemente descritos em *Salmonella* spp. (GAY et al., 2006; STRAHILEVITZ et al., 2009; TORPDAHL

et al., 2009). Em geral, os plasmídios que carregam o gene *qnrS* não são conjugativos (STRAHILEVITZ et al., 2009).

O gene *qnrC*, de 666 pb, que codifica uma proteína de 221 aminoácidos da família pentapeptídeos repetidos, foi encontrado no plasmídio pHS10 de aproximadamente 120 kb em *Proteus mirabilis*, na China, em 2009 (WANG et al., 2009).

O plasmídio carreando o gene *qnrD*, de aproximadamente 4,3 kb, foi encontrado também na China, em 2009, em *S. enterica* sorovar Kentucky e *S. enterica* sorovar Bovismorbificans. Esse gene codifica uma proteína de 214 aminoácidos da família pentapeptídeos repetidos e o seu sequenciamento mostrou 48% de similaridade com a QnrA1, 61% com a QnrB1 e 41% com a QnrS1 (CAVACO et al., 2009b).

No Brasil, detecção prévia dos genes *qnrA1*, *qnrB2* e *qnrB8* em Enterobacteriaceae foram descritas por Minarini e colaboradores (2008), enquanto que o variante *qnrB19* foi detectado pela primeira vez em *Salmonella* de diferentes serovars de origem veterinária (FERRARI et al., 2011). Em 2012, Paiva e colaboradores, estudando *E. coli* recuperadas de pacientes com infecção do trato urinário, detectaram o gene *qnrB19* e, pela primeira vez no Brasil, o gene *qnrS1* (PAIVA et al, 2012). Posteriormente, Viana e colaboradores (2013) relataram a presença de *qnrB* (variantes 2 e 19) e *qnrS1* em Enterobacteriaceae de origem clínica.

Os genes *qnr* são encontrados em plasmídios variando em tamanho (até 320 kb) e frequentemente carregam simultaneamente outros genes de resistência a antimicrobianos tais como betalactâmicos, cloranfenicol e aminoglicosídeos (STRAHILEVITZ et al., 2009). No plasmidio pMG252, o gene *qnr* se localiza imediatamente à montante do gene *qacEΔ1*, o qual codifica uma proteína que confere resistência a compostos de amônio quaternário, e *sul1*, um gene não expressado de resistência a sulfonamidas. Duas cópias de janela aberta de leitura Orf513 (do inglês, *open reading frame*), envolvem estes genes de resistência (FIGURA 3) (TRAN & JACOBY, 2002; LI, 2005).

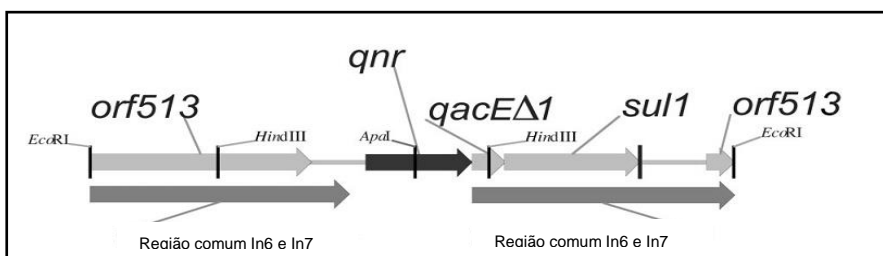


FIGURA 3 - CONTEXTO GENÉTICO DO GENE *qnr* EM PLASMÍDIO pMG252. *orf 513*(transposase), *qnr*(gene), *qacEΔ1*(gene resistência a compostos de amônio quaternário), *sul1*(gene não expressado de resistência a sulfonamidas), In6 e In7(integrans), *EcoRI* / *HindIII* / *ApaI* (enzimas de restrição) Fonte - Adaptada de Tran & Jacoby (2002)

O mecanismo de ação detalhado de todas as proteínas Qnr ainda é desconhecido, tendo sido descrito que a proteína QnrA altera as subunidades GyrA e GyrB da DNA girase nos estágios iniciais de interação entre ela e o DNA bacteriano e reduz a quantidade de alvos das enzimas para inibição pela quinolona (NORDMANN & POIREL, 2005; RUIZ et al., 2012). Montero e colaboradores (2001) sugerem que o mecanismo de ação das proteínas Qnr seja parecido com o de outras proteínas de pentapeptídeos análogos, tais como a proteína McbG que possui 19,6% de identidade de aminoácidos com Qnr e protege a DNA girase dos efeitos da microcina B17 e MfpA. MfpA é uma proteína codificada por genes presentes no cromossomo de *Mycobacterium smegmatis*, apresenta 18,9% de identidade de aminoácidos com QnrA e inibe o super enovelamento do DNA catalizados pela DNA girase. Além disso, Vetting e colaboradores (2011) sugerem que as proteínas Qnr se ligam e desestabilizam o complexo ternário, proporcionando a regeneração da atividade das topoisomerases. No geral, as proteínas Qnr protegem a DNA girase do ataque das quinolonas e determinam uma moderada redução da susceptibilidade às mesmas (CANO et al., 2009, RUIZ et al., 2012).

#### **2.2.5. Resistência bacteriana às quinolonas em ambientes naturais e origem dos genes *qnr***

A resistência intrínseca ou adquirida aos antimicrobianos em bactérias provenientes de diferentes ambientes naturais vem sendo frequentemente documentada. A maioria dos antibióticos é produzida por microrganismos ambientais, os quais necessitam desenvolver estratégias para evitar a atividade do composto produzido contra ele próprio. Em função deste fato, é amplamente aceito que microrganismos produtores de antibióticos são a origem de genes de resistência, e estes podem ser adquiridos por patógenos humanos e animais e por microrganismos ambientais (DAVIES, 1994; HERNANDEZ et al., 2011).

Inicialmente foi proposto que bactérias ambientais não poderiam carrear genes de resistência a quinolonas, uma vez que são antimicrobianos sintéticos e estas bactérias não estariam expostas à pressão seletiva exercida por estes compostos (HERNANDEZ et al., 2011). Além disso, por um longo tempo, acreditou-se que o único mecanismo de resistência as quinolonas seria devido a mutação dos genes cromossômicos da DNA girase e topoisomerase IV. No entanto, em 1998, a detecção do gene *qnr*, passível de transferência horizontal (MARTINEZ-MARTINEZ et al., 1998), abriu novas perspectivas para o estudo da resistência a quinolonas, com grandes questionamentos sobre origem deste gene (STRAHILEVITZ et al., 2009).

As quinolonas, metabolizadas incompletamente pelo organismo humano e animal, são excretadas por mamíferos, podendo fazer parte do esgoto, contaminar ambientes aquáticos e terrestres, sendo considerados micropoluentes ambientais. Outra via importante pela qual as quinolonas chegam ao ambiente, frequentemente de forma direta, é a utilização no tratamento das doenças infecciosas dos animais domésticos e nas fazendas de criação de animais (VAN DOORSLAER et al., 2014). Vários estudos mostram que a média de concentração de fluoroquinolonas em águas superficiais é de 26 ng/L, com variações em função da localização e sazonalidade, enquanto no sedimento a variação é de 210 ng/kg a 20 mg/kg (AL AUKIDY et al., 2012; BATT et al., 2006; GAO et al., 2012). Em ETEs também são detectadas variadas concentrações de fluoroquinolonas, sendo maiores nos tanques de lodos ativados (média 3,2 mg/kg), seguido pelo esgoto bruto (até 8 µg/L) e efluente (até 31 µg/L) (VAN DOORSLAER et al., 2014). Em superfície de água e em pequenas profundidades, fluoroquinolonas são degradadas primariamente pela luz solar, mas deve ser ressaltado que outros processos são envolvidos na degradação destes compostos no ambiente, tais como biodegradação e oxidação por óxidos minerais (BABIC et al., 2013; VAN DOORSLAER et al., 2014). A degradação via fotólise constitui um processo mais lento, com tempo de meia vida verificado para fluoroquinolonas, como ofloxacina, entre 3 e 12 dias (XU et al. 2009). Se a persistência de fluoroquinolonas no ambiente já vem sendo documentada, a sua bioacumulação (taxa de concentração nos tecidos de plantas e animais em relação à concentração na água) é menos explorada. Porém, bioacumulação de ciproflacina em caranguejos, carpas e plantas aquáticas já foram verificadas por Gao e colaboradores (2012) e Li e colaboradores (2012).

A permanência de quinolonas no ambiente por longo tempo exerce uma pressão seletiva sobre a comunidade bacteriana, alterando sua sensibilidade a estes agentes e pode contribuir para a seleção de genes de resistência com potencial para a disseminação (STRAHILEVITZ et al., 2009, RODRIGUES-SILVA et al., 2014). Os genes de resistência a quinolonas tiveram sua origem atribuída a bactérias ambientais. Para verificar a hipótese de que os genes *qnr* poderiam ser originados de cromossomos de microrganismos humanos, animais e ambientais, Poirel e colaboradores (2005) realizaram um trabalho investigativo da presença destes genes e localizaram variantes do gene *qnrA* (*qnrA3* a *qnrA5*) no cromossomo de *Shewanella algae*. Esses autores encontraram homologia de mais de 70% entre as proteínas QnrA3 e QnrA5 codificadas por genes do cromossomo de *S. algae* e *S. putrefaciens* e QnrA1 mediada por plasmídeo (POIREL et al., 2005). *Shewanella* spp. são encontradas em água de ambiente marinho e doce e constituem, provavelmente, reservatório do gene *qnrA*. Segundo Jacoby e colaboradores (2011), o gene *qnrB* é originado do cromossomo de *Citrobacter* spp. e tem sido também detectado em análises de metagenoma marinho e cromossomo de *S. maltophilia*.

Além disso, tem sido mostrado que proteínas QnrS codificadas por genes cromossômicos de *Vibrio splendidus* apresentam mais de 80% de homologia com QnrS1 carregada por plasmídios, (CATTOIR et al., 2007). O gene *qnrS2* também foi encontrado em plasmídios carregados por microrganismos ambientais. Cattoir e colaboradores (2008) conduziram um estudo em águas coletadas no rio Sena, França, e encontraram plasmídios carregando o gene *qnrS2* em *Aeromonas punctata* subsp. *punctata* e *Aeromonas media*. Esse mesmo gene foi detectado em plasmídios carregados por *Aeromonas allosaccharophila*, encontrada no Lago Lugano, um lago glacial situado na fronteira entre a Suíça e Itália, em 2005 (PICAO et al., 2008). Situação análoga foi encontrada por Yamane e colaboradores (2007) quando caracterizam o gene *qepA* detectado em um isolado clínico de *E. coli*, em um estudo realizado no Japão. A proteína QepA apresentou considerável homologia com transportadores de membrana tipo MFS (do inglês, *major facilitators family*) encontradas em *Polaromonas* spp. e membros da ordem *Actinomycetales*. Estes autores sugerem que a proteína QepA pode ter sua origem associada a microrganismos ambientais que produzem metabólitos bioativos, incluindo antimicrobianos com estrutura química similar às fluoroquinolonas. Esses dados sugerem que microrganismos aquáticos podem ser um reservatório de determinantes de resistência, possivelmente adquiridos por patógenos.

### 2.3. Aminoglicosídeos

Aminoglicosídeos constituem uma classe de antimicrobianos, amplamente empregados para o tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-negativas aeróbicas, porém, não são ativos contra bactérias anaeróbicas, uma vez que a captação destes compostos pela célula bacteriana depende do processo de respiração. Para infecções causadas por bactérias Gram-positivas, os aminoglicosídeos são usados em associação com outros antimicrobianos como betalactâmicos e vancomicina, com efeito sinérgico possivelmente atribuída à melhora da captação (YAO & MOELLERING, 2007; RAMIREZ & TOLMASKY., 2010). Aminoglicosídeos são produzidos naturalmente pelas bactérias do solo pertencentes aos gêneros *Streptomyces* e *Micromonospora*. O primeiro aminoglicosídeo descoberto foi a estreptomicina (1943), isolada de *Streptomyces griseus* e dentre as aplicações clínicas, é utilizada com sucesso para o tratamento da tuberculose (SCHATZ et al., 1944; BECKER & COOPER, 2013). Outros aminoglicosídeos como a neomicina, a gentamicina, a tobramicina e a sisomicina foram disponibilizados para uso clínico, com boa eficácia contra bactérias Gram-negativas e Gram positivas. No entanto, com o amplo uso foram verificados efeitos tóxicos nos pacientes, especialmente ototoxicidade e nefrotoxicidade, além dos primeiros relatos de resistência bacteriana. Derivados semi-sintéticos de aminoglicosídeos (amicacina, netilmicina,

arbecacina e outros) foram desenvolvidos a partir da década de 1970, visando redução da toxicidade e falha na terapêutica devido a resistência (BECKER & COOPER, 2013). A molécula dos aminoglicosídeos é constituída por dois ou mais aminoaçúcares unidos por ligação glicosídica a grupos hexose ou aminociclitol, os quais podem conter substituintes que são essenciais para a interação com a porção 30S do ribossoma bacteriano, onde exercem sua ação inibindo a síntese de proteínas. Deve ser ressaltado que para a ação destes antimicrobianos, é necessária a ligação à superfície da célula bacteriana e posterior transporte para o citoplasma por um processo dependente de energia oxidativa que ainda não é totalmente elucidado em bactérias Gram-negativas (HOUGHTON et al., 2010; BECKER & COOPER, 2013).

Várias formulações de aminoglicosídeos são disponibilizadas, sendo as intramuscular e endovenosa mais comumente utilizadas para tratamento de infecções. A via oral não é utilizada uma vez que a absorção dos aminoglicosídeos fica comprometida. Novas formulações, tais como aerossóis, encapsulamento em lipossomos e nanopartículas, estão em fase experimental (RAMIREZ & TOLMASKY, 2010). Devido à eficácia clínica dos aminoglicosídeos, estes compostos são amplamente utilizados, no entanto o desenvolvimento de mecanismos de resistência bacteriana tem sido descritos. Vários mecanismos de resistência bacteriana aos aminoglicosídeos são descritos, incluindo modificação do alvo por mutação no gene *16S rRNA* ou alteração nas proteínas ribossomais, metilação do 16S rRNA, redução da permeabilidade da membrana externa, efluxo ativo e o mais frequente, sobretudo em amostras clínicas, inativação enzimática do composto (GALIMAND et al., 2005; RAMIREZ & TOLMASKY, 2010).

Antimicrobianos da classe dos aminoglicosídeos podem ser modificados enzimaticamente por O-fosforilação, O-nucleotidilação e N-acetilação catalisadas respectivamente pelas enzimas aminoglicosídeo O-fosfotransferase (APH), aminoglicosídeo O-nucleotidiltransferase (ANT) e aminoglicosídeo N-acetiltransferase (AAC), sendo esta última a mais predominante causa de resistência bacteriana a esta classe de antimicrobiano (MAGNET et al., 2005; VETTING et al., 2008; RAMIREZ & TOLMASKY, 2010).

A enzima AAC seletivamente transfere um grupo acetil do acetil-CoA (Ac-CoA) a um dos vários grupos amino funcionais presente nos aminoglicosídeos. Considerando o sítio de acetilação, as AACs são classificadas em quatro classes de AACs: AAC(1), AAC(3), AAC(2') e AAC(6'), sendo que os membros da família AAC(6') são os mais comuns na natureza e de maior importância, uma vez que inativam aminoglicosídeos utilizados na clínica médica (MAGNET et al., 2005). A classe AAC(6') é dividida em 2 subtipos, AAC(6')-I apresenta alta atividade contra amicacina e gentamicina (apenas forma C1 e C2),

enquanto AAC(6)-II atua contra as três formas de gentamicina (C1, C2 e C3), mas não em amicacina (TOLMASKY et al., 1986, TOLMASKY et al., 2007). AAC(6')-Ib, a mais prevalente do subgrupo AAC(6')-I, foi detectada pela primeira vez em uma amostra de *K. pneumoniae*, em 1986, conferindo resistência a tobramicina, canamicina e amicacina (TOLMASKY et al., 1986; VETTING et al., 2008).

Novas classes de AACs tem sido descritas, ampliando o espectro de atividade e o número de substratos destas enzimas. Na classe das fluoroquinolonas, uma reduzida susceptibilidade à ciprofloxacina em amostras clínicas é conferida por um variante do gene que codifica a enzima AAC(6')-Ib. Esse mecanismo envolve o gene *aac(6')Ib*, então designado variante *cr* (do inglês, *ciprofloxacin resistance*), descrito pela primeira vez por ROBICSEK et al. (2006) e, agora, amplamente disseminado em todo mundo (ROBICSEK et al., 2006, RUIZ et al, 2012).

Os genes *aac(6')Ib* apresentam alto potencial de disseminação entre os microrganismos, sendo encontrados em cromossomos, carregados por elementos genéticos móveis, como parte de integron, gene cassete, transposon e plasmídio, além de poderem ser transferidos por transformação e transdução (TOLMASKY et al., 2007; BECKER & COOPER, 2013). Muitos variantes deste gene têm sido descritos, alguns apresentando mutações que não alteram a função da proteína, porém em outros, as alterações resultam em diferenças na especificidade e atividade da enzima relacionada aos aminoglicosídeos. Especificamente, o variante *cr* codifica uma enzima com amplo espectro de substrato, ativa contra aminoglicosídeos e fluoroquinolonas (RAMIREZ et al., 2013). O gene *aac(6') Ib* e seus variantes são encontrados em ambientes diversos em todo o mundo, incluindo microrganismos ambientais e patogênicos para os homens e animais (JUNG et al., 2009).

### **2.3.1. Genes *aac(6')Ib* e variante *cr***

Enzimas modificadoras de antimicrobianos são tradicionalmente classe específica e coevoluem com os antimicrobianos inativados por elas. Algumas destas enzimas têm uma função primária no metabolismo bacteriano e a capacidade de modificar os antimicrobianos é uma consequência da similaridade estrutural entre estes e o substrato original da enzima. Várias classes de antimicrobianos têm sua eficácia ameaçada em função de inativação enzimática, e já existem relatos na literatura de enzimas atuando sobre classes distintas de antimicrobianos. (HERNANDEZ et al., 2011).

O gene *aac(6')Ib-cr* de 600 pb foi encontrado no plasmídio PSH2 de 68 kb, isolado em 2003 em Shangai, China, de uma amostra clínica de *E. coli* (ROBICSEK et al., 2006; JACOBY et al., 2009; STRAHILEVITZ et al., 2009). *aac(6')Ib-cr* é um variante do gene

*aac(6')Ib*, que apresenta duas substituições de aminoácidos, triptofano por arginina na posição 104 (W104R) e aspartato por tirosina na posição 181 (D181Y), as quais melhoram o reconhecimento do substrato pela enzima e são responsáveis pelo fenótipo de resistência a ciprofloxacina e norfloxacina (ROBICSEK et al., 2006; JONES et al., 2008; JACOBY et al., 2009). A enzima fluoroquinolona acetiltransferase codificada por esse gene age sobre algumas fluoroquinolonas conferindo susceptibilidade reduzida (três a quatro vezes a CIM para ciprofloxacina) por N-acetilação do radical amino piperazinil, no entanto, sua maior importância é atribuída ao fato de facilitar a sobrevivência de bactérias com mutações no sítio alvo (ROBICSEK et al., 2006). *Aac(6')Ib-cr* determina também variação dos níveis de resistência aos aminoglicosídeos, com redução em duas diluições na CIM da canamicina e uma diluição nas CIMs da tobramicina e da amicacina em comparação com amostras sem as duas substituições de aminoácidos Para a canamicina e tobramicina as CIMs continuaram acima daquelas consideradas como resistência pelos *breakpoints* clínicos, enquanto que para amicacina a CIM obtida foi interpretada como sensível (ROBICSEK et al., 2006).

No plasmídio pHSH2, o gene *aac(6')Ib-cr* se localiza imediatamente à montante do gene *bla<sub>OXA1</sub>*, o qual codifica uma betalactamase tipo OXA1 (penicilinase), e *catB3*, um gene que codifica a enzima cloranfenicol acetiltransferase. Outros genes de resistência, como *aar3*, que confere resistência a antiauxina, *qacEΔ1* e *sul1* também são carregados por este plasmídio (FIGURA 4) (WANG et al., 2003; STRAHILEVITZ et al., 2009). O gene *aac(6')Ib-cr*, assim como o *aac(6')Ib* tem sido encontrado também em vários integrons, mais especificamente no plasmídio IncF11 (STRAHILEVITZ et al., 2009).

Na América Latina, o gene *aac(6')Ib-cr* foi descrito pela primeira vez em amostras de *E. coli*, obtidas de espécimes clínicos, isoladas no Peru (PALLECHI et al., 2009). Posteriormente, foram detectadas em Enterobactérias no Uruguai (CORDEIRO et al., 2008) e Argentina (QUIROGA et al., 2007). No Brasil, a primeira detecção de *aac(6')Ib-cr* foi em amostras clínicas de *E. coli* (PAIVA et al., 2012), *Enterobacter cloacae* e *K. pneumoniae* (VIANA et al., 2013).

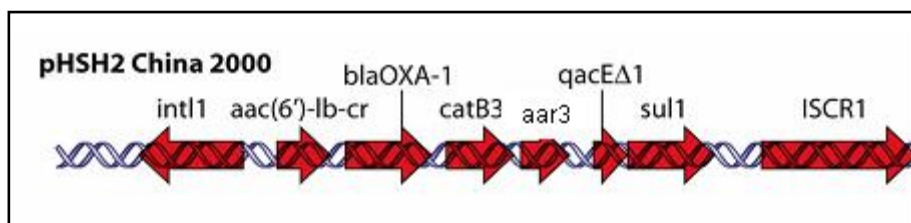


FIGURA 4 - CONTEXTO GENÉTICO DO GENE *aac(6')Ib-cr* EM PLASMÍDIO pH2SH2  
*int11*(integrase), *aac(6')Ib-cr*(gene), *bla<sub>OXA1</sub>*(gene betalactmase OXA1), *catB3*(gene cloranfenicol acetiltransferase), *aar3*(gene resistência a antiauxina), *qacEΔ1*(gene resistência a compostos de amônio

quaternário), *sulI*(gene não expressado de resistência a sulfonamidas), ISCR(sequência de inserção região comum)

Fonte - Adaptada de Strahilevitz et al. (2009)

## 2.4. Estação de tratamento de esgotos e diversidade microbiana

Água residual ou esgoto é definido como produto de utilização da água para fins industriais, domésticos ou comerciais sendo que o tamanho da população e as atividades incidentes sobre esta água determinam o tipo e o volume do esgoto (*DECENTRALIZED WASTEWATER GLOSSARY*, 2009). Os esgotos são classificados em quatro tipos principais segundo a origem da atividade, como esgoto doméstico, industrial, da agricultura e urbano. O esgoto doméstico é basicamente constituído de água, microrganismos e matéria orgânica, sendo que a matéria orgânica lançada no ambiente possibilita um desequilíbrio ecológico (LUCENA, 2008). Além disso, microrganismos pertencentes à microbiota intestinal humana e de animais são introduzidos no ambiente, o que pode afetar o ecossistema.

Considerada um recurso natural e renovável, a água está cada vez mais limitada no planeta. Diante do cenário de possíveis contaminações hídricas, ações de proteção à água têm sido estabelecidas e uma estratégia crescente em todo o mundo é a instalação de estações de tratamento de esgotos (ETEs), objetivando devolver ao ambiente uma água de qualidade com alta remoção de matéria orgânica e microrganismos (NAIDOO & OLANIRAN, 2014).

O processo de tratamento biológico do esgoto instituído em uma ETE geralmente acontece em estágios, iniciando com a coleta, tratamento preliminar, primário, secundário e terciário. O tratamento preliminar consiste na remoção de sólidos grosseiros, enquanto que no tratamento primário são removidos os sólidos de maiores dimensões e decantáveis além de uma parte da matéria orgânica como óleos e gorduras (SONUNE et al., 2004; VON SPERLING, 2005). O estágio seguinte, o tratamento secundário, possibilita a decomposição dos sólidos suspensos remanescentes e uma grande diminuição da carga microbiana, utilizando principalmente sistemas biológicos (VON SPERLING, 2005; NAIDOO & OLANIRAN, 2014). Neste estágio, reatores biológicos são empregados e utilizam bactérias aeróbias ou anaeróbias, respectivamente, empregando sistema de aeração de lodos ativados ou sistemas anaeróbios, tipo UASB (do inglês, *Upflow anaerobic sludge blanket*) ou, de acordo com a tradução para o português, RAFA – Reatores Anaeróbios de Fluxo Ascendente (VON SPERLING, 2005). O tratamento terciário é empregado para remoção de nutrientes, metais pesados, organismos patogênicos e de outros poluentes específicos remanescentes do tratamento secundário (VON SPERLING, 2005).

Dentre os processos de tratamento biológico do esgoto, o sistema de lodos ativados tem sido amplamente utilizado, apresentando as vantagens de uma eficácia de remoção da matéria orgânica superior a 90% e baixos requisitos de área para implantação (VON SPERLING, 2005; FERREIRA & CORAIOLA, 2008). Os lodos ativados geralmente contêm uma associação de microrganismos (biomassa) envolvidos em uma matriz polissacarídica, tais como fungos, protozoários, nematódeos, algas, arqueias e bactérias, sendo que estas últimas compreendem cerca de 95% desta população (VON SPERLING, 2005, LIU et al., 2007). Constituem variantes do sistema de lodos ativados: sistemas convencional, de aeração prolongada e de fluxo intermitente ou em batelada. O sistema de lodos ativados convencional fluxo contínuo envolve um reator biológico, onde o esgoto entra e sai continuamente, e decantadores primários e secundários. O tempo de detenção do líquido (detenção hidráulica) é de cerca de 6 a 8 horas e o tempo de permanência da biomassa (idade do lodo) é de 4 a 10 dias. Posteriormente, a biomassa é encaminhada ao decantador secundário onde ocorre a sedimentação dos sólidos permitindo que o efluente final saia clarificado para o corpo receptor. No tanque de aeração, a demanda contínua de matéria orgânica favorece o crescimento e a reprodução dos microrganismos, o que deve ser controlado uma vez que o excesso de biomassa pode interferir na eficácia do sistema bem como comprometer a sedimentação no decantador secundário com consequente liberação de efluente de baixa qualidade. O equilíbrio do sistema é garantido pela retirada do lodo excedente, que poderá ser recirculado ou descartado e, como ainda possui muita matéria orgânica, o lodo passa para a etapa de estabilização. O lodo excedente é tratado utilizando processos químicos, físicos e biológicos, passando pelas fases de adensamento, digestão e desidratação antes de serem enviados a aterros sanitários ou reaproveitados como adubos (VON SPERLING et al., 2001).

Estudos da diversidade microbiana de um ambiente possibilitam o entendimento das funções e interações entre os organismos, o que é importante para a implementação de intervenções visando melhorar o desempenho das comunidades bacterianas utilizadas em vários processos. Além disso, permite a identificação de outras funções bacterianas, com potencial de emprego em diversas áreas. Inicialmente os estudos da diversidade microbiana foram realizados utilizando métodos dependentes de cultivo, baseados em comparações fenotípicas, no entanto, como maioria das bactérias não é cultivável, a detecção da real diversidade dos microrganismos ficava comprometida (NOCKER et al., 2007). Entretanto, esta abordagem é amplamente utilizada em pesquisas onde os microrganismos pesquisados são passíveis de serem cultivados *in vitro*. Com o surgimento dos métodos moleculares, como reação em cadeia pela polimerase (MULLIS, 1987) e o sequenciamento de DNA (SANGER, 1977), foi possível aprofundar os conhecimentos sobre a diversidade e classificação

microbianas. O sequenciamento do gene RNA ribossômico (rRNA) 16S contribuiu para aprimorar o conhecimento da taxonomia, ecologia e evolução de espécies de procariotos em vários ambientes (RAPPÉ & GIOVANNONI, 2003; TRINGE & HUGENHOLTZ, 2008; NASCIMENTO, 2011). Os RNAs ribossômicos são responsáveis pela síntese proteica em eucariotos e procariotos e constituem moléculas conservadas, fator que os tornam de grande importância nos estudos de diversidade. Nos procariotos os ribossomos são formados por duas subunidades: a subunidade 30S, composta por proteínas e o rRNA 16S, e a subunidade 50S, composta de proteínas e dos rRNAs 5S e 23S (WOESE, 1987). Os genes rRNA 16S, 5S e 23S estão agrupados em um único operon, cujo número de cópias no genoma bacteriano pode variar de três a oito, com algumas poucas espécies bacterianas apresentando até 15 cópias (TOUROVA, 2003). Dos três genes ribossômicos, o 16S e o 23S rRNA, apresentam variabilidade suficiente, possibilitando a diferenciação de procariotos no nível de gênero e até mesmo espécie. No entanto, nos estudos de diversidade microbiana, o gene 16S rRNA vem sendo mais utilizado por possuir tamanho adequado para ser estudado (1.542 pares de base, pb) e também regiões filogenéticas informativas além do considerável número de sequências depositadas nos bancos de dados de referência (MADIGAN et al., 2004; PONTES et al., 2007).

O sequenciamento de grande quantidade de 16S rRNA tem permitido avaliar e analisar a diversidade e abundância da comunidade bacteriana em vários ambientes, com alta fidelidade, com perspectivas de elucidar os processos naturais e posteriormente, utilizar os modelos em favor da humanidade (LIU et al., 2012). A disponibilidade de sequenciadores automatizados de nova geração, denominados *high throughput sequencing* (sequenciamento em larga escala) bem como o desenvolvimento de ferramentas de bioinformática tornaram o sequenciamento de genomas mais acessível, rápido, com baixo custo e vem sendo amplamente utilizado (XU, 2011). Destacam-se atualmente as plataformas Roche/454 FLX, *Illumina/Solexa Genome Analyzer*, *Applied Biosystems SOLiDTM System* e a mais recente *Ion Torrent Personal Genome Machine* (PGM) (MARDIS, 2008; JÜNEMANN et al., 2012). Esses sequenciadores possibilitam um maior rendimento com relação ao número de sequências e o total de bases geradas, além de um comprimento maior destas sequências quando comparadas com o sequenciamento de Sanger (MARDIS, 2008). Na plataforma da *Illumina/ HiSeq 2000*, o sequenciamento ocorre por síntese, gerando sequências de 50 a 100 pb. Os fragmentos de DNA são ligados a adaptadores fixos, desnaturados em fita simples, inseridos e fixados em uma lâmina de vidro onde ocorre o sequenciamento (*flowcell*). Posteriormente, ocorre a amplificação do DNA ligado a *flowcell*, formando grupos ou *clusters* que contém o fragmento do DNA clonado. Uma DNA polimerase e nucleotídeos marcados

com diferentes fluoróforos são utilizados e o nucleotídeo terminador não interrompe a adição dos próximos nucleotídeos. A incorporação de um nucleotídeo marcado com fluoróforo gera um sinal, o qual é captado e interpretado pelo sequenciador (LIU et al., 2012).

A composição bacteriana das ETEs é complexa, altamente diversa e sofre interferência de condições climáticas, geográficas, populacional, processos de tratamento, dentre outros (MC LELLAN et al., 2010). A diversidade bacteriana do esgoto não tem sido detalhadamente estudada, com poucos trabalhos investigando a diversidade desta comunidade. No Brasil, considerando a literatura pesquisada, não existem ainda relatos de estudos da diversidade bacteriana de amostras do esgoto bruto, com poucos estudos referentes à diversidade da comunidade total dos lodos ativados (VON SPERLING, 1997; ANDREOLI et al., 2001; SILVA et al., 2007). Em contraste, maior atenção tem sido dada aos lodos ativados, com vários estudos investigando a estrutura e a função da comunidade bacteriana neste ambiente (LIU et al., 2007; ZHANG et al., 2012; YADAV et al., 2014, SHEIK et al., 2014; HAI et al., 2014). A comunidade bacteriana dos lodos ativados é similar à do esgoto bruto, no entanto muitas bactérias dominantes no esgoto não são identificadas nos lodos ativados, enquanto que outros táxons são detectados, possivelmente esta diferença está relacionada com a função de cada grupo bacteriano e as condições dos tanques de aeração (LIU et al., 2007).

As comunidades bacterianas de uma ETE estão continuamente expostas a diversos compostos antrópicos destacando-se dentre estes os antimicrobianos, oriundos de excretas de seres humanos, animais, esgotos hospitalares e resíduos de indústrias farmacêuticas (SUZUKI & HOA, 2012). Considerando as características farmacocinéticas e farmacodinâmicas de cada antimicrobiano, é relatado que baixas concentrações destes compostos permanecem em vários ambientes e, conseqüentemente, a microbiota presente é continuamente exposta aos mesmos (KÜMMERER, 2008). Baixas concentrações de antimicrobianos podem ser um fator para selecionar bactérias resistentes, favorecendo o aumento da taxa de mutação para resistência bacteriana (SANDEGREN, 2014). Possivelmente, contribuem também para o aumento das taxas de transferência horizontal de genes por meio de elementos genéticos móveis (COUCE et al., 2009). Resíduos de antimicrobianos são atualmente considerados micropoluentes ambientais, e constituem um grande desafio, uma vez que as ETEs não são designadas para remover esses compostos (LUO et al., 2014). Desta forma, considerando o efeito da presença destes micropoluentes, os ambientes das ETEs são considerados reservatórios de genes de resistência aos antimicrobianos, com potencial de disseminação para bactérias clinicamente relevantes. Além disso, o efluente das ETEs pode impactar negativamente o ambiente aquático, afetando o ecossistema, constituindo um risco para o ambiente e para os seres humanos (DEVARAJAN et al., 2015).

## **3- Objetivos**

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Estudar a diversidade bacteriana e dos genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* e *aac(6')Ib* por abordagens dependente e independente de cultivo em uma Estação de Tratamento de Esgotos, Belo Horizonte-MG.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

##### **Capítulo I:**

- Analisar a microbiota das amostras de esgoto bruto e lodo ativado por método independente de cultivo;
- Quantificar bactérias contendo gene integrase *intl1* no esgoto bruto e lodos ativados.

##### **Capítulo II:**

- Avaliar a diversidade dos genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* e *aac(6')Ib-cr* nas amostras de esgoto bruto e lodo ativado e culturas enriquecidas;
- Isolar bactérias resistentes ao ácido nalidíxico de amostras de esgoto bruto e lodo ativado utilizando o método de enriquecimento e identifica-las por método fenotípico e genotípico;
- Determinar a CIM dos antimicrobianos das classes quinolonas e aminoglicosídeos de amostras bacterianas;
- Estudar as alterações dos aminoácidos em AAC (6')IB, AAC(6')IB-CR e QNRS e correlacionar com a atividade da proteína por meio de análise estrutural.

## **4 - Capítulo I**

RESEARCH ARTICLE

# The Microbiota and Abundance of the Class 1 Integron-Integrase Gene in Tropical Sewage Treatment Plant Influent and Activated Sludge

Magna C. Paiva<sup>1,2</sup>, Marcelo P. Ávila<sup>3</sup>, Mariana P. Reis<sup>3</sup>, Patrícia S. Costa<sup>3</sup>, Regina M. D. Nardi<sup>1</sup>, Andréa M. A. Nascimento<sup>3\*</sup>

**1** Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **2** Campus Dona Lindu, Universidade Federal de São João del Rei, Divinópolis, Minas Gerais, Brazil, **3** Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

\* [amaral@ufmg.br](mailto:amaral@ufmg.br)



 OPEN ACCESS

**Citation:** Paiva MC, Ávila MP, Reis MP, Costa PS, Nardi RMD, Nascimento AMA (2015) The Microbiota and Abundance of the Class 1 Integron-Integrase Gene in Tropical Sewage Treatment Plant Influent and Activated Sludge. PLoS ONE 10(6): e0131532. doi:10.1371/journal.pone.0131532

**Editor:** Ramy K. Aziz, Cairo University, EGYPT

**Received:** March 6, 2015

**Accepted:** June 3, 2015

**Published:** June 26, 2015

**Copyright:** © 2015 Paiva et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All files are available from the Sequence Read Archive database (accession numbers: SRR 1801880 to SRR 1801935).

**Funding:** This work was supported by FAPEMIG CBB-APQ-01655-11, CNPq 480837/2011 and CNPq 472411/2012-8. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Abstract

Bacteria are assumed to efficiently remove organic pollutants from sewage in sewage treatment plants, where antibiotic-resistance genes can move between species via mobile genetic elements known as integrons. Nevertheless, few studies have addressed bacterial diversity and class 1 integron abundance in tropical sewage. Here, we describe the extant microbiota, using V6 tag sequencing, and quantify the class 1 integron-integrase gene (*intI1*) in raw sewage (RS) and activated sludge (AS). The analysis of 1,174,486 quality-filtered reads obtained from RS and AS samples revealed complex and distinct bacterial diversity in these samples. The RS sample, with 3,074 operational taxonomic units, exhibited the highest alpha-diversity indices. Among the 25 phyla, Proteobacteria, Bacteroidetes and Firmicutes represented 85% (AS) and 92% (RS) of all reads. Increased relative abundance of Micrococcales, Myxococcales, and Sphingobacteriales and reduced pathogen abundance were noted in AS. At the genus level, differences were observed for the dominant genera *Simplicispira* and *Diaphorobacter* (AS) as well as for *Enhydrobacter* (RS). The activated sludge process decreased (55%) the amount of bacteria harboring the *intI1* gene in the RS sample. Altogether, our results emphasize the importance of biological treatment for diminishing pathogenic bacteria and those bearing the *intI1* gene that arrive at a sewage treatment plant.

## Introduction

Although water is fundamental to life on earth and is considered a renewable and infinite resource, it is still limited. Wastage, environmental imbalances and water pollution due to domestic and industrial sewage threaten the availability of this natural resource, which is in

high demand. The contemporary world has contributed to environmental pollution by releasing large amounts of sewage into waterways, leading to human exposure and the contamination of several environments. In Brazil, approximately 8 billion liters of non-treated sewage is released into rivers each day from one hundred of the largest Brazilian cities [1]. This represents an environmental challenge because the discharge of untreated or improperly treated waste into waterways can introduce potentially pathogenic microorganisms to humans and change the indigenous microbial community, with ecological and public health implications [2]. Notably, the aquatic environment harbors different antibiotic resistance-associated mobile genes that are scattered among environmental bacteria [3]. As outlined in a review by Gillings *et al.* [4], class 1 integron-integrase is consistently linked to genes that confer resistance to antibiotics, disinfectants and heavy metals, is found in pathogenic and commensal bacterial species of humans and animals and is able to move between species. Wastewater discharge, manure disposal and aquaculture are the main sources of antibiotics in aquatic environments [5]. Previous studies have agreed that the microbiota of wild animals can acquire antibiotic resistance genes by consuming waste or drinking contaminated water [6, 7].

Efforts to treat sewage are occurring worldwide. Among these processes, aerobic biological treatment by activated sludge (AS) has been successfully applied and widely accepted for treating domestic sewage. This system represents an environmental protection and offers a low-cost and effective way to treat sewage [8], with the removal of over 90% of organic material [9, 10]. However, the efficacy of this treatment depends on a series of metabolic interactions among diverse microorganisms, mostly bacteria, that play a key role to remove organic and inorganic pollutants.

Many studies based on 16S rRNA gene analysis have described microbial groups found in anaerobic reactors and AS [11–13], but less is known regarding microbiota from raw sewage (RS) and the abundance of the class 1 integron-integrase gene (*intI1*) in this environment. Knowledge on this microbiota is important because it may identify bacteria that can harm human health. Additionally, the distribution of class 1 integrons from metagenomic samples, in contrast to culturable bacteria, remains under-explored. Thus, evaluating the abundance of class 1 integrons, which are often associated with multiresistant clinical pathogens, is important [14, 7]. To gain insight into this knowledge gap, we investigated the bacterial diversity of RS and AS of a full-scale activated sludge system using high-throughput sequencing. Moreover, we also investigated the abundance of the 16S rRNA and *intI1* genes in these environments using real-time PCR.

## Materials and Methods

### Ethics statement

For sampling in the Arrudas wastewater treatment plant, no specific permit was required for the described study area and we confirm that it did not involve endangered or protected species.

### Study area and sampling

The Arrudas wastewater treatment plant, Belo Horizonte, Brazil (19°53'42"S and 43°52'42"W) occupies an area of 63.84 ha, and treats the domestic sewage (2.25 m<sup>3</sup>/s design flow) generated by 1 million inhabitants using a conventional activated sludge process. Samples from sewage and wastewater treatment station represent a combination of inputs from human faecal microbes and enrichment of specific microbes from the environment to form a unique and stable population structure [15].

RS (10 L) and AS (2 L) samples were placed in sterilized bottles on 7 May 2013 and transported on ice to the laboratory within 2 h. The AS sample corresponded to a mixed liquid containing flocs and suspended bacteria from the aerobic zone of the aeration tank. The samples were then centrifuged at 14,000x g for 10 min, and the supernatants were discharged and the final pellets were stored at -20°C until further processing.

### DNA extraction and sequencing

Total DNA was extracted from 10 g of wet pellets stored at -20°C after thawing at room temperature, using the PowerSoil DNA Isolation Kit (Mbio Laboratories Inc., Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The quantity and quality of the total DNA were determined using a NanoDrop spectrophotometer (NanoDrop Technologies).

Partial amplification of the 16S rRNA gene was achieved using the primer set 985F (5'-CAA CGCGAAGAACCCTTAC C-3') and 1046R (5'-CGACAGCCATGCANACCT-3') [16], which corresponded to the V6 hypervariable region. Gene amplification and sequencing were performed at the Beijing Genomics Institute (BGI), using the 100 bp paired-end strategy on the Illumina HiSeq 2000 platform.

### Data analysis and taxonomic assignment

In this study, reads assembly, trimming and screening were carried out using Mothur v.1.32.0 [17]. Sequences with low quality ( $\leq 20$ ) or ambiguous bases and with more than eight homopolymers and a read length outside the range of 56–63 bp were discarded. Reads approved using these quality criteria were aligned and classified against a V6 region trimmed alignment that was based on the Silva v.119 16S rRNA database [18]. Chimeric reads were identified and excluded using the Uchime method [19], and mitochondrial and chloroplast reads and reads that did not match any reference sequence from the bacterial 16S rRNA database were discarded. Subsequently, the reads were grouped into operational taxonomic units (OTUs) by considering a genetic similarity of 95% using the average neighbor method. The samples were normalized to the lowest number of reads using the command `rarefy_even_depth` with the Phyloseq [20] package of the R software [21] to determine the alpha diversity indices. The nucleotide sequences were submitted to Sequence Read Archive (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/>) with the accession numbers of SRR 1801880 to SRR 1801935.

### Quantitative real-time PCR (qPCR)

For each RS and AS sample, we estimated the abundance of the bacterial 16S rRNA and *intI1* genes using an ABI PRISM 7900HT sequence detection system (Applied Biosystems, Foster City, CA). The primer sets 338F (5'-TACGGGAGGCAGCAG-3') [22] and 518R (5'-ATTACC GCGGCTGCTGG-3') [23] and qINT-3 (5'-TGCCGTGATCGAAATCCAGATCCT-3') and qINT-4 (5'-TTTCTGGAAGGCGAGCATCGTTTG-3') [24] were used to amplify the 16S rRNA and *intI1* genes, respectively. The amplification reaction conditions were described by Reis *et al.* [25] and Rosewarne *et al.* [24], respectively. Standard curves were generated using seven dilutions, in triplicate, of the 16S rRNA and *intI1* amplicons from the *Escherichia coli* ATCC 25922 ( $3.82 \times 10^{11}$  copies/ $\mu$ L) and *E. coli* BH100 strains ( $3.20 \times 10^{12}$  copies/ $\mu$ L). To determine the number of the 16S rRNA and *intI1* genes copies used as templates for the standard curves, the following online calculator was accessed: <http://www.uri.edu/research/gsc/resources/cndna.html> [26].

Each sample was run in triplicate, and a negative control was included for each analysis. The standard curves for the primer sets generated slopes of -3.19 and -3.27, respectively, and the  $R^2$  values were greater than 0.97 for both curves (S1 Fig). Bacterial qPCR exhibited Ct

values of 10.7 and 12.50 for RS and AS, respectively. In contrast, the Ct values obtained for *intI1* were 16.81 and 19.68 for RS and AS, respectively (S2 Fig). The proportion of bacterial cells harboring the *intI1* gene in each sample was estimated as previously described by Hardwick *et al.* [27].

## Results and Discussion

### Overview of the datasets and alpha diversity

Illumina-based V6 tag sequencing yielded 1,885,944 raw reads (943,000 in RS and 942,944 in AS, 339.47 Mb). The resultant clean reads (598,119 in RS and 587,243 in AS, with an average length of 61 bp) were used for downstream analysis. There were a total of 3,074 (RS) and 1,952 (AS) OTUs (S1 Table).

To estimate the relative diversity captured in each sample, the normalized libraries (with the lowest number of reads, 587,243) were used to calculate the cumulative relative frequency curve, OTU richness, Chao1 and ACE richness estimators, as well as the Shannon and Simpson diversity indices. Good's coverage values were similar in both samples (RS, 99.85%; AS, 99.9%). As illustrated in Fig 1, the bacterial communities from RS and AS were dominated by a few OTUs. The long tails of the taxon rank distribution curves indicated that the diversity in these environments mostly arose from rare taxa. Although both communities exhibited a high number of rare OTUs, the read distribution of dominant OTUs in each sample was relatively equitable, as shown by the high Simpson index values (RS, 0.93; AS, 0.95). Altogether, Good's coverage and the cumulative relative frequency curve suggested that most of the diversity was captured. The Shannon index (RS, 3.96; AS, 3.9) revealed considerable bacterial diversity in the

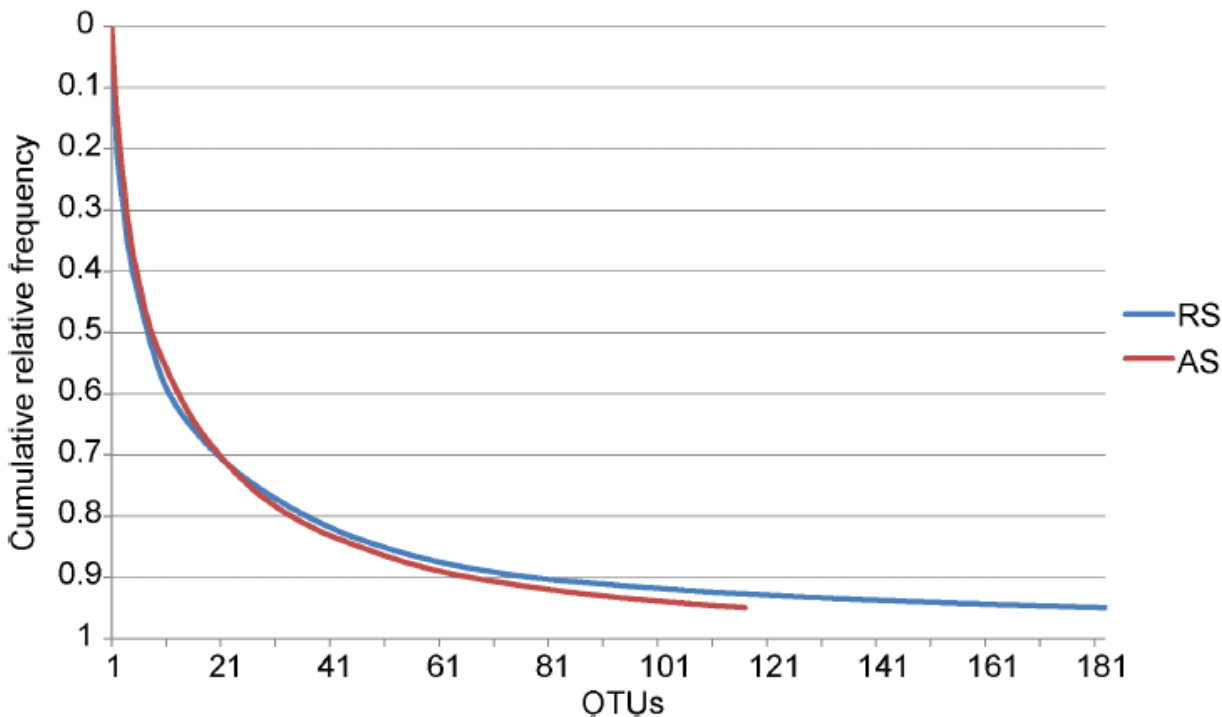


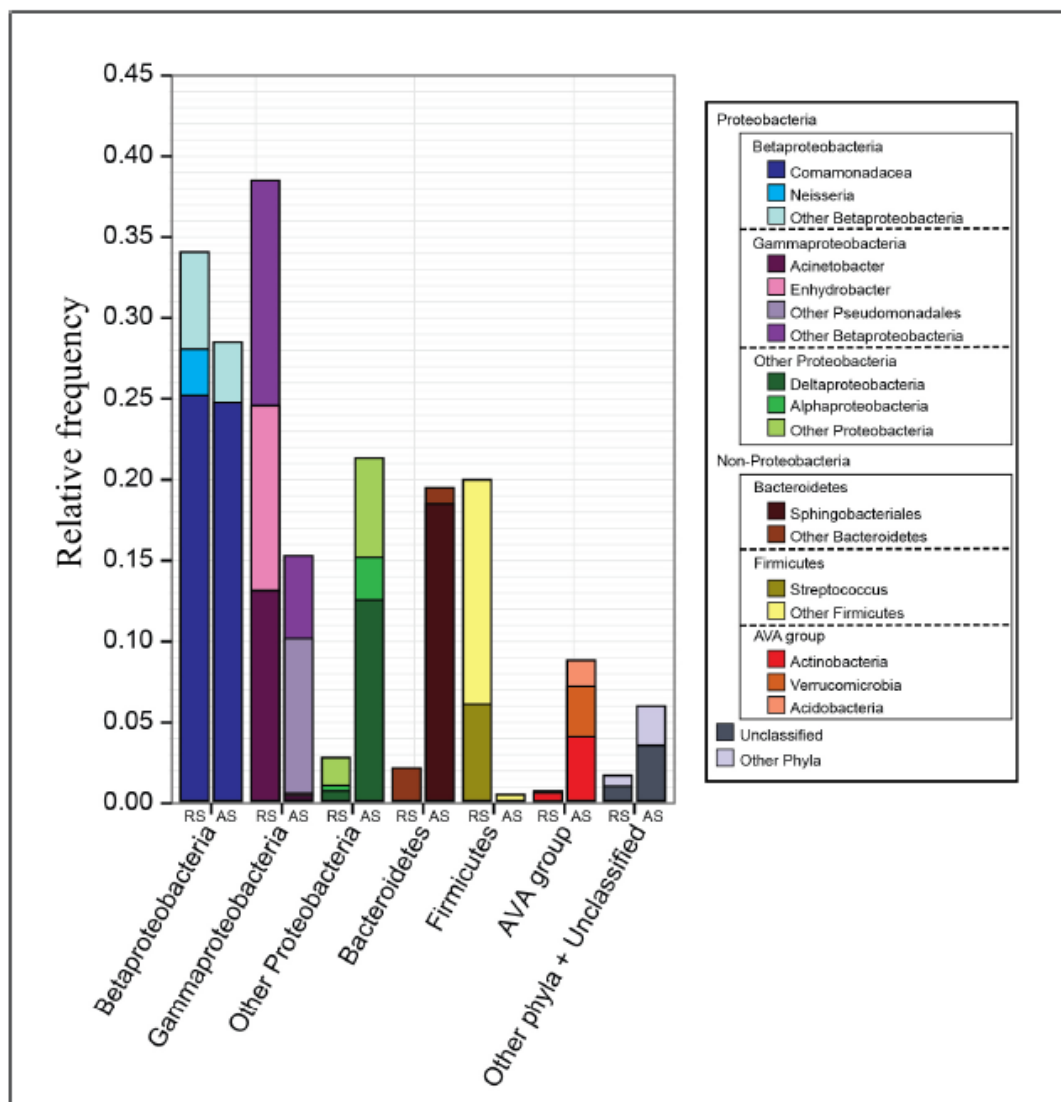
Fig 1. Cumulative relative frequency of the OTUs of raw sewage (RS) and activated sludge (AS).

doi:10.1371/journal.pone.0131532.g001

samples. Moreover, the Chao1 (RS, 3677.6; AS, 2346.2) and ACE (RS, 3843.4; AS, 2441.0) values also predicted higher bacterial diversity in the RS sample (S2 Table).

### Taxonomic composition

The taxonomic diversity profile by V6 tag sequencing is shown in Fig 2 and S3 Table. The 1,174,486 reads were affiliated with 25 bacterial phyla. Additionally, 1,025 OTUs were considered to be unclassified at the phylum level and thus might represent new bacterial taxa. Importantly, three phyla (Proteobacteria, Bacteroidetes and Firmicutes) accounted for 97% and 85% all of the reads in the RS and AS samples, respectively. Although the RS and AS samples revealed similar phylum-level representation, distinct distributions were observed. Previous



**Fig 2. Distribution of the community members in raw sewage (RS) and activated sludge (AS).** AVA group: Actinobacteria, Verrucomicrobia, Acidobacteria. Other phyla: BD1-5, Candidate\_division\_OD1, Candidate\_division\_OP11, Candidate\_division\_OP8, Candidate\_division\_TM7, Candidate\_division\_WS3, Candidate\_division\_WS6, Chlamydiae, Chlorobi, Cyanobacteria, Elusimicrobia, Fusobacteria, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Nitrospirae, SHA-109, Spirochaetae, Tenericutes.

doi:10.1371/journal.pone.0131532.g002

studies of microbial sewage and activated sludge communities also revealed a predominance of these phyla [8, 11, 15]; however, they showed a lower proportion of Proteobacteria (36%-65%) than that observed in our study. In contrast to our observations, Firmicutes was previously found in low abundance in the RS [8] and in high abundance in the AS [28]. Moreover, the abundance of Bacteroidetes ranged from 2.7% to 15.6% in activated sludge samples from 14 sewage treatment plants [11]. This difference between our data and those of previous studies can be due to differences in sewage composition because of climatic, geographical and population conditions [12, 29] as well as because of organic loading, pH, temperature, dissolved oxygen and sludge retention time applied in the aeration tank [12, 30].

The compositions of the bacterial communities were distinct and represented by broad intra-phylum diversity. A total of 147 (127 from RS and 113 from AS) families comprising 307 (282 from RS and 207 from AS) genera were identified in both environments. Proteobacteria, especially Beta- and Gammaproteobacteria, were the dominant community members (Fig 2). Comamonadaceae (12.6% from RS and 12.4% from AS) and Pseudomonadales (12.4% from RS and 4.9% from AS) were the predominant taxa in both samples, covering 42.2% of all reads. Betaproteobacteria constitute a major fraction of the microbial community in the activated sludge of domestic sewage treatment plants [31–33], suggesting that their physiological characteristics are functionally relevant for this ecosystem. Moreover, members of the Comamonadaceae family, which play an important role in nutrient removal, were among the most dominant taxa in wastewater treatment systems [15, 32]. Here, two dominant genera, *Simplicispira* and *Diaphorobacter*, were found in AS; these genera have been recovered from activated sludge systems and comprise denitrifying bacteria [34].

Within the Gammaproteobacteria class changes in the bacterial community composition between the samples were observed. Interestingly, considerable enrichment of an OTU (Otu00002) classified only at the Pseudomonadales order level was found in AS (Table 1). Thus, this taxon likely has an ecologically significant role in reducing environmental pollution in wastewater treatment plants. Moreover, the *Enhydrobacter* genus was overrepresented in the RS sample, but information on *Enhydrobacter* is scarce and comprises that of only one species (*Enhydrobacter aerosaccus*) [35] found in primary influent sewage samples [36].

The Alpha- and Deltaproteobacteria classes were found at very low abundances in RS (0.4% and 0.8%, respectively), whereas they were enriched in AS (2.9% and 12.7%, respectively). Among the 10 most abundant alpha- and deltaproteobacterial OTUs, the Caulobacteraceae family (Alphaproteobacteria) and the Myxococcales (Deltaproteobacteria) order were identified. The presence of *Caulobacter* species in AS is intriguing because these organisms are typically found in water and are considered to be oligotrophic (i.e., adapted to conditions with low nutrient availability) [37, 38]. Myxobacteria are known to be micropredators [39, 40] that are highly effective at degrading organic matter and are found in various habitats but mostly on decaying organic material [37].

The abundance of Firmicutes in AS was significantly lower (0.6%) than in RS (20%), whereas the abundance of Bacteroidetes was greater in AS (19%) than in RS (2%). Previous studies have suggested that Firmicutes species do not thrive in intense aeration conditions, e.g. in activated sludge [8, 41]. The majority of Bacteroidetes were represented by the Flavobacteriales (RS) and Sphingobacteriales (AS) orders, the latter of which are widely abundant in AS plants and metabolize macromolecules such as polysaccharides and proteins [42].

Actinobacteria, Acidobacteria and Verrucomicrobia were the minor phyla and were found mostly in the AS sample. Notably, however, three of the 30 top OTUs of all of the phyla were assigned to the Intrasporangiaceae family (Actinobacteria) and the *Geothrix* (Acidobacteria) and *Prostheco bacter* (Verrucomicrobia) genera. Interestingly, Intrasporangiaceae and *Geothrix* harbor species that accumulate polyphosphates [43] and that participate in the biogeochemical

Table 1. The top 21 OTUs classified in raw sewage (RS) and activated sludge (AS); (-) unclassified.

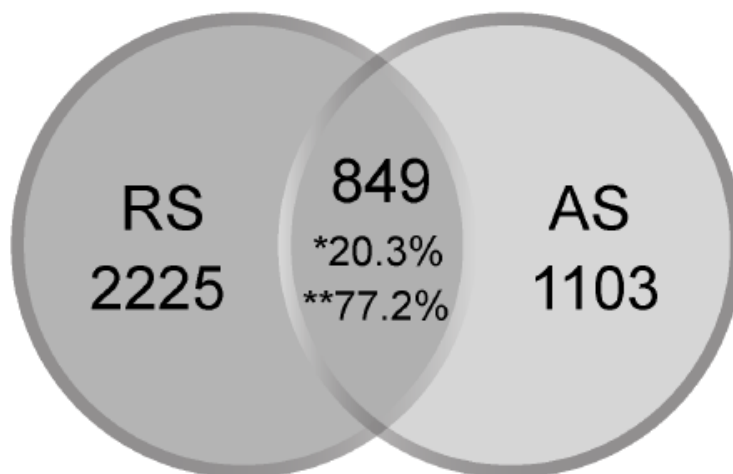
OTU	Phylum	Class	Order	Family	Genus	Number of reads RS	Number of reads AS
Otu00029	Acidobacteria	Holophagae	Holophagales	Holophagaceae	<i>Geothrix</i>	0	8025
Otu00024	Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Intrasporangiaceae		37	10356
Otu00006	Bacteroidetes	Sphingobacteriia	Sphingobacteriales	Chitinophagaceae		0	35350
Otu00013				NS11-12marine group		0	19713
Otu00021				Chitinophagaceae		0	11502
Otu00022		Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	<i>Cloacibacterium</i>	8849	1912
Otu00012	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	<i>Streptococcus</i>	21360	315
Otu00017						12806	106
Otu00001	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae		121196	84732
Otu00002		Gammaproteobacteria	Pseudomonadales			8	53118
Otu00003				Moraxellaceae	<i>Enhydrobacter</i>	45770	727
Otu00004		Deltaproteobacteria				0	46424
Otu00005		Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i>	40636	1607
Otu00007						30397	2027
Otu00008		Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae		2720	24761
Otu00009						5	23976
Otu00010		Gammaproteobacteria				20329	2325
Otu00011			Pseudomonadales	Moraxellaceae	<i>Enhydrobacter</i>	21462	257
Otu00014		Betaproteobacteria	Neisseriales	Neisseriaceae	<i>Neisseria</i>	16592	398
Otu00015		Gammaproteobacteria				16384	300
Otu00016		Deltaproteobacteria	Myxococcales	Polyangiaceae	<i>Sorangium</i>	0	14549

doi:10.1371/journal.pone.0131532.t001

recycling of metals [44], respectively. The genus *Prostheco bacter* has been recovered from activated sludge and can use algal metabolites as carbon and nutrient sources [45, 46].

Interestingly, we found a few pathogen-related OTUs. Among the top 21 OTUs classified at the genus level, *Neisseria*, *Acinetobacter* and *Streptococcus*, which are known to be harmful to humans, were detected (Table 1). Additionally, it should be noted that a significant reduction in the abundance of these potential pathogens in AS was observed, suggesting that the conditions of the activated sludge tank are unfavorable for pathogens. Pathogens that are a risk to public health have been previously identified in wastewater treatment plants. In particular, *Leptospira*, *Mycobacterium* and *Vibrio* have been frequently recovered from waste of wastewater treatment plants [12, 47]. Although enteric pathogens are consistently retrieved from sewage using culture-based approaches, OTUs related to *Escherichia-Shigella* were found at very low abundance (0.15% from RS and 0.001% from AS).

The core microbiota was determined using a Venn diagram (Fig 3). A total of 849 OTUs were shared by the two communities, resulting in an overlap of 20.3% of all OTUs. Common OTUs with more than 100 reads were assigned to the Proteobacteria (37 OTUs), Firmicutes (5 OTUs), Bacteroidetes (2 OTUs), Actinobacteria, and Fusobacteria (one OTU each) phyla, comprising 75.6% (RS) and 26.1% (AS) of the reads of these OTUs. Among the core community, the Comamonadaceae, Neisseriaceae, Rhodocyclaceae, Moraxellaceae, Xanthomonadaceae and Aeromonadaceae families were shared by the samples. Moreover, the *Acinetobacter*, *Neisseria*, *Enhydrobacter*, *Dechloromonas*, *Tolumonas* and *Candidatus Accumulibacter* genera were overrepresented in RS. In contrast, most OTUs were only detected in a particular bacterial community. These unique OTUs were largely dominant (72.3%) in relation to the total OTUs



**Fig 3. Venn diagram showing the exclusive and shared OTUs from raw sewage (RS) and activated sludge (AS).** \* % of all OTUs, \*\* % of all the reads.

doi:10.1371/journal.pone.0131532.g003

in the RS sample but were less important in relation to the relative abundance (2.5%, only 14,638 reads), which is in contrast to the AS sample (43.1%, 253,406 reads). Thus, changes in the community composition between these samples originated from rare OTUs, whereas the core microbiota included strikingly more abundant OTUs.

### Quantitative analysis of the bacterial communities and the *intI1* gene

Molecular tools such as quantitative PCR can effectively measure the amount of bacteria and specific genes, including non-dominant bacteria in various environmental samples [48]. In contrast to studies on environmental samples, many studies in clinical settings have investigated the abundance of class 1 integrons using metagenomic approaches. Sewage and wastewater treatment plants are considered significant sources of resistance genes and mobile elements [49–51]; therefore, these environments are hotspots for the environmental spread of antibiotic resistance mediated by class 1 integrons. Here, the 16S rRNA and *intI1* gene copy numbers of each sample were quantified using qPCR to estimate the proportion of bacteria harboring class 1 integrons.

The bacterial load in the AS sample was higher ( $2.64 \times 10^8$  copies/L) than that in the RS sample ( $1.23 \times 10^8$  copies/L). Moreover, the *intI1* gene copies number per L was  $6.54 \times 10^7$  in RS and  $6.3 \times 10^7$  in AS. Thus, the proportion of bacterial cells containing a class 1 integron differed between the samples (RS, 53%; AS, 24%); similar to the results of other studies [50, 52]. Consistent with previous findings [52], we also observed the high removal of bacteria carrying class 1 integrons (55%) after the activated sludge process, suggesting that this process is effective in removing bacteria containing class 1 integrons. Interestingly, an increase in the abundance of the *intI1* gene during the wastewater treatment process has been reported in some studies [53, 54]. The variation of results observed among studies may be attributed to selected bacterial taxa, the climatic and population conditions, occurrence of rain events before sampling as well as organic loading, pH, temperature, dissolved oxygen and sludge retention time applied in the aeration tank. This high removal was accompanied by a decrease in the relative abundance (61%) of Gammaproteobacteria in AS, which could be a consequence of this group's association with the *intI1* gene. Indeed, it has been suggested that class 1 integrons are broadly distributed throughout Proteobacteria [55].

Our study provides comprehensive insight into the complex bacterial community composition that is associated with sewage treatment plant influent and activated sludge. V6 tag sequencing uncovered not only the dominant taxa but many rare members. Despite the broad taxonomic diversity, only 22.8% of the detected reads were required to explain the differences in community structure between RS and AS. The RS and AS communities were dominated by several taxa that accounted for a large number of reads, and the groups that were found were consistent with those found in all wastewater treatment plant and sewage studies. However, the profiles of the potential pathogens greatly differed among these studies. Our results suggest that class 1 integrons are important outside of the context of Enterobacteriaceae.

## Supporting Information

**S1 Fig. Standard curves for the 16S rRNA (A) and *intI1* (B) genes.**  
(TIF)

**S2 Fig. The Ct values of the 16S rRNA (A) and *intI1* (B) genes.**  
(TIF)

**S1 Table. Summary of the dataset quality control from the raw sewage (RS) and activated sludge (AS) libraries.**  
(DOCX)

**S2 Table. General features of the raw sewage (RS) and activated sludge (AS) libraries.**  
(DOCX)

**S3 Table. Taxonomic affiliation of 16S rRNA gene OTUs based on Silva database.**  
(XLSX)

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MCP RMDN AMAN. Performed the experiments: MCP MPR PSC. Analyzed the data: MCP MPA MPR PSC RMDN AMAN. Contributed reagents/materials/analysis tools: RMDN AMAN. Wrote the paper: MCP MAP AMAN.

## References

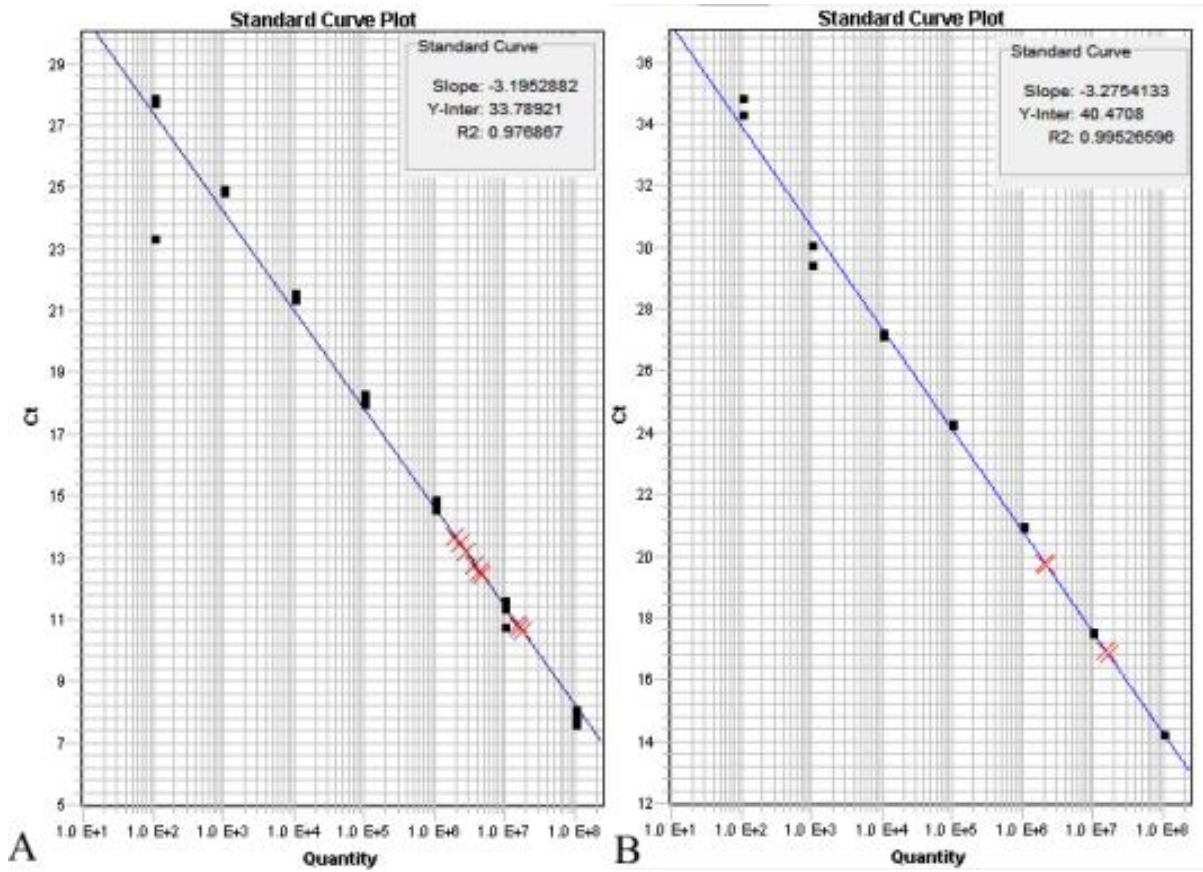
1. Serviço de saneamento básico é precário em todo o Brasil. *Jornal VC/ on line—Brasil*. 2012. Available: <http://www.tratabrasil.org.br/content/16/08/2012>.
2. Naidoo S, Olaniran AO. Treated wastewater effluent as a source of microbial pollution of surface water resources. *Int J Environ Res Publ Health*. 2014; 11: 249–270.
3. Hawkey PM, Jones AM. The changing epidemiology of resistance. *J Antimicrob Chemother*. 2009; 64: 3–10.
4. Gillings MR, Gaze WH, Prudent A, Smalla K, Tiedje JM, Zhu Y-G. Using the class 1 integron-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution. *ISME J*. 2014; 1–11.
5. Pruden A, Joakim Larsson DG, Amezquita A, Collignon P, Brandt KK, Graham DW, et al. Management options for reducing the release of antibiotics and antibiotic resistance genes to the environment. *Environ Health Persp*. 2013; 121: 878–885.
6. Poeta P, Radhouani H, Igrejas G, Gonçalves A, Carvalho C, Vinué L, et al. Seagulls of the Berlengas natural reserve of Portugal as carriers of fecal *Escherichia coli* harboring CTX-M and TEM extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Appl Environ Microbiol*. 2008; 74: 7439–7441. doi: [10.1128/AEM.00949-08](https://doi.org/10.1128/AEM.00949-08) PMID: [18835997](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18835997/)
7. Power ML, Emery S, Gillings MR. Into the wild: dissemination of antibiotic resistance determinants via a species recovery program. *PlosOne*. 2013; 8(5): e63017.
8. Hu M, Wang X, Wen X, Xia Y. Microbial community structures in different wastewater treatment plants as revealed by 454-pyrosequencing analysis. *Bioresour Technol*. 2012; 117: 72–79. doi: [10.1016/j.biortech.2012.04.061](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.04.061) PMID: [22609716](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22609716/)

9. Von Sperling M. Princípios do tratamento biológico de águas residuárias. In Princípios Básicos do Tratamento de Esgotos, 1st ed., Editora UFMG, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental—UFMG, Belo Horizonte, Brasil; 1996.
10. Ferreira FD, Coraiola M. Eficiência do lodo ativado em fluxo contínuo para tratamento de esgoto. *Revista Acadêmica Ciência Agrária e Ambiental*. 2008; 6: 259–279.
11. Zhang T, Shao MF, Ye L. 454 Pyrosequencing reveals bacterial diversity of activated sludge from 14 sewage treatment plants. *ISME J*. 2012; 6: 1137–1147. doi: [10.1038/ismej.2011.188](https://doi.org/10.1038/ismej.2011.188) PMID: [22170428](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22170428/)
12. Ye L, Zhang T. Bacterial communities in different sections of a municipal wastewater treatment plant revealed by 16S rDNA 454 pyrosequencing. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013; 97: 2681–2690. doi: [10.1007/s00253-012-4082-4](https://doi.org/10.1007/s00253-012-4082-4) PMID: [22555912](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22555912/)
13. Cardinali-rezende J, Araújo JC, Almeida PGS, Chernicharo CAL, Sanz JL, Nascimento AMA. Organic loading rate and food-to-microorganism ratio shape prokaryotic diversity in a demo-scale up-flow anaerobic sludge blanket reactor treating domestic wastewater. *A. Van Leeuw J Microb*. 2013; 104: 993–1003.
14. Gillings M, Boucher Y, Labbate M, Holmes A, Krishnan S, Holley M, et al. The evolution of class 1 integrons and the rise of antibiotic resistance. *J Bacteriol*. 2008; 190: 5095–5100. doi: [10.1128/JB.00152-08](https://doi.org/10.1128/JB.00152-08) PMID: [18487337](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18487337/)
15. McLellan SL, Huse SM, Mueller-Spitz SR, Andreishcheva EN, Sogin ML. Diversity and population structure of sewage-derived microorganisms in wastewater treatment plant influent. *Environ Microbiol*. 2010; 12: 378–392. doi: [10.1111/j.1462-2920.2009.02075.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02075.x) PMID: [19840106](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19840106/)
16. Zhou H-W, Li D-F, Tam NF-Y, Jiang X-T, Zhang H, Sheng H-F, et al. BIPES, a cost-effective high-throughput method for assessing microbial diversity. *ISME J*. 2011; 5: 741–749. doi: [10.1038/ismej.2010.160](https://doi.org/10.1038/ismej.2010.160) PMID: [20962877](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20962877/)
17. Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol*. 2009; 75: 7537–7541. doi: [10.1128/AEM.01541-09](https://doi.org/10.1128/AEM.01541-09) PMID: [19801464](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19801464/)
18. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res*. 2013; 41: 590–596.
19. Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*. 2011; 27: 2194–2200. doi: [10.1093/bioinformatics/btr381](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr381) PMID: [21700674](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21700674/)
20. McMurdie PJ, Holmes S. Basic storage, access, and manipulation of phylogenetic sequencing data with phyloseq. 2012. Available: <https://github.com/joey711/phyloseq>.
21. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing, 2012. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, Available: <http://www.R-project.org/>.
22. Raskin L, Stromley JM, Rittmann BE, Stahl DA. Group-specific 16S rRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens. *Appl Environ Microbiol*. 1994; 60: 1232–1240. PMID: [7517128](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7517128/)
23. Muyzer G, De Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial population by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S. *Appl Environ Microbiol*. 1993; 59: 695–700. PMID: [7683183](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7683183/)
24. Rosewarne CP, Pettigrove V, Stokes HW. Class 1 integrons in benthic bacterial communities: abundance, association with Tn402-like transposition modules and evidence for co-selection with heavy-metal resistance. *FEMS Microbiol Ecol*. 2010; 72: 35–46. doi: [10.1111/j.1574-6941.2009.00823.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00823.x) PMID: [20132306](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20132306/)
25. Reis MP, Barbosa FA, Chartone-Souza E, Nascimento AMA. The prokaryotic community of a historically mining-impacted tropical stream sediment is as diverse as that from a pristine stream sediment. *Extremophiles*. 2013; 17: 301–309. doi: [10.1007/s00792-013-0517-9](https://doi.org/10.1007/s00792-013-0517-9) PMID: [23389654](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23389654/)
26. Staroscik A. Calculator for determining the number of copies of a template. 2004. Available: <http://www.uri.edu/research/gsc/resources/cndna.html>.
27. Hardwick SA, Stoke HW, Findlay S, Taylor M, Gillings MR. Quantification of class 1 integron abundance in natural environments using real-time quantitative PCR. *FEMS Microbiol Lett*. 2008; 278: 207–212. PMID: [18042230](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18042230/)
28. Ye L, Shao MF, Zhang T, Tong AH, Lok S. Analysis of the bacterial community in a laboratory-scale nitrification reactor and a wastewater treatment plant by 454-pyrosequencing. *Water Res*. 2011; 45: 4390–4398. doi: [10.1016/j.watres.2011.05.028](https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.05.028) PMID: [21705039](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21705039/)
29. Metcalf E. Wastewater engineering treatment, disposal and reuse. 3rd ed., Mc Graw Hill, Nova York, USA, 1991.

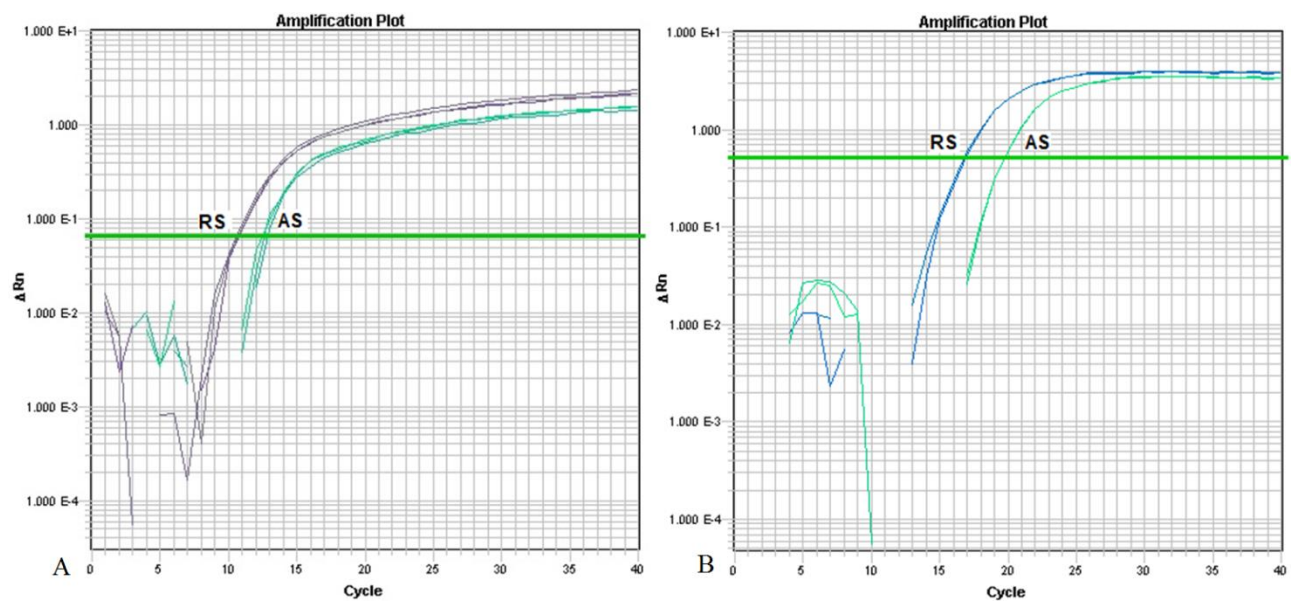
30. Yadav TC, Khardenavis A, Kapley AK. Shifts in microbial community in response to dissolved oxygen levels in activated sludge. *Bioresource Technol.* 2014; 165: 257–264.
31. Manz W, Wagner M, Amann R, Schleifer KH. In situ characterization of the microbial consortia active in two wastewater treatment plants. *Water Res.* 1994; 28: 1715–1723.
32. Snaidr J, Amann R, Huber I, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic analysis and in situ identification of bacteria in activated sludge. *App Environ Microb.* 1997; 63: 2884–2896.
33. Wagner M, Loy A. Bacterial community composition and function in sewage treatment systems. *Curr Opin Biotech.* 2002; 13: 218–227. PMID: [12180096](#)
34. Tabrez Khan S, Hiraish A. *Diaphorobacter nitroreducens* gen.nov. sp. nov. a poly(3-hydroxybutyrate)-degrading denitrifying bacterium isolated from activated sludge. *J Gen Appl Microbiol.* 2002; 48: 299–308. PMID: [12682868](#)
35. Staley JT, Irgens RL, Brenner DJ *Enhydrobacter aerosaccus* gen. nov., sp. nov. a gas-vacuolated, facultatively anaerobic, heterotrophic rod. *Int J Syst Bacteriol.* 1987; 37: 289–291.
36. Shanks OC, Newton RJ, Kelly CA, Huse SM, Sogin ML, McLellan SL. Comparison of the microbial community structures of untreated wastewaters from different geographic locales. *App Environ Microb.* 2013; 79: 2906–2913.
37. Corpe WA, Jensen TE. The diversity of bacteria, eukaryotic cells and viroses in an oligotrophic lake. *Appl Microbiol Biot.* 1996; 46: 622–630.
38. Pang CM, Liu W- T. Biological filtration limits carbon availability and affects downstream biofilm formation and community structure. *App Environ Microb.* 2006; 72: 5702–5712.
39. Shinkets LJ, Dworkin M, Reichenbach H. The myxobacteria. In: *The Prokaryotes: a Handbook on the Biology of Bacteria*, 3rd ed., Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K. H. & Stackebrandt E. New York, USA, Springer. 2006; 7: 31–115.
40. Osaka T, Ebie Y, Tsuneda S, Inamori Y. Identification of the bacterial community involved in methane-dependent denitrification in activated sludge using DNA stable-isotope probing. *FEMS Microbiol Ecol.* 2008; 64: 494–506. doi: [10.1111/j.1574-6941.2008.00473.x](#) PMID: [18459970](#)
41. Wilen BM, Onuki M, Hermansson M, Lumley D, Mino T. Microbial community structure in activated sludge floc analysed by fluorescence in situ hybridization and its relation to floc stability. *Water Res.* 2008; 42: 2300–2308. doi: [10.1016/j.watres.2007.12.013](#) PMID: [18206208](#)
42. Kirchman DL. The ecology of *Cytophaga-Flavobacteria* in aquatic environments. *FEMS Microbiol Ecol.* 2002; 39: 91–100. doi: [10.1111/j.1574-6941.2002.tb00910.x](#) PMID: [19709188](#)
43. Nielsen PH, Saunders AM, Hansen AA, Larsen P, Nielsen JL. Microbial communities involved in enhanced biological phosphorus removal from wastewater—a model system in environmental biotechnology. *Curr Opin Biotech.* 2012; 23: 452–459. doi: [10.1016/j.copbio.2011.11.027](#) PMID: [22197171](#)
44. Mehta-Kolte MG, Bond DR. *Geothrix fermentans* secretes two different redox-active compounds to utilize electron acceptors across a wide range of redox potentials. *App Environ Microb.* 2012; 78: 6987–6995.
45. Shimizu Y. Microalgal metabolites: a new perspective. *Annu Rev Microbiol.* 1996; 50: 431–465. PMID: [8905087](#)
46. Molina Grima E, Belarbi E-H, Acien Fernandez FG. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnol Adv.* 2003; 20: 491–515. PMID: [14550018](#)
47. Cai L, Zhang T. Detecting human bacterial pathogens in wastewater treatment plants by a high-throughput shotgun sequencing technique. *Environ Sci Technol.* 2013; 47: 5433–5441. doi: [10.1021/es400275r](#) PMID: [23594284](#)
48. Wéry N, Lhoutellier C, Ducray F, Delgenés JP, Godon JJ. Behaviour of pathogenic and indicator bacteria during urban wastewater treatment and sludge composting, as revealed by quantitative PCR. *Water Res.* 2008; 42: 53–62. PMID: [17659319](#)
49. Tennstedt T, Szczepanowski R, Braun S, Pühler A, Schlüter A. Occurrence of integron-associated resistance gene cassettes located on antibiotic resistance plasmids isolated from a wastewater treatment plant. *FEMS Microbiol Ecol.* 2003; 45: 239–252. doi: [10.1016/S0168-6496\(03\)00164-8](#) PMID: [19719593](#)
50. Zhang X-X, Zhang T, Zhang M, Fang HHP, Cheng S-P. Characterization and quantification of class 1 integrons and associated gene cassettes in sewage treatment plants. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2009; 82: 1169–1177. doi: [10.1007/s00253-009-1886-y](#) PMID: [19224208](#)
51. Pellegrini C, Celenza G, Segatore B, Bellio P, Setacci D, Amicosante G, et al. Occurrence of class 1 and 2 integrons in resistant enterobacteriaceae collected from a urban wastewater treatment plant: first report from central Italy. *Microb Drug Resist.* 2011; 17: 229–234. doi: [10.1089/mdr.2010.0117](#) PMID: [21268680](#)

52. Ma L, Zhang X-X, Zhao F, Wu B, Cheng S, Yang L. Sewage treatment plant serves as a hot-spot reservoir of integrons and gene cassettes. *J Environ Biol.* 2013; 34: 391–399. PMID: [24620610](#)
53. Stalder T, Barraud O, Jove T, Casellas M, Gaschet M, Dagot C, et al. Quantitative and qualitative impact of hospital effluent on dissemination of the integron pool. *ISME J.* 2014; 8: 768–777. doi: [10.1038/ismej.2013.189](#) PMID: [24152716](#)
54. LaPara TM, Burch TR, McNamara PJ, Tan DT, Yan M, Eichmillers JJ. Tertiary-Treated Municipal Wastewater is a Significant Point Source of Antibiotic Resistance Genes into Duluth-Superior Harbor. *Environ Sci Technol.* 2011, 45: 9543–9549. doi: [10.1021/es202775r](#) PMID: [21981654](#)
55. Stokes HW, Gillings MR. Gene flow, mobile genetic elements and the recruitment of antibiotic resistance genes into Gram negative pathogens. *FEMS Microbiol Rev.* 2011; 35: 790–819. doi: [10.1111/j.1574-6976.2011.00273.x](#) PMID: [21517914](#)

Supplementary Figure 1. Standard curves for the 16S rRNA (A) and intI1 (B) genes.



Supplementary Figure 2. The Ct values of the 16S rRNA (A) and intI1 (B) genes.



**Supplementary Table 1. Summary of the dataset quality control from the raw sewage (RS) and activated sludge (AS) libraries.**

<b>Workflow</b>	<b>RS</b>	<b>AS</b>
*Raw reads	943,000	942,944
*Resulting reads after a quality cutoff of $\leq 20$	609,989	616,346
Contigs	607,164	611,547
Resulting reads after removal of homopolymers, ambiguous bases and length outside the range of $\leq 56$ and $\geq 63$ bp	601,585	595,642
Resulting reads after aligning	598,172	587,300
Resulting reads after removal of chimera, mitochondria and chloroplast and those outside the Bacteria domain	598,119	587,243

\*These steps were performed by BGI.

**Supplementary Table 2. General features of the Raw Sewage (RS) and Activated Sludge (AS) libraries.**

<b>Sample</b>	<b>OTUs</b>	<b>Chao1</b>	<b>ACE</b>	<b>Shanno n Index</b>	<b>Simpso n Index</b>	<b>Good's coverage</b>
<b>RS</b>	3,074	3677.6	3843.4	3.96	0.93	99.85%
<b>AS</b>	1,952	2346.2	2441.0	3.9	0.95	99.9%

## **5 - Capítulo II**

**WWTP: a source of new bacteria harboring *qnrS*, *aac(6')Ib* and its *cr* variant, and mutations possibly involved in quinolone resistance**

Magna C. Paiva<sup>1,2</sup>, Mariana P. Reis<sup>3</sup>, Patrícia S. Costa<sup>3</sup>, Lucas Bleicher<sup>4</sup>, Larissa L. S. Scholte<sup>5</sup>; Regina M. D. Nardi<sup>1</sup>, Andréa M. A. Nascimento<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais; Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

<sup>2</sup>Campus Dona Lindu, Universidade Federal de São João del Rei, Divinópolis, Minas Gerais, Brazil.

<sup>3</sup>Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais; Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

<sup>4</sup>Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais; Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

<sup>5</sup>Centro de Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ; Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

\*Corresponding author

E-mail address: amaral@ufmg.br (AMAN)

Keywords: metagenome, culture, quinolone, *qnrS*, *aac(6')Ib*, *aac(6')Ib-cr*, raw sewage, activated sludge

# Abstract

Wastewater treatment plants (WWTPs) are important since harbor environmental commensal and pathogenic bacteria and favor to gene exchange. Here survey of *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* and *aac(6')Ib* genes from raw sewage (RS) and activated sludge (AS) of a full-scale municipal WWTP was performed. To do this, we applied culture-based and metagenomic approaches. A total of 96 nalidixic acid-resistant bacteria were recovered from the enrichment cultures. Overall, enterobacterial isolates from RS showed greater resistance to quinolones and aminoglycosides. Bacteria harboring the *aac(6')Ib* gene predominated in RS, whereas *qnrS*-positive those were specific from AS. Importantly, we identified novel *qnrS*- and *aac(6')Ib-cr* positive species, *Morganella morganii*, *Providencia rettgeri* and *Pseudomonas guangdongensis* (*qnrS*), and *Alcaligene faecalis* and *P. rettgeri* (*aac(6')Ib-cr*). Analysis of *qnrS* and *aac(6')Ib* sequences from isolates and clone libraries suggested that the diversity of *qnrS* is wider than *aac(6')Ib*. A large number of amino acids mutations was observed in QnrS and Aac(6')Ib proteins, including many previously undetected positions, whose structural implication is not straightforward. It underlines, an accumulation of mutations at the C72, Q73, L74, A75 and M76 in loop B of QnrS, and D181 of Aac(6')Ib, regions important for resistance. These findings add significant new information on bacteria harboring *qnrS* and *aac(6')Ib* genes, and novel mutations that may eventually emerge in clinical isolates.

# Introduction

Antibiotic resistance constitutes one of the current major challenges to humanity, since it negatively impacts the therapeutic treatment, and accordingly can lead to widespread of resistance gene. In the last decades, fewer new antibiotics have been approved making this situation graver. Increasing evidence is continuously bringing to light the importance of environmental and nonpathogenic bacteria harboring antibiotic resistance genes, making these organisms potential reservoirs to exchange antibiotic resistance gene with pathogenic bacteria (Marti et al.; 2013; Novo et al., 2013).

Since the advent of next generation sequencing, genome and metagenome studies have provided a comprehensive picture of antibiotic resistance genes diversity in a variety of environmental samples and organisms, including soil (Forsberg et al., 2012), freshwater (Devarajan et al., 2015), ocean (Hatosy & Martiny, 2015) wastewater treatment plants (WWTPs) (Mori et al., 2008; Parsley et al., 2010), human and animal gut (Cheng et al., 2012, Rolain et al., 2013). Some these studies have given particular attention for WWTPs. Indeed, WWTPs represent one of the most impacted environments by human activities, receiving wastewater from different origins such as of municipal, industrial, animal farming and clinical. It highlights the considerable input of antibiotics into the environment via wastewater, which cannot be completely removed by treatments systems of WWTP. Thereby, it compromises the quality of water and of the ecosystem (Dorival-Garcia et al., 2013; Devarajan et al., 2015). Indeed, antibiotic resistance genes have been referred to as emerging pollutants (Woegerbauer et al., 2015). Taken together, WWTPs have been considered a hotspot for resistance gene transfer between bacteria, contributing to the occurrence, maintenance and spread of these genes (Miao et al., 2004; Moura et al., 2012; Marti et al., 2014).

Quinolones are biorecalcitrant compounds that cannot be completely removed during wastewater treatment, and have been detected in the  $\mu\text{g/L}$  range in municipal sewage and in WWTPs (Dorival-Garcia et al., 2013; Van Doorslaer et al., 2014). DNA gyrase and topoisomerase IV are target of quinolone action, that are widely used in human and animal therapeutics. Originally, quinolone resistance was attributed to mutations in chromosomal genes encoding DNA gyrase and topoisomerase IV or in regulatory genes of expression of efflux pumps and porins (Ruiz, 2012; Hooper & Jacoby, 2015). However, since 1998 plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) *qnr*, *aac(6')Ib-cr*, *qepA* and *oqxAB* genes has been described from clinical and natural environments, including WWTP (Martinez-Martinez et al., 1998; Adachi et al., 2013; Marti et al, 2014). Thus, presently, quinolone is recognized an emerging environmental micropollutant (Van Doorslaer et al. 2014).

Quinolone resistance (Qnr) proteins, belonging to the pentapeptide repeat family, protect DNA gyrase and topoisomerase IV from quinolone inhibition. The complete mechanism of action of these proteins is not clear, however, studies of *qnr* alleles with site-directed mutation in loop A and loop B structures have been conducted, suggesting that the loop B is essential for interaction with gyrase (Rodriguez-Martinez, 2009, Távio et al., 2014). Studies on structural diversity of the Aac(6')Ib (resistance to aminoglycosides) and *cr* variant (resistance to aminoglycosides and fluoroquinolones) proteins, suggest that amino acid changes in the conserved motif A of the protein has a key role in cofactor acetyl-CoA binding, may compromise its function (Shmara et al., 2001; Pourreza et al., 2005).

In this study we sought to gain insight into the occurrence and diversity of quinolone resistance genes from sewage and activated sludge, using culture-based and metagenomic strategies. This included the plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* and *aac(6')Ib-cr* genes. We also taxonomically identified quinolone-resistant bacteria from nalidixic acid-enrichment culture of sewage and activated sludge. Besides, we explored

the impact of mutations on the Qnr and Aac(6')Ib structure, using structural analysis, in an attempt to assess the relationship between amino acid changes and activity of these proteins.

## **Materials and Methods**

### **Sample collection**

Raw sewage (RS) and of activated sludge (AS) samples for molecular and microbiological analyses were collected from Arrudas municipal wastewater treatment plant, Belo Horizonte, Brazil (19°53'42"S and 43°52'42"W) on 17 May 2013. The procedure of sample collection was earlier described by Paiva et al. (2015).

### **Enrichment cultures and bacterial isolation**

Enrichment cultures were established by blending 2 g of the pellet separate RS and AS samples into 100 mL of Luria Bertrani broth containing 100 µg/ mL of nalidixic acid (Sigma) and incubated at 37 °C with agitation (200 rpm) for 24 h. At the end of this period, the nalidixic acid -enrichment cultures were serially diluted in sterile saline and plated on nutrient agar (Difco). The plates were incubated at 37°C for 24 h. The resulting colonies, with different morphologies (size, shape, surface, color, and texture), were repeatedly streaked on the same medium to accomplish their purification, prior to subsequent molecular and phenotypic analyses. According to the Poirel et al. (2012) bacteria harboring PMQR determinants are a favorable background for selection of higher-level quinolone resistance chromosome-encoded. Thus, the concentration of nalidixic acid chosen favored the pick PMQR-positive bacteria.

## **Susceptibility testing**

Minimum inhibitory concentrations (MICs) of quinolones – nalidixic acid (NAL), ciprofloxacin (CIP), ofloxacin (OFX), norfloxacin (NOR) and levofloxacin (LVX) (Sigma-Aldrich) and aminoglycosides – kanamycin (KAN), gentamicin (GEN), amikacin (AMI) and streptomycin (STR) (Sigma-Aldrich) against all the isolates were determined. The assays were performed and interpreted according to the Clinical Laboratory Standards Institute's (CLSI) instructions (2014). However, interpretative breakpoints are defined for Enterobacteriaceae (except STR) and *Enterococcus gallinarum* (only NOR, CIP and LVX). Enterobacteriaceae isolates resistant to more than three antimicrobials were considered as multiresistant. The concentrations of quinolones and aminoglycosides inhibiting 50% and 90% of bacterial isolates, MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub>, respectively, were calculated for each antimicrobial according to the Smith et al. (1986).

## **DNA extraction**

Genomic DNA was extracted from NAL-resistant isolates, using a protocol previously described by Pérez-Pérez & Hanson (2002). Moreover, metagenomic DNA was extracted from 10 g of RS and AS pellets using the PowerSoil DNA Extraction Kit (MO BIO Laboratories, USA) according to the manufacturer's instructions. The quantity and quality of the total DNA were determined using a NanoDrop spectrophotometer (NanoDrop Technologies). DNA was stored at -20°C until further processing.

## **Taxonomic assignment**

The bacterial isolates were initially identified using an automated VITEK 2 microbial identification system, version 04.02 (bioMérieux) following the manufacturer's instructions. Nevertheless, for those isolates that had an inaccurate taxonomic assignment by VITEK 2

system, the identification was done using the 16S rRNA gene. For this, the 16S rRNA genes fragments were amplified by touchdown PCR according to the Freitas et al. (2008) using the bacterial-targeted primer set 8F (5'-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3') and 907R (5'-CCGTCAATTCMTTTRAGT-3').

The isolates of *E.coli* were classified in phylogenetic groups (A, B1, B2 and D) by triplex PCR method, using primers ChuA.1, ChuA.2, YjaA.1, YjaA.2, TspE4C2.1 and TspE4C2.2, and conditions as described by Clermont et al. (2000).

## **PCR amplification and construction of clone libraries**

Genomic and metagenomic DNA were used as template for PCR using the *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* and *aac(6')-Ib* genes primer set and conditions as previously described by Park et al. (2006) and Robicsek et al. (2006), for genotypic characterization of the NAL-resistant isolates and construction of clone libraries. All PCR steps included negative and positive controls: *qnrB*, *qnrS*, *aac(6')Ib-cr* (*E.coli* 34, 26 and 7, respectively, Paiva et al. 2012) and *qnrA*-positive *E. coli* (Minarini et al., 2008). Triplicate PCR amplifications were performed for each sample, pooled PCR products were gel purified using the QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen, Germany). PCR products were cloned into the vector pJET1.2/blunt (Fermentas, Canada), according to the manufacturer's instructions, and transformed into electrocompetent *E. coli* DH-5 $\alpha$  (Phoneutria, Brazil).

## **Sequencing and phylogenetic analysis**

The 16S rRNA, *qnrS* and *aac(6')-Ib* genes were sequenced with using ABI Prism 3130 (Life Technologies, USA) according to the manufacturer's instructions. The sequences obtained were assembled using Linux programs Phred/Phrap/Consed (<http://www.phrap.org/phredphrapconsed.html>) and chimeric sequences were identified using Bellerophon (<http://comp-bio.anu.edu.au/bellerophon/bellerophon.pl>).

The 16S rRNA gene sequences were compared with available database using the BLASTn search tool from GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) to identify the closest relatives of the sequences. Phylogenetic relationships were inferred with the neighbor-joining algorithm (Saitou & Nei, 1987) using the ARB (version 5.3) software package and SSU Ref 115 SILVA sequence database (Ludwig et al., 2004; Pruesse et al., 2007).

The *qnrS* and *aac(6')-Ib* genes sequences were compared with those available at the GenBank databases using blastn and blastx tools (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) to retrieve potential homologs. The operational taxonomic unities (OTUs) from quinolones resistance genes clone libraries were defined with DOTUR software (Schloss & Handelsman, 2005), using a cut-off threshold of  $\geq 95\%$  identity. Coverage of the clone libraries was calculated using the equation  $C = 1 - (n / N) \times 100$ , where n is the number of unique OTUs and N is the number of sequences analyzed in the library (Good, 1953).

To reconstruct the phylogenetic tree we used the maximum likelihood method (ML), as implemented in PhyML (Guindon et al., 2010). For the phylogenetic reconstruction we tested seven different evolutionary models (HKY85, JC69, K80, F81, F84, TN93, and GTR) using the jModelTest 2 software (Darriba et al., 2012). The evolutionary model best fitting the data was determined by comparing the likelihood of tested models according to the Akaike Information Criterion (AIC). Statistical support value for each node was computed by approximate likelihood ratio test (aLRT). Trees were visualized and edited using the FigTree software ([tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree](http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree)).

All the nucleotide sequences generated were quality checked and deposited to GenBank with accession numbers from XXX.

## **QnrS e Aac(6')Ib analysis**

The sequences of QnrS and Aac(6')Ib were analyzed using alignment by Clustal W and software MEGA 6 (<http://www.megasoftware.net>) to identify putative amino acid

changes with respect to the wild-type protein sequences. The Aac(6')Ib sequences obtained were analyzed in comparison with the sequences of aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase type Ib (GenBank accession number AAL 93141.1) and aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase Ib-cr (GenBank accession number HG799662.1). For QnrS the following references sequences were used: QnrS1 (GenBank accession number AB187515), QnrS2 (GenBank accession number DQ485530), QnrS3 (GenBank accession number EU077611), QnrS4 (GenBank accession number FJ418153), QnrS5 (GenBank accession number HQ631377), QnrS6 (GenBank accession number HQ631376), QnrS7 (GenBank accession number KF730651), QnrS8 (GenBank accession number KF730652) and QnrS9 (GenBank accession number KF732714).

Mutation sites were mapped in the structure of Aac(6')-Ib as bound to acetyl coenzyme A and kanamycin (Vetting et al., 2008) (PDB code: 1V0C). AREAIMOL (Saff, 1997) from the CCP4 package (Winn et al., 2011) was used for the calculation of residue solvent accessible areas (Lee, 1971). A computational model of QnrS (Uniprot: Q5H7L5) was obtained by homology modeling using Modeller (Sali, 1993). The structure from *Aeromonas hydrophila* Qnr (PDB code: 3PSS), which presents 42% identity to the sequence to be modeled, was used as the template in its dimeric form. One thousand models were generated, of which the lowest energy model was assessed for stereochemical validation, and presented no residues in disallowed regions in a Ramachandran plot.

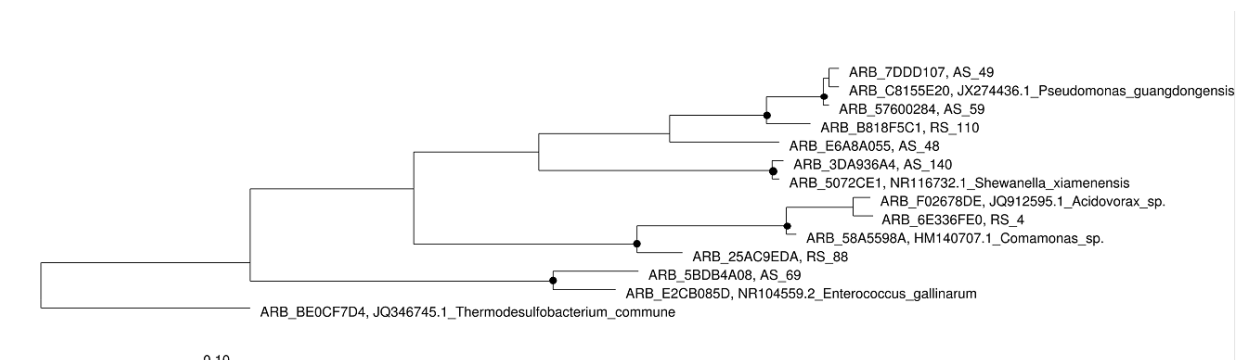
## **Statistical analysis**

Statistical analyses were conducted using the GraphPad software (QuickCalcs program) available in <http://graphpad.com/quickcalcs/contingency1.cfm>. Pairwise comparisons were conducted using the Fisher's exact test. Compared values were considered statistically significant when  $p$  values were less than 0.05.

# Results and Discussion

## Recovery of isolates and their taxonomic assignment

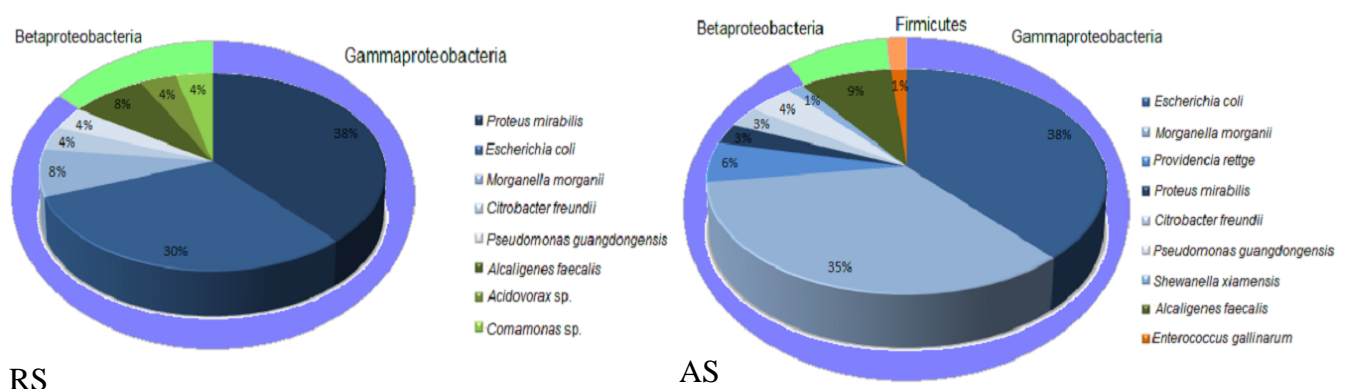
A total of 96 bacterial isolates (26 in RS and 70 in AS) with different morphological properties were obtained from NAL-enrichment cultures and taxonomically identified (Tables S1 and S2). Eighty-eight out of 96 isolates identified at the species level by VITEK 2, belonged to members of Enterobacteriaceae (80) and *Alcaligenes faecalis* (8). The remaining isolates that could not be assigned at any taxonomic level (at a confidence level lesser than 90%) by VITEK 2 were identified using the 16S rRNA gene. According to the 16S rRNA gene phylogenetic tree the isolates were closely related to *Pseudomonas guangdongensis*, *Acidovorax* sp., *Comamonas* sp., *Shewanella xiamenensis* and *Enterococcus gallinarum* (Fig. 1).



**Fig. 1. Neighbor-joining tree of bacterial isolates recovered from NAL-enrichment cultures of Raw Sewage (RS) and Activated Sludge (AS) based on the partial 16S rRNA. Nodes with a bootstrap value greater than 0.65 are indicated by closed circles.**

Overall, the taxonomic assignment of the isolates demonstrated that both samples had similar communities of cultivable heterotrophic bacteria. As observed in Figure 2, gammaproteobacterial isolates predominated in both samples, and betaproteobacterial were more represented in RS. As expected, most of gammaproteobacterial isolates fit into the family Enterobacteriaceae (80.8% in RS and 84.2% in AS), which are often retrieved from WWTPs (Ferreira da Silva et al. 2007; Kaplan et al., 2013). It is worth noting that *Proteus mirabilis*,

*Escherichia coli* and *Morganella morganii*, common in human and animal stool and potential pathogens (Rajilic-Stojanovi & Vos, 2014), comprised 76% of all the isolates. The abundance of *E. coli* was similar in both environments (30.7% in RS and 38.2% in AS), but *P. mirabilis* and *M. morganii* were over-represented in RS and AS, respectively. *Citrobacter freundii* were found in RS and AS and have been detected in aquatic environments, such as freshwater (Lima-Bittencourt et al., 2007; Zhang et al., 2009) and sludge of sewage (Thompson et al., 2008). Other taxa as *Providencia rettgeri* and *Shewanella xiamenensis* were exclusively observed in AS. *Klebsiella* spp. and *Shigella* spp. were absent from our samples, although they have been observed in WWTP, such as dewatered sludge (Kaplan et al., 2013) and at the discharge point of receiving river (Marti et al., 2014). Similar to findings from other studies (Willens et al., 1990; Joo et al., 2007, Silva et al., 2012), betaproteobacterial genera commonly detected in WWTPs included: *Acidovorax*, *Comamonas* and *Alcaligenes faecalis*, whose members have denitrification abilities (Joo et al., 2007), were the most abundant isolates. A single isolate from NAL-enrichment culture of AS was classified into Firmicutes (*Enterococcus gallinarum*). *Enterococcus* species are found in gastrointestinal tract of humans, animals and insects, and have been detected in sewage sludge samples from WWTPs (Sahlström et al., 2009). However oligotrophic conditions and sunlight may compromise their survival in environment such as water or sediment (Byappanahalli et al., 2012



**Fig. 2. Taxonomic distribution of bacterial isolates recovered from NAL-enrichment cultures of Raw Sewage (RS) and Activated Sludge (AS).**

## **Phylogenetic typing of *E. coli***

*E. coli* is found in vertebrate gut and in a variety of environments, such as aquatic, where it is used as an indicator of faecal contamination (Carlos et al., 2010). However, there are serotypes of *E. coli* with distinct virulence characteristics, being well-recognized as a human and animal pathogen (Clermont et al., 2011). Given that and considering the predominance of *E. coli* isolates in both samples, we thought be important to analyze the relationships of these isolates with their phylogenetic groups. Thus, we classified the *E. coli* isolates according to the four major phylogenetic groups (A, B1, B2 and D) (Clermont et al., 2000), in which commensal strains preferentially fell into the phylogenetic groups A and B1, whereas extraintestinal strains are frequently found in the phylogenetic groups B2 and D (Johnson et al., 2001; Walk et al., 2007). Most *E. coli* isolates were associated with the groups A and B1 (Tables S1 and S2). These groups are frequent in aquatic environments (Orsi et al., 2008, Mokracka et al., 2011, Jang et al. 2014). However, our findings are in disagreement with Jang et al. (2014), who suggested more persistence of the group B1 in aquatic environment exposed to human activities. Other groups B2 and D were mostly encountered in isolates from RS and AS, respectively. *E. coli* from phylogenetic groups B2 and D are more virulents and can cause extraintestinal infections at various sites of the human body (Gordon et al., 2004; Jang et al., 2014). This finding warns a possible entry of these species in waterways, constituting a risk to human and animal health. Moreover, antimicrobial resistance patterns were found to be phylogenetically unrelated.

## Quinolone and aminoglycoside susceptibility

MICs for several quinolones and aminoglycosides were determined for isolates retrieved from NAL-enrichment cultures of RS and AS. The MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> distributions and MICs range for these isolates are given in Table 1 and Tables S1 and S2.

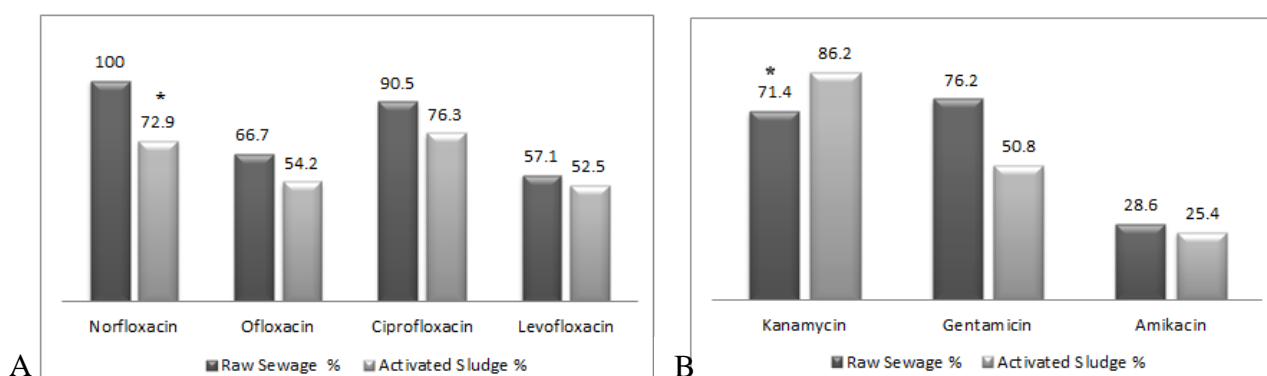
According to the breakpoints for Enterobacteriaceae (CLSI, 2014) the proportion of quinolone- and aminoglycoside- resistant bacteria ranged from 52.5% to 100% and 25.4% and 81%, respectively. All Enterobacteriaceae isolates exhibited high level resistance to NAL (MIC<sub>50</sub> ≥341 µg/mL), as well as a relatively high MIC for NOR (MIC<sub>50</sub> ≥16 µg/mL). However, isolates with low MIC<sub>50</sub> values could be observed for OFX (4 µg/mL), CIP (1.7 µg/mL) and LVX (1.5 µg/mL). However, the proportion of aminoglycoside-resistant Enterobacteriaceae isolates was lower, with high MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> values for KAN being observed. Moreover, *E.coli* and *M. morganii* isolates were more susceptible to AMI. In our study, most *P. rettgeri* isolates, recovered only from AS, showed high resistance level to NOR and KAN (MIC ≥ 32 µg/mL). This bacterium is an important human pathogen, especially in urinary site (Al-Jubouri & Vardhan, 2001; Drago et al., 2001).

**Table 1: Antimicrobial resistance for isolates from Raw Sewage (RS) and Activated Sludge (AS).**

Isolates of RS and AS	Percentage of resistant isolates (%) and MIC50/MIC90 µg/mL								
	NAL	NOR	OFX	CIP	LVX	KAN	GEN	AMI	STR
<i>Escherichia coli</i> (35)	100	80	65.7	82.8	88.6	51.4	68.6	22.9	ND
	709/914	36/58.4	18.1/26.7	17.4/25.4	3.5/8.5	528/976	41/69	14/22	37/65
<i>Morganella morganii</i> (26)	100	69.2	53.8	76.9	53.8	34.6	46.1	23.1	ND
	728/933	24/65.6	20.8/40.9	4/8.4	5/15.4	2/20.8	4/14.4	8/26.2	14.4/31
<i>Proteus mirabilis</i> (12)	100	100	58.3	83.3	75	91.7	75	41.7	ND
	716.8/962.5	16/30.4	13/27.4	3.5/5.9	3/7.8	53.6/103.2	64/94.7	37.3/62.9	24/43.2
<i>Citrobacter freundii</i> (3)	100	100	33.3	66.6	33.3	100	33.3	33.3	ND
	1024/1024	28/56.8	4/5.4	1,7/3.5	1.5/2.7	1.5/2.7	1.5/2.7	3/5.4	17/53
<i>Providencia rettgeri</i> (4)	100	75	25	50	50	50	25	25	ND
	341/614.4	32/76.8	2.6/3.7	1/1.8	2/2.6	8/14.4	2/3.6	16/28.8	5.3/9.6
<i>Pseudomonas guangdongensis</i> (4)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	682.6/955.7	4/7.2	2/3.6	1/1.8	2/2	2/3.6	2/3.6	12/18.4	16/38.4
<i>Comomonas</i> sp. (1)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	1024	64	16	4	<2	64	128	2	16
<i>Acidovorax</i> sp. (1)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	1024	16	16	4	4	<2	8	32	128
<i>Alcaligenes faecalis</i> (8)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	731.4/965.4	48/65	16/22.6	2.8/47.2	5/8.2	32/177.6	8/14.4	4/7.2	14/20.4
<i>Shewanella xiamenensis</i> (1)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	>1024	4	16	4	<2	256	4	128	4
<i>Enterococcus gallinarum</i> (1)	ND	0	ND	100	100	ND	ND	ND	ND
	>1024	4	2	16	8	4	32	64	2

NAL (Nalidixic acid), NOR (Norfloxacin), OFX (Ofloxacin), CIP (Ciprofloxacin), LVX (Levofloxacin), KAN (Kanamycin), STR(Streptomycin), GEN (gentamicina), AMI (amikacin), ND (not determined, without breakpoint in CLSI 2014).

Moreover, a considerable proportion of enterobacterial isolates (23/80) was susceptible to all aminoglycosides, whereas a few isolates (5/80) were susceptible to all fluoroquinolones. In contrast with the findings observed in this study, Li et al. (2009) observed high frequency of resistance to KAN and GEN in environmental isolates from a pharmaceutical WWTP. Diwan et al. (2010) reported susceptibility to fluoroquinolones in *E.coli* from waters associated with a hospital the opposite of our study. Multiresistance was found a much high frequency in RS (100 %) and AS (67.8%) as named: *P. mirabilis* (100%), *E. coli* (85.7%), *P. rettgeri* (75%), *M. morganii* (69.2%), and *C. freundii* (33.3%). A key finding of our study was that some isolates of *M. morganii* (1), *E. coli* (3) and *P. mirabilis* (1) showed full resistance to all antimicrobials. Overall, enterobacterial isolates from RS were more resistant to quinolones and aminoglycosides than those from AS, with exception for NAL and STR (Fig. 3). Nevertheless, the difference between the resistance profiles was statistically significant only for NOR and KAN (Fisher's exact test  $p$  0.0084 and 0.0406, respectively). According to Kaplan et al. (2013), the activated sludge can increase the bacterial resistance to quinolones, such as NAL and CIP, but this data was not supported by our study.



**Fig. 3. Resistance of enterobacterial isolates from Raw Sewage (RS) and Activated Sludge (AS) to fluoroquinolone (A) and aminoglycoside (B) compounds at MIC concentrations.** Asterisk indicates statistically significant (Fisher's exact test  $p < 0.05$ ) differences between sampling locations.

It should be noted that no standard MIC breakpoint has been established for other Gram-negative non-Enterobacteriaceae, thus, were determined the MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> for antimicrobials tested (Table 1). *P. guangdongensis* and *A. faecalis* isolates exhibited low MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> values for quinolones (except for NAL) and aminoglycosides, suggesting that the majority of the antimicrobials tested seem to be active against these bacteria. Only one isolate of *Acidovorax* sp. and *Comamonas* sp. was obtained, exhibiting high MICs to NAL and NOR, whereas variable MICs for aminoglycosides were observed.

*E. gallinarum* exhibited susceptibility to NOR but resistance to CIP and LVX. In addition, a high MIC value for NAL (>1024 µg/mL) was observed, suggesting reduced susceptibility to this antimicrobial. It should be noted that the MICs values ( $\geq 32$  µg/mL) to GEN and AMI found are consistent with the intrinsic resistance to low levels of aminoglycosides in *Enterococcus* spp. (Cercenado, 2011). A few studies investigated susceptibility of *Enterococcus* spp. isolates recovered from WWTP, but variable profiles for quinolones and aminoglycosides have been reported (Luczkiewicz et al., 2010; Marathe et al., 2013).

## **Detection of *qnr***

The remarkable bacterial resistance to quinolones has been attributed to chromosomal (*gyrA*, *gyrB*, *parC* and *parE*) and PMQR (*qnr*, *aac(6')Ib-cr*, *qepA* and *OqxAB*) genes. As outlined in a review by Jacoby et al. (2014), *qnrA*, *qnrB* and *qnrS* variants are worldwide spread, both in clinical and environmental settings, in contrast to Brazil (Minarini et al., 2008; Ferrari et al., 2011; Paiva et al., 2012; Viana et al., 2013; Rocha et al., 2014). Given the ease of horizontal gene transfer it is inevitable the fast spread of genes on plasmid, thus it is worth investigating the occurrence of PMQR genes residing in WWTPs bacteria, considering culture-based and metagenomic approaches.

In the present study, none of the NAL-resistant isolates contained *qnrA* and *qnrB* genes. *qnrS* was the sole gene detected in both metagenomic libraries and interestingly only in isolates from AS (9/70). A possible explanation for this finding is that activated sludge has high density of cells in flocs or biofilms, being considered a hotspot for horizontal gene exchange, as suggested by Szczepanowski et al. (2009). Most *qnrS*-positive isolates belonged to Enterobacteriaceae (8/9), with the highest proportion in *E. coli* (5/8) followed by *M. morgani* (2/8) and *P. rettgeri* (1/8) (Table 2). *P. guangdongensis*, recently described as a novel species (Yang et al., 2013), was the single representative non-Enterobacteriaceae bearing *qnrS*, and studies on its antimicrobial resistance have not yet been reported. Indeed, it is well established that *qnrS* is often found in members of Enterobacteriaceae, mostly clinical isolates of *E. coli*, *Citrobacter* spp, *P. mirabilis*, *Salmonella* spp and *Klebsiella* spp (reviewed in Jacoby et al., 2014), and in less extent in environmental isolates, such as *E. coli* and *Klebsiella* spp (Kaplan et al, 2013; Marti et al., 2014). It should be noted that members of *M. morgani* carrying *qnrS* have been described only in clinical isolates (Cai et al., 2012; Mahrouki et al., 2013), whereas there is not any record for *P. rettgeri*.

Reports concerning the *qnr* genes in *Pseudomonas* showed that they are less frequent. Nevertheless, *qnrA*, *qnrB* and *qnrS* have been observed in environmental *P. putida* (Tran et al., 2011) and *P. aeruginosa* (Al-Marjani, 2014), and clinical *P. oryzihabitans* (Ogbolu et al., 2011). Thus, our findings represent the first time that the *qnrS* gene has been identified in *M. morgani*, *P. rettgeri* and *P. guangdongensis* from environmental sources. Most importantly, Brazil has now been included in the list of countries where the *qnrS* gene is circulating among members of *Pseudomonas* spp. It should be noted that one isolate of *E. coli* (AS150) contained more than one resistance gene, co-harboring the *qnrS* and *aac(6')Ib* genes. According to the Robicsek et al. (2006), bacterial isolates may simultaneously carry *qnr* and *aac(6')Ib-cr* genes, which was not observed in our study.

**Table 2 – Distribution of *qnrS*, *aac(6')Ib* and *aac(6')Ib-cr* among isolates of Nal-enrichment culture from Raw Sewage (RS) and Activated Sludge (AS).**

Isolate/ Species	<i>qnrS</i> alleles	<i>aac(6')Ib</i>	<i>aac(6')Ib-cr</i> variant	Source	Resistance phenotype to quinolones and aminoglycosides
AS49/ <i>Pseudomonas guangdongensis</i>	S1/S3/S8	-	-	AS	*
RS102/ <i>Alcaligenes faecalis</i>	-	-	+	RS	NAL, NOR, OFX, CIP ,LVX
AS44-1/ <i>Morganella morganii</i>	S1/S3/S8	-	-	AS	NAL, NOR, OFX, CIP ,LVX, GEN
AS128-1/ <i>Morganella morganii</i>	S1/S3/S8	-	-	AS	NAL, NOR, CIP
AS117/ <i>Morganella morganii</i>	-	+	-	AS	NAL, NOR, OFX, LVX,KAN, GEN
RS15/ <i>Morganella morganii</i>	-	+	-	RS	NAL, NOR, OFX, CIP ,LVX, KAN, GEN
AS151-2/ <i>Morganella morganii</i>	-	+	-	AS	NAL, NOR, OFX, CIP ,LVX, KAN, GEN, AMI
AS57/ <i>Providencia rettgeri</i>	S1/S3/S8	-	-	AS	NAL
AS103-1/ <i>Providencia rettgeri</i>	-	-	+	AS	NAL, NOR, OFX, CIP, LVX, KAN, GEN
AS60/ <i>Escherichia coli</i>	S1/S3/S8	-	-	AS	NAL, NOR, OFX, CIP, LVX, GEN
AS81/ <i>Escherichia coli</i>	S1/S3/S8	-	-	AS	NAL, NOR, OFX, CIP, LVX
AS124/ <i>Escherichia coli</i>	S1/S3/S8	-	-	AS	NAL
AS118/ <i>Escherichia coli</i>	S1/S3/S8	-	-	AS	NAL, NOR, CIP, LVX, KAN,GEN, AMI
RS87/ <i>Escherichia coli</i>	-	-	+	RS	NAL, NOR, OFX, CIP ,LVX, KAN, GEN
AS150/ <i>Escherichia coli</i>	S1/S3/S8	+	-	AS	NAL, NOR, OFX, CIP, LVX, KAN
RS33/ <i>Proteus mirabilis</i>	-	+	-	RS	NAL, NOR, OFX, CIP, KAN, GEN, AMI
RS20/ <i>Proteus mirabilis</i>	-	-	+	RS	NAL, NOR, OFX, CIP, KAN, GEN, AMI
RS22/ <i>Proteus mirabilis</i>	-	-	+	RS	NAL, NOR, CIP, LVX, KAN, GEN
RS19/ <i>Proteus mirabilis</i>	-	-	+	RS	NAL, NOR, OFX, CIP ,LVX, KAN

NAL (Nalidixic acid), NOR (Norfloxacin), OFX (Ofloxacin), CIP (Ciprofloxacin), LVX (Levofloxacin), KAN (Kanamycin), STR (Streptomycin), GEN (Gentamicina), AMI (Amikacin), \* (not determined, without criteria of interpretation by CLSI (2014)).

## Detection of *aac(6')Ib-cr*

Bacterial resistance to aminoglycosides is mainly due to inactivation by aminoglycosidases modifying enzymes. Aac(6')Ib protein can promote acetylation of aminoglycosides, whereas its *cr* variant can also lead to a reduced susceptibility to fluorquinolones (Robcisek et al., 2006; Ramirez et al., 2010). In this study, 11 isolates (7 in RS and 4 in AS) harbored the *aac(6')Ib* gene, which was distributed between *Enterobacteriaceae* (4 of *P. mirabilis*, 3 of *M. morganii*, 2 of *E.coli*, 1 of *P. rettgeri*) and *A. faecalis* (1) (Table 2). *aac(6')Ib* gene sequences analysis revealed that 5 out of 11 sequences corresponded to wild allele (*E. coli*, *P. mirabilis* and *M. morganii*). Remarkably the *aac(6')Ib* gene has not been yet reported in *M. morganii*, although there are known clinical *M. morganii* isolates harboring the *cr* variant (Ogbolu et al., 2011; Mahrouki et al., 2013). The six remaining isolates harbored specifically the *cr* variant, suggesting that it is highly represented among WWTP bacteria. Consistent with earlier reports the *aac(6')Ib-cr* gene has been often found in environmental *Enterobacteriaceae* isolates (Xia et al., 2013; Oh et al., 2015). Nevertheless, a strikingly observation of our study was the presence of the *cr* variant in *A. faecalis* and *P. rettgeri*, which had not been previously found in these taxa.

## General features of clone libraries

Here, the *qnrS* and *aac(6')Ib* genes were detected in metagenomic DNA from RS and AS and their molecular diversity were revealed by four clone libraries (Table S3). A total of 82 and 111 *qnrS* and *aac(6')Ib* sequences were grouped into nine and four OTUs, respectively. Moreover, 84% and 98% of all the sequences from *qnrS* and *aac(6')Ib* clone libraries, respectively, grouped into an unique OTU. The high Good's coverage values of the four libraries indicated that most diversity of *qnrS* and *aac(6')Ib* were captured. The Simpson

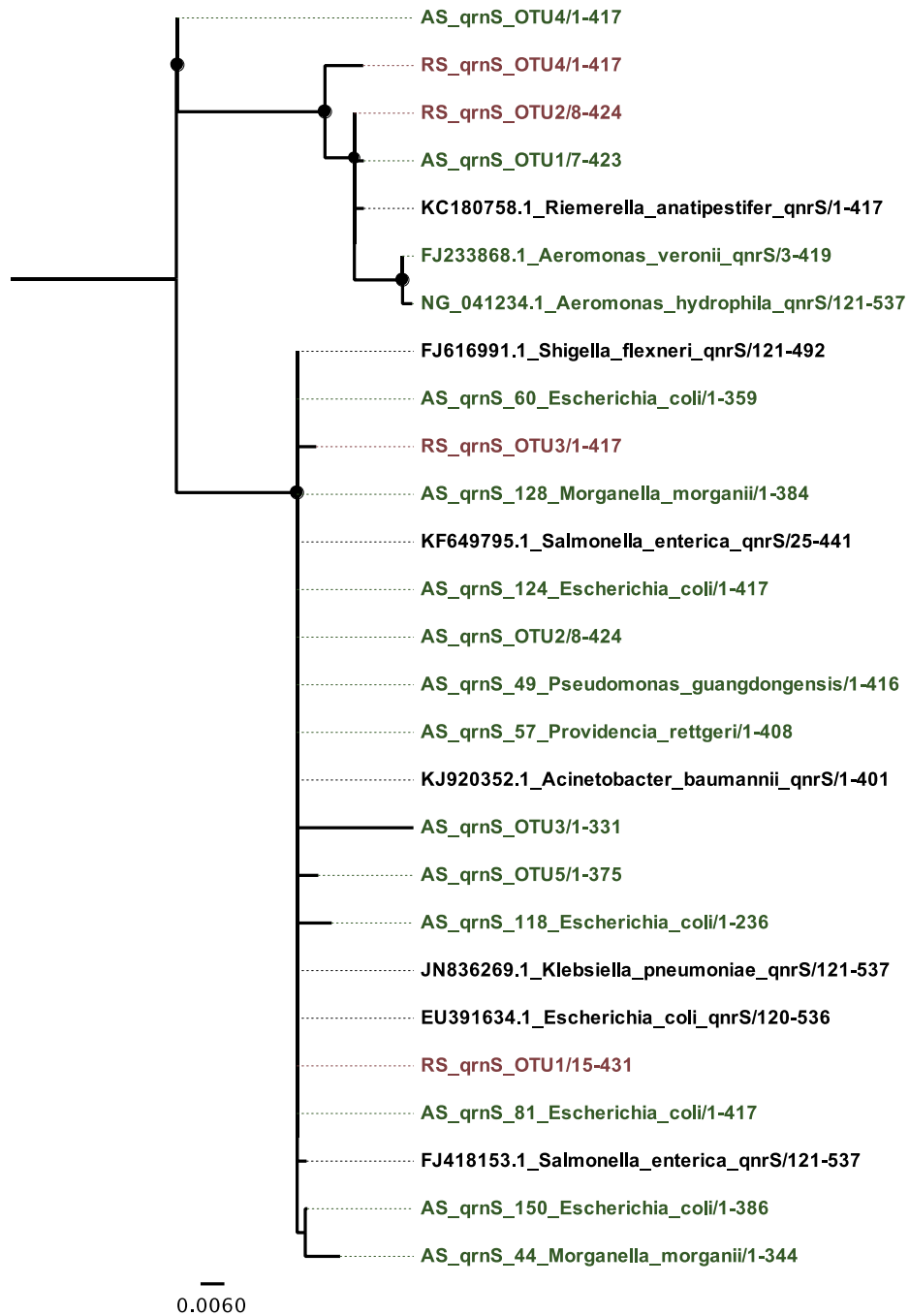
and Shannon indices values showed low diversity of *qnrS* and *aac(6')Ib* in these environments.

Blastx analysis of *qnrS* and *aac(6')Ib* genes sequences revealed high identity with sequences of Qnr proteins (from 81 to 100%), and aminoglycoside acetyltransferase of Gram-negative and positive (from 92 to 100%), respectively. All *qnrS* gene sequences, except one related with *Aeromonas*, were associated with Enterobacteriaceae predominately from clinical and animal sources (Table S4), whereas *aac(6')Ib* gene sequences were mostly related to Enterobacteriaceae from clinical origin (Table S5).

## **Phylogenetic analyses of *qnrS* and *aac(6')Ib* genes sequences**

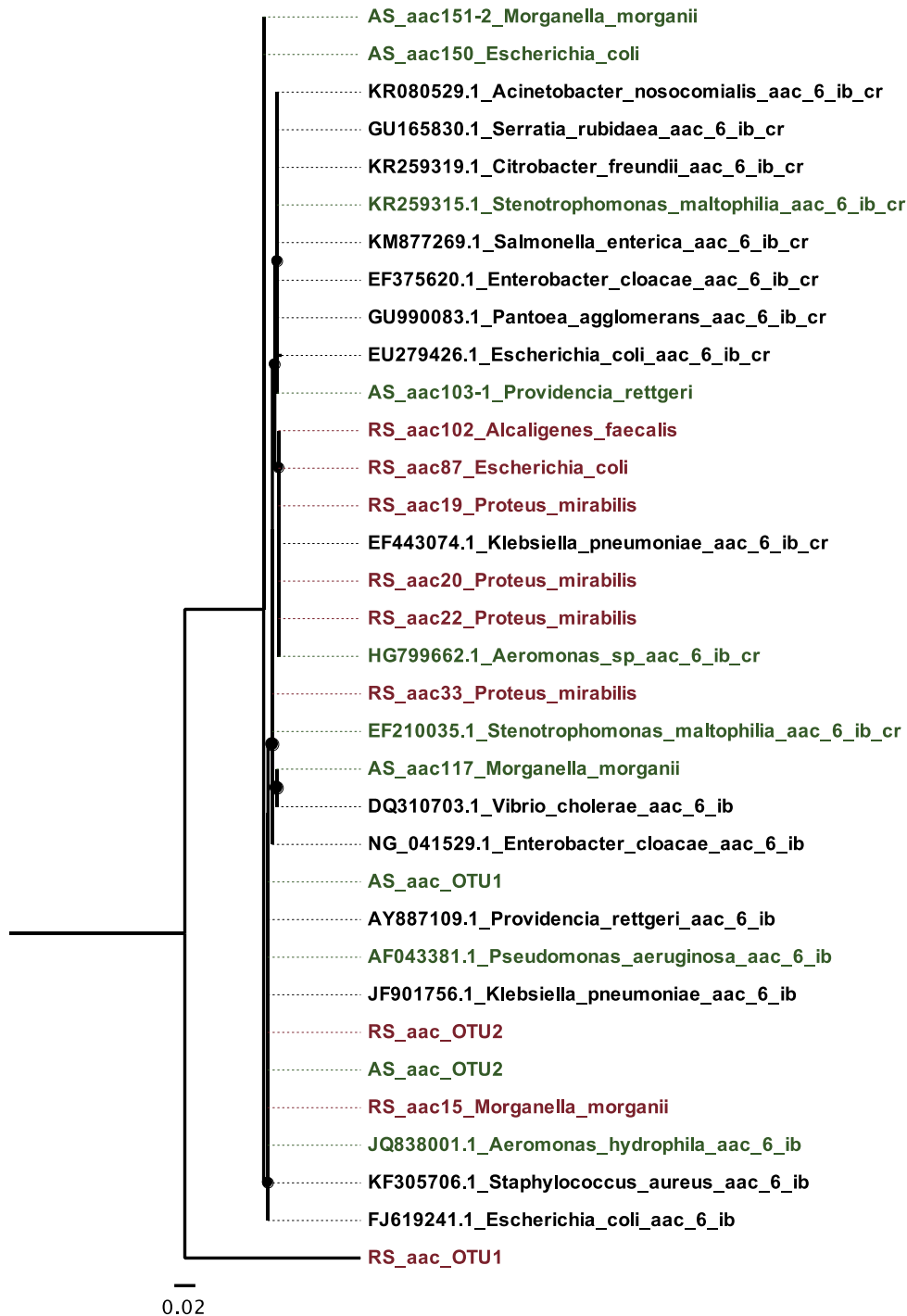
Metagenomic sequence collections based on *qnrS* and *aac(6')Ib* gene-directed primers targeting have not been reported. To get an overview of phylogenetic relationships of the *qnrS* and *aac(6')Ib* genes sequences from bacterial isolates and OTUs, phylogenetic trees were constructed by the maximum likelihood method (Figs. 4 and 5). The resulting *qnrS* and *aac(6')Ib* phylogeny clearly showed taxonomically distinct reference sequences clustered in a same well-supported clade, consistent with horizontal gene transfer. Albeit *qnrS* gene sequences had been clustered with gammaproteobacterial reference sequences, *qnrS* genes have been also detected in non-proteobacterial taxa (*Riemerella anatipestifer*, GenBank accession number AGG 39594.1). On the other hand, *aac(6')Ib* gene sequences were clustered with gammaproteobacterial and *Staphylococcus aureus* reference sequences. Evolutionary analyses revealed high genetic similarity between most *qnrS* and *aac(6')Ib* sequences obtained from isolates and clone libraries, suggesting that they may be selectively favored. It should be noted that one *qnrS*-OTU (AS\_OTU 4) and *aac(6')Ib*-OUT (RS\_OTU 1) were not grouped with known reference sequences. Our findings suggested that the

diversity of *qnrS* genes is wider than *aac(6')Ib* gene. These observations are concurring with the lowest Shannon index values found in *aac(6')Ib* clone libraries.



**Fig. 4: Evolutionary relationships of Quinolone Resistance Genes (*qnrS*).**

Nodes with support values higher than 70% are highlighted. Reference sequences retrieved from the NCBI Nucleotide Database are shown in black and operational taxonomic unities (OTUs) and bacterial isolates in red and green. ASqnrS (sequence from isolates), RSqnrS OTU (OTU from RS), ASqnrS OTU (OTU from AS).



**Fig. 5: Evolutionary Aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase nucleotide sequences.** Nodes with support values higher than 70% are highlighted. Reference sequences retrieved from the NCBI Nucleotide Database are shown in black and operational taxonomic unities (OTUs) and bacterial isolates in red and green. ASaac (sequence from isolates), RSaac OTU (OTU from RS), ASaac OTU (OTU from AS).

## Molecular analysis of *qnrS* and *aac(6')Ib*

We analyzed all sequences from *qnrS*, *aac(6')Ib* and *aac(6')Ib-cr* for the presence of mutations, as well as their impact on the activity of these proteins. Mutational analyses of QnrS have identified several amino acids critical for its activity, which are located within the loop structures. Nevertheless, few studies on QnrS structure and activity relationships have been experimentally evaluated by site-directed mutagenesis (Cattoir et al., 2007; Rodriguez-Martinez et al., 2009; Távio et al., 2014).

As observed in Table 7, a total of 36 amino acids alterations corresponding to 30 positions in QnrS without previous reports were identified. Most amino acids alterations occurred at positions of QnrS protein different from those identified so far. Moreover, 8 out of 30 positions with amino acids alterations of the QnrS protein were already reported; however leading to the replacement of different amino acids. An interest finding was that sequences accumulating more than two mutations were at the C72, Q73, L74, A75 and M76 positions, located in loop B region, which has been shown to be important for quinolone resistance (Távio et al. 2014). It is worth noting that the high QnrS mutational diversity disclosed herein is naturally present in the environment. Importantly, 34 out of 36 amino acids alterations in QnrS were detected in metagenomic sequences, evidencing the importance of this approach to unveil the nature's hidden diversity (Table 3). Moreover, one unique isolate (*M. morgani*, AS44) harbored two alterations: at F114L and A150S positions. According to a database of *qnr* allele (<http://www.lahey.org/qnrStudies>, Jacoby et al. 2008) mutations of *qnrS* matched the *qnrS1*, *qnrS3* or *qnrS8* (74/82 of OTUs and all the isolates) and *qnrS2* alleles (8 metagenomic sequences).

Surprisingly, the *Aac(6')Ib* sequences analysis revealed unprecedented 44 out of 45 amino acids alterations (Table 3). The L119S alteration predominated among the metagenomic sequences (100/101) and in *aac(6')Ib*-positive isolates (3/5), suggesting that

mutation at position 119 increases fitness in environment. This finding is of interest because this alteration previously obtained by mutagenesis assays (Rather et al. 1992) interferes with the enzyme activity resulting in greater resistance to amikacin, but decrease resistance to gentamicin.

Another frequent amino acid alteration was at R173K position, which has not yet described. According to the mutagenesis assay obtained by Shmara et al. (2001), the replacement at R173A position in Aac(6')Ib protein results in elevation of MIC for kanamycin and amikacin. Further studies would be needed to elucidate the effect of R173K on activity of this enzyme. Moreover, the D181Y alteration is of interest because it is required simultaneously to W104R alteration for the bifunctional activity of this enzyme (Robicsek et al. 2006). An intriguing finding of our study was that position 181 reunited the highest number of amino acids replacement (H, G and K). In contrast to *aac(6')Ib* gene the *cr* variant was found only in six isolates, and no additional changes were found.

**Table 3: Alterations detected in QnrS and Aac(6')Ib sequences of libraries from RS and AS and from Nal- enrichment culture from RS and AS.**

QnrS alterations	Aac(6')Ib alterations
G52S/ G52D	P58L
G56S <sup>*a</sup>	A73V
D60N	T78A
L64F/L64R	P79L
F69L	Y80H <sup>*d</sup>
Q71R	L84P
C72S/C72R <sup>*a</sup>	N85K
Q73P	Y91H
L74T	S94P
A75C/A75S	V96I
M76D/M76R	A97T
N78D	S100N
N83S	G101R
A91R	R114P <sup>*f</sup>
T102I	L119S <sup>**a</sup>
V108E <sup>*b</sup>	A123P
M112T <sup>*b</sup>	S124L
Y113C <sup>*b</sup>	V135A
F114L <sup>*a,b</sup>	R136L/R136Q
C115R <sup>*b,c</sup>	L141S/L141M
F118I	L142P
A127T	N144K
M129T/M129K	P146A
N142D	E147K
A150S	V148H
S165F	K150N/K150I
E166G	R164Q <sup>*g</sup>
D167R	E167K <sup>*</sup>
W169L	F171C <sup>*d,e</sup>
Q171A	E172V <sup>*g</sup>
	R173K/ R173T <sup>*g</sup>
	G175R <sup>*g</sup>
	V177I
	P180K
	D181Y <sup>** b/</sup>
	D181H/D181G/D181K <sup>*</sup>
	A184T
	Q189H
	R191L

(\*) indicate positions of amino acid changes previously obtained by site directed mutagenesis

<sup>a</sup>Rodriguez-Martinez et al.(2009); <sup>b</sup>Tavio et al. (2014); <sup>c</sup>Cattoir et al. (2007); <sup>d</sup>Panaite and Tolmasky (1998); <sup>e</sup>Chavideh et al. (1999); <sup>f</sup>Pourreza et al.(2005), <sup>g</sup>Shmara et al.(2001)

(\*\*) indicate an amino acid change previously described obtained by site directed mutagenesis

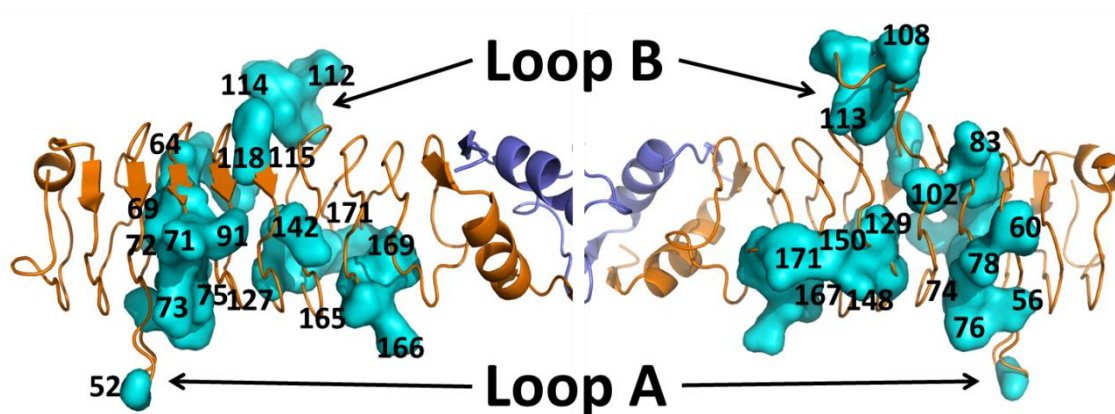
<sup>a</sup>Rather et al. (1992); <sup>b</sup>Robicsek et al. (2006)

A (Alanine), C (Cysteine), D (Aspartate), E (Glutamate), F (Phenylalanine), G (Glycine), H (Histidine), I (Isoleucine), K (Lysine), L (Leucine), M (Methionine), N (Asparagine), P (proline), Q (Glutamine), R (Arginine), S (Serine), T (Threonine), V (Valine), W (Tryptophan), Y (Tyrosine).

## Structural analysis

### QnrS

Mapping the QnrS mutations in its putative three-dimensional structure (Fig. 6), obtained by homology modeling, showed that many of the mutations found are located in loop B, and also on the region immediately below it. However, there is also novel mutations found in loop A (G52S and G52D), region whose importance was not previously assessed.

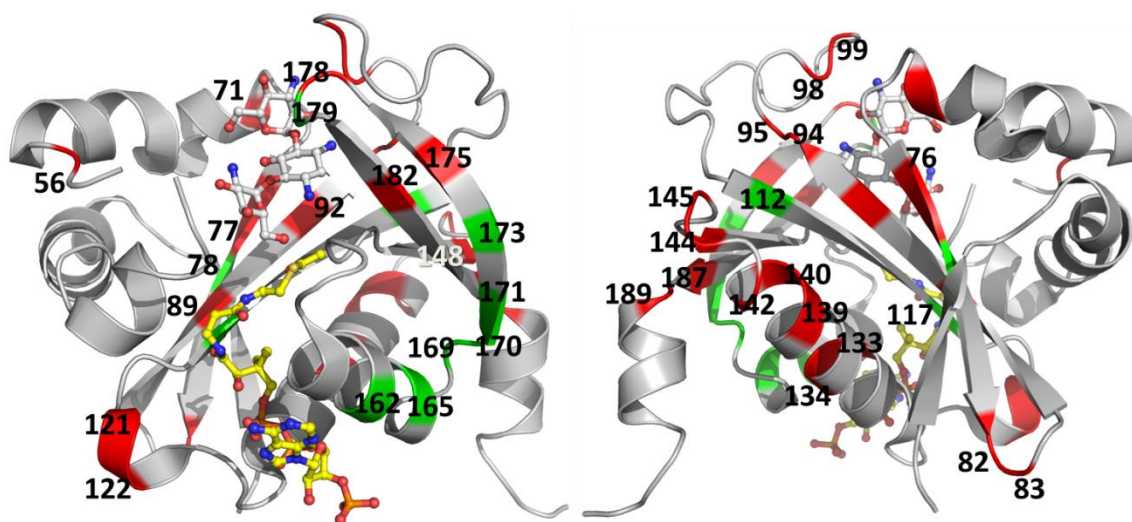


**Fig. 6:** Location of mutation sites found in this study in a computational model for QnrS (left and right panel correspond to a 180° rotation upon the y axis). QnrS was modeled as a homodimer, but the picture focus on a single chain (in orange) for clarity. The surface shown in cyan corresponds to the residues found in this study.

### AAC(6′)-Ib

The location of previously described mutations and those described in this work are shown in Figure 7. Virtually all previously described mutations lie on secondary structure elements, where modifications are more likely to result in structural perturbation, the exceptions being F171C, described in the present study, and D181Y (Robicsek et al., 2006). The first lies in a residue, which is almost entirely buried in the structure (with only 2% solvent accessible surface). For this reason, it may be important for the formation of the protein hydrophobic core, which would be affected by a mutation to a polar and smaller residue such as the cysteine found in this mutation. The second mutation is in direct contact with the kanamycin

binding site, and therefore its importance is more obvious. The mutations found in this study (shown in red in Fig. 4), however, include many positions whose structural implication is not straightforward – some of them are part of loops which are not close to the binding sites for acetyl coA and kanamycin.



**Fig. 7: Mutation sites as mapped in the structure of AAC(6')-Ib as bound to kanamycin (shown as sticks-and-ball representation with carbons shown in white) and acetyl coA (carbons shown in yellow). Left and right panel correspond to a 180° rotation upon the y axis. Residues shown in green correspond to positions previously described in the literature, while those shown in red are those described in this study.**

## Conclusion

Although genes associated with plasmid-linked quinolone resistance is increasingly reported in studies of Enterobacteriaceae, our findings add new information to the current knowledge of the *qnrS*, *aac(6')Ib* and *cr* variant gene taxonomic distribution either in Enterobacteriaceae, *M. morganii* and *P. rettgeri*, or non-Enterobacteriaceae, as *P. guangdongensis* and *A. faecalis*. Given the growing evidence that antibiotic resistance genes in clinical isolates have arisen in the environmental resistome the repertoire of amino acids alterations disclosed herein, suggested that only a few alterations emerged in clinical isolates

so far. Thus, other mutations found here may eventually have further clinical implications to human pathogens.

## Supporting Information

**S1 Table:** Identification, distribution of *qnrS*, *aaac(6')Ib* and *aac(6')Ib-cr* genes and minimum inhibitory concentration to quinolones and aminoglycosides from NAL-enrichment culture of raw sewage (RS).

**S2 Table:** Identification, distribution of *qnrS*, *aac(6')Ib* and *aac(6')Ib-cr* genes and minimum inhibitory concentration to quinolones and aminoglycosides from NAL-enrichment culture of activated sludge (AS).

**S3 Table:** General features of the *qnrS* and *aac(6')Ib* from raw sewage (RS) and activated sludge (AS) libraries.

**S4 Table:** Phylogenetic affiliation of *qnrS* OTUs and isolates based on blastx protein database.

**Table S5:** Phylogenetic affiliation of *aac(6')Ib* OTUs and isolates based on Blastx protein database.

## References

1. ADACHI, F.; YAMAMOTO, A.; TAKAKURA, K-I.; KAWAHARA, R. **Occurrence of fluoroquinolones and fluoroquinolone-resistance genes in the aquatic environment.** *Science of the Total Environment*, v. 444, p. 508-514, 2013.
2. AL-JUBOURI, M.; VARGHAN, M. **A case of purple urine bag syndrome associated with *Providencia rettgeri*.** *Journal of Clinical Pathology*, v. 54, p. 412, 2001.
3. AL-MARJANI, M.F. **Presence of *qnr* gene in environmental and clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Baghdad.** *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, v.3, p. 853-857, 2014.
4. BYAPPANAHALLI, M.N.; NEVERS, M.B.; KORAJKIC, A. et al. **Enterococci in the environment.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.76, p. 685-706, 2012.

5. CAI, J.C.; YANG, W.; HU, Y.Y. et al. **Detection of *KPC-2* and *qnrS1* in clinical isolates of *Morganella morganii* from China.** *Diagnostic Microbiology & Infectious Disease*, v.73, p. 207-209, 2012.
6. CARLOS, C.; PIRES, M.M.; STOPPE, N.C. et al. ***Escherichia coli* phylogenetic group determination and its application in the identification of the major animal source of fecal contamination.** *BMC Microbiology*, v.10, p. 1-10, 2010.
7. CATTOIR, V.; POIREL, L.; NORDMANN, P. **In-vitro mutagenesis of *qnrA* and *qnrS* genes and quinolone resistance in *Escherichia coli*.** *Clinical Microbiology and Infection*, v. 13, p. 940-943, 2007.
8. CERCENADO, E. ***Enterococcus*: resistencias fenotípicas y genotípicas y epidemiología em España.** *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, v. 29, p. 59-65, 2011.
9. CHAVIDEH, R., SHOLLY, S., PANAITE, D., TOLMASKY, M. E. **Effects of F171 Mutations in the 6 J - N -Acetyltransferase Type Ib [ AAC ( 6 J ) -Ib ] Enzyme on Susceptibility to Aminoglycosides.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 43, p. 2811-2812, 1999.
10. CHENG, G.; HU, Y.; YIN, Y. et al. **Functional screening of antibiotic resistance genes from human gut microbiota reveals a novel gene fusion.** *FEMS Microbiology Letters*, v. 336, p.11-16, 2012
11. CLERMONT, O., BONACORSI, S., BINGEN, E. **Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group.** *Applied Environmental Microbiology*, v. 66, p. 4555- 4558, 2000.
12. CLERMONT, O.; GORDON, D. M.; BRISSE, S. et al. **Characterization of the cryptic *Escherichia* lineages: rapid identification and prevalence.** *Environmental Microbiology*, v.13, p. 2468-2477, 2011.
13. CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; nineteenth informational supplement**, M100-S24, 2014.
14. DARRIBA, D.; TABOADA, G.L.; DOALLO, R. et al. **jModelTest 2: more models, newheuristics and parallel computing.** *Nature Methods*, v. 9, p. 772; 2012.
15. 10.1038/nmeth.2109. PubMed PMID: 22847109; PubMed Central PMCID: PMC4594756
16. DEVARAJAN, N.; LAFFITE, A.; GRAHM, N.D. et al. **Accumulation of clinically relevant antibiotic-resistance genes, bacterial load, and metals in freshwater lake sediments in Central Europe.** *Environmental Science & Technology*, v. 49, p. 6528-6537, 2015.
17. DIWAN, V.; TAMHANKAR, A.; KHANDAL, R.K. et al. **Antibiotics and antibiotic-resistance bacteria in waters associated with a hospital in Ujjain, India.** *BMC Public Health*, v.10, p. 1-8, 2010.
18. DORIVAL-GARCIA, N.; ZAFRA-GOMEZ, A.; NAVALON, A. et al. **Removal and degradation characteristics of quinolone antibiotics in laboratory-scale activated sludge reactors under aerobic, nitrifying and anoxic conditions.** *Journal of Environmental Management*, v. 120, p. 75-83, 2013.
19. DRAGO, L.; VECHI, E.D.; MOMBELLI, B. et al. **Activity of levofloxacin and ciprofloxacin against urinary pathogens.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 48, p. 37-45, 2001.
20. FERRARI, R.; GALIANA, A.; CREMADES, R.; RODRIGUEZ, J.C.; MAGNANI, M.; TOGNIM, M.C. et al. **Plasmid-mediated quinolone resistance by genes *qnrA1* and *qnrB19* in *Salmonella* strains isolated in Brazil.** *Journal Infection Developing Countries*, v. 5, p.496-498, 2011.
21. FERREIRA DA SILVA, M.; VAZ-MOREIRA, I.; GONZALEZ-PAJUELO, M. et al. **Antimicrobial resistance patterns in Enterobacteriaceae isolated from an urban wastewater treatment plant.** *FEMS Microbiology Ecology*, v. 60, p. 166-176, 2007.
22. FORSBERG, K.J.; REYES, A.; WANG, B. et al. **The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens.** *Science*, v. 337; p. 1107-1111, 2012.

- 23.FREITAS, D.B.; LIMA-BITTENCOURT, C.I.; REIS, M.P. et al. **Molecular characterization of early colonizer bacteria from wastes in a steel plant.** *Letters in Applied of Microbiology*, v. 47, p. 241–249, 2008.
- 24.GOOD, I.J. **The population frequencies of species and the estimation of population parameters.** *Biometrika*, v. 40, p. 237–262, 1953.
- 25.GORDON, D.M. **The influence of ecological factors on the distribution and genetic structure of *Escherichia coli*.** In: *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology*. Neidhardt, F. et al., Washington, DC, 2004.
- 26.HATOSY, S;M.; MARTINY, A.C. **The ocean as a global reservoir of antibiotic resistance genes.** *Applied and Environmental Microbiology*, v. 81, p. 7593-7599, 2015.
- 27.HOOPER, D.C.; JACOBY, G.A. **Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance.** *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.1354, p. 12-31, 2015.
- 28.JACOBY, G.; CATTOIR, V.; HOOPER et al.D. **qnr gene nomenclature.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; v. 52, p. 2297-2209, 2008.
- 29.JACOBY, G.A.; STRAHILEVITZ, J.; HOOPER, D.C. **Plasmid-mediated quinolone resistance.** *Microbiology Spectrum*, v. 2, p. 1- 42, 2014.
- 30.JANG, J.; DI, D.Y.W.; LEE, A. et al. **Seasonal and genotypic changes in *Escherichia coli* phylogenetic groups in the Yeongsan River Basin of South Korea.** *Plos One*, v. 9, e100585, 2014.
- 31.JOHNSON, J.R.; DELAVARI, P.; KUSKOWSKI, M. et al. **Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence-associated traits in *Escherichia coli*.** *The Journal of Infectious Diseases*, v. 183, p. 78-88, 2001.
- 32.JOO, H-S.; HIRAI, M. SHODA, M. **Improvement in ammonium removal efficiency in wastewater treatment by mixed culture of *Alcaligenes faecalis*.** *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 4, p. 66-73, 2007.
- 33.KAPLAN, E.; OFEK, M.; JURKEVITCH, E. et al. **Characterization of fluoroquinolone resistance and qnr diversity in Enterobacteriaceae from municipal biosolids.** *Frontiers in Microbiology*, v. 4: 144, eCollection, 2013.
- 34.LEE, B.; RICHARDS, F.M. **The interpretation of protein structures: estimation of static accessibility.** *Journal of Molecular Biology*, v. 55, p. 379–400, 1971.
- 35.LI, D.; YANG, M.; ZHANG, J. et al. **Antibiotic-resistance profile in environmental bacteria isolated from penicillin production wastewater treatment plant and the receiving river.** *Environmental Microbiology*, v.11, p.1506-1517, 2009.
- 36.LIMA-BITTENCOURT, C.I.; CURSINO, L.; GONÇALVES-DORNELAS, H. **Multiple antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae isolates from pristine freshwater.** *Genetics and Molecular Research*, v.6, p. 510-512, 2007.
- 37.LUCZKIEWICZ, A.; FUDALA-KSI, S.; JANKOWSKA,K. et al. **Diversity of fecal coliformes and their antimicrobial resistance patterns in wastewater treatment model plant.** *Water Science and Technology*, v. 61, p.1383-1392, 2010.
- 38.LUDWIG, W.; STRUNK, O.; WESTRAM, R. et al. **ARB: a software environment for sequence data.** *Nucleic Acids Research*, v. 32, p. 1363-1371, 2004.
- 39.MAHROUKI, S.; PERILLI, M.; BOUROUIS, A. et al. **Prevalence of quinolone resistance determinant qnrA6 among broad- and extended-spectrum beta-lactam-resistant *Proteus mirabilis* and *Morganella morganii* clinical isolates with *sulI*-type class 1 integron association in a Tunisian Hospital.** *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, v. 45, p. 600-605, 2013.

40. MARATHE, N.P.; REGINA, V.R.; WALUJKAR, S.A. et al. **A treatment plant receiving waste water from multiple bulk drug manufacturers is a reservoir for highly multi-drug resistant integron-bearing bacteria.** *Plos One*, v.8, p. 1-10, 2013.
41. MARTI, E.; HUERTA, B.; RODRÍGUEZ-MOZAZ, S. et al. **Characterization of ciprofloxacin-resistant isolates from a wastewater treatment plant and its receiving river.** *Water Research*, v.61, p. 67–76, 2014.
42. MARTI, E.; JOFRE, J.; BALCAZAR, J. L. **Prevalence of antibiotic resistance genes and bacterial community composition in a river influenced by a wastewater treatment plant.** *PloS one*, v.8, e78906, 2013.
43. MARTINEZ-MARTINEZ, L.; GARCIA, I.; BALLESTA, S. et al. **Energy dependent accumulation of fluoroquinolones in quinolone resistant *Klebsiella pneumoniae* strains.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 42, p. 1850 -1852, 1998.
44. MC LELLAN, S L; HUSE, S. M.; MUELLER-SPITZ, S. R. et al. **Diversity and population structure of sewage-derived microorganisms in wastewater treatment plant influent.** *Environmental Microbiology*, v. 12, p.378–392, 2010.
45. MC LELLAN, S. L.; NEWTON, R. J.; VANDEWALLE, J. L. et al. **Sewage reflects the distribution of human faecal Lachnospiraceae.** *Environmental Microbiology*, v.15, p. 2213–2227, 2013.
46. MIAO, X. S.; BISHAY, F.; CHEN, M. et al. **Occurrence of antimicrobials in the final effluents of wastewater treatment plants in Canada.** *Environmental Science & Technology*, v. 38, p. 3533–3541, 2004.
47. MINARINI, L.A.R.; POIREL, L. et al. **Plasmid-mediated quinolone resistance determinants among enterobacterial isolates from outpatients in Brazil.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.62, p. 474–478, 2008.
48. MOKRACKA, J.; KOCZURA, R.; JABŁOŃSKA, L.; KAZNOWSKI, A. **Phylogenetic groups, virulence genes and quinolone resistance of integron-bearing *Escherichia coli* strains isolated from a wastewater treatment plant.** *Antonie van Leeuwenhoek*, v.99, p. 817–824, 2011.
49. MORI, T.; MIZUTA, S.; SUENAGA, H. et al. **Metagenomic screening for bleomycin resistance genes.** *Applied and Environmental Microbiology*, v.74, p. 6803-6805, 2008.
50. MOURA, A.; PEREIRA, C.; HENRIQUES, I. et al. **Novel gene cassettes and integrons in antibiotic-resistant bacteria isolated from urban wastewaters.** *Research in Microbiology*, v.63, p. 92 -100, 2012.
51. NOVO, A.; ANDRÉ,S.; VIANA, P. et al. **Antibiotic resistance, antimicrobial residues and bacterial community composition in urban wastewater.** *Water Research*, v. 47, p. 1875-1887, 2013.
52. OGBOLU, D.O.; DAINI, O.A.; OGUNLEDUN, A. et al. **High levels of multidrug resistance in clinical isolates of Gram-negative pathogens from Nigeria.** *International Journal of Antimicrobial Agents*, v.37, p. 62-66, 2011.
53. OH, J-Y.; KWON, Y-K.; TAMANG, M.D. et al. **Plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* isolates from wild birds and chickens in South Korea.** *Microbial Drug Resistance*, 2015 [Epub ahead of print]
54. ORSI, R.H.; STOPPE, N.C.; SATO, M.I.Z. et al. **Phylogenetic group distribution among *Escherichia coli* isolated from rivers in São Paulo, Brazil.** *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 24, p. 1573-1577, 2008.
55. PAIVA, M.C., NASCIMENTO, A.M., CAMARGO, I.L. **The first report of the *qnrB19*, *qnrS1* and *aac(6)-Ib-cr* genes in urinary isolates of ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* in Brazil.** *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, v. 107, p. 687–689, 2012.

56. PAIVA, M.C.; ÁVILA, M.P.; REIS, M.P. et al. **The Microbiota and Abundance of the Class I Integron-Integrase Gene in Tropical Sewage Treatment Plant Influent and Activated Sludge.** *Plos One*, p. 1-12, 2015.
57. PANAITÉ, D. M.; TOLMASKY, M. E. **Characterization of mutants of the 6'-N-acetyltransferase encoded by the multiresistance transposon Tn 1331: effect of Phe171-to-Leu171 and Tyr80-to-Cys80 substitutions.** *Plasmid*, v.39, p.123-133, 1998.
58. PARK, C.H.; ROBICSEK, A. et al. **Prevalence in the United States of *aac(6')Ib-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 50, p. 3953-3955, 2006.
59. PARSLEY, L.C.; CONSUEGRA, E.J.; KAKIRDE, K.S. et al. **Identification of diverse antimicrobial resistance determinants carried on bacterial, plasmid, or viral metagenomes from an activated sludge microbial assemblage.** *Applied and Environmental Microbiology*, v.76, p. 3753-3757, 2010.
60. PEREZ-PEREZ, F.J.; HANSON, N.D. **Detection of plasmid-mediated *AmpC* b-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR.** *Journal Clinical Microbiology*, v.40, p. 2153- 2162, 2002.
61. POIREL, L.; CATTOIR, V.; NORDMAN, P. **Plasmid-mediated quinolone resistance; interactions between human, animal, and environmental ecologies.** *Frontiers in Microbiology*, v.3, p. 1-7, 2012.
62. POURREZA, A.; WITHERSPOON, M.; FOX, J. et al. **Mutagenesis Analysis of a Conserved Region Involved in Acetyl Coenzyme A Binding in the Aminoglycoside 6'-N-Acetyltransferase Type Ib Encoded by Plasmid pJHCMW1.** *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v. 49, p. 2979-2982, 2005.
63. PRUESE, E.; QUAST, C.; KNITTEL, K. et al. **SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB.** *Nucleic Acids Research*, v. 35, p. 7188-7196, 2007.
64. RAJILIC-STOJANOVIC, M.; VOS, W.M. **The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota.** *FEMS Microbiology Review*, v.38, p. 996-1047, 2014.
65. RAMIREZ, M.S; TOLMASKY, M. E. **Aminoglycoside modifying enzymes.** *Drug Resistance Updates*, v. 13(6), p. 151-171, 2010.
66. RATHER, P. N.; MUNAYYER, H.; MANN, P. A. et al. **Genetic Analysis of Bacterial Acetyltransferases : identification of amino acids determining the specificities of the aminoglycoside 6' -N-Acetyltransferase Ib and IIa proteins** *Journal Of Bacteriology*, v. 174, p. 3196-3203, 1992.
67. ROBICSEK, A.; STRAHILEVITZ, G.A. et al. ***qnr* prevalence in ceftazidime-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from the United States.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.50, p. 2872-2874, 2006.
68. ROCHA, K.L.; SANTOS NETO, R.L.; GUIMARÃES, A.C.C. et al. **Plasmid-mediated *qnrA1* in *Klebsiella pneumoniae* ST147 in Recife, Brazil.** *International Journal of Infectious Diseases*, v.26, p. 49-50, 2014.
69. RODRIGUEZ-MARTINEZ, J.M.; BRIALES, A.; VELASCO, C. et al. **Mutational analysis of quinolone resistance in the plasmid-encoded pentapeptide repeat proteins QnrA, QnrB and QnrS.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.63, p. 1128-1134, 2009.
70. RODRIGUEZ-MARTINEZ, J.M.; BRIALES, A.; VELASCO, C. et al. **Mutational analysis of quinolone resistance in the plasmid-encoded pentapeptide repeat proteins QnrA, QnrB and QnrS.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 63, p. 1128-1134, 2009.
71. ROLAIN, J-M. **Food and human gut as reservoirs of transferable antibiotic resistance encoding genes.** *Frontiers in Microbiology*, v.4, p. 1-10, 2013.
72. RUIZ, E.; SÁENZ, Y.; ZARAZAGA, M. et al. ***qnr*, *aac(6')-Ib-cr* and *qepA* genes in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp.: genetic environments and plasmid and chromosomal location.** *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 67, p. 886-897, 2012.

- 73.SAFF, E.B.; KUIJLAARS, A.B.J. **Distributing many points on a sphere.** *Mathematical Intelligencer*, v.19, p.5–11, 1997.
- 74.SAHLSTRÖM, L. REHBINDER, V.; ALBIHN, A. et al. **Vancomycin resistant enterococci (VRE) in Swedish sewage sludge.** *Acta Veterinaria Scandinavica*, v.51, p. 24, 2009.
- 75.SAITOU, N.; NEI, M. **The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees.** *Molecular Biology and Evolution*, v. 4, p. 406- 425, 1987.
- 76.SALI, A.; BLUNDELL, T.L. **Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints.** *Journal of Molecular Biology*, v. 234, p. 779–815, 1993.
- 77.SCHLOSS, P.D.; HANDELSMAN, J. **Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness.** *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, p.1501–1506, 2005.
- 78.SHMARA, A. L. I.; WEINSETEL, N.; DERY, K. E. N. J. et al. **Systematic analysis of a conserved region of the aminoglycoside 6 N -acetyltransferase type Ib,** *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, v. 45, p. 3287–3292, 2001.
- 79.SILVA, C. C., HAYDEN, H., SAWBRIDGE, T., et al. **Phylogenetic and functional diversity of metagenomic libraries of phenol degrading sludge from petroleum refinery wastewater treatment system.** *AMB Express*, v. 2, 1- 13, 2012.
- 80.SMITH, J.A.; HENRY, D.; NGUI-YEN, J. et al. **Comparison of agar dilution, microdilution, and disk elution methods for measuring the synergy of cefotaxime and its metabolite against anaerobes.** *Journal of Clinical Microbiology*, v. 23, p. 1104-1108, 1986.
- 81.SZCZEPANOWSKI, R.; LINKE, B.; KRAHN, I. et al. **Detection of 140 clinically relevant antibiotic-resistance genes in the plasmid metagenome of wastewater treatment plant bacteria showing reduced susceptibility to selected antibiotics.** *Microbiology*, v. 155, p. 2306-2319, 2009.
- 82.TAVIO, M.M.; JACOBY, G.A.; HOOPER, D.C. **QnrS1 structure-activity relationships.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 69, p. 2102-2109, 2014.
- 83.THOMPSON, L.J.; GRAY, V.M.; KALALA, B. et al. **Biohydrogen production by *Enterobacter cloacae* and *Citrobacter freundii* in carrier induced granules.** *Biotechnology Letters*, v. 30, p.271-274, 2008.
- 84.TRAN Q.T.; NAWAZ M.S.;DECK J. et al. **Plasmid-mediated quinolone resistance in *Pseudomonas putida* isolates from imported shrimp.** *Applied Environmental Microbiology*, v. 77, p. 1885–1887, 2011.
- 85.VAN DOORSLAER, X.; DEWULF, J.; VAN LANGENHOVE, H. et al. **Fluoroquinolone antibiotics: an emerging class of environmental micropollutants.** *Science of the Total Environment*, v. 500-501, p. 250-269, 2014.
- 86.VETTING, M.W.; PARK, C.H.; HEDGE, S.S.; JACOBY, G.A.; HOOPER, D.C.; BLANCHARD, J.S. **Mechanistic and structural analysis of aminoglycoside N-acetyltransferase AAC(6')-Ib-cr and its bifunctional, fluoroquinolone-active AAC(6')-Ib-cr variant.** *Biochemistry*, v.47, p. 9825-9835, 2008.
- 87.VIANA, A.L., CAYO, R., AVELINO, C.C. et al. 2013.**Extended-spectrum beta-lactamases in Enterobacteriaceae isolated in Brazil carry distinct types of plasmid-mediated quinolone resistance genes.** *Journal Medical Microbiology*, v. 62, p. 1326–1331, 2013.
- 88.WALK, S.T.; ALM, E.W.; CALHOUN, L.M. et al. **Genetic diversity and population structure of *Escherichia coli* isolated from freshwater beaches.** *Environmental Microbiology*, v. 9, p. 2274-2288, 2007.
- 89.WILLEMS, A.; FALSSEN, I.B.; POT, B. et al. ***Acidovorax*, a New Genus for *Pseudomonas facilis*, *Pseudomonas delafieldii*, E. Falsen (EF) Group 13, EF Group 16, and several clinical isolates, with the**

- species *Acidovorax facilis* comb. nov. , *Acidovorax delafieldii* comb. nov., and *Acidovorax temperans* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v.40, p. 384-398, 1990.
90. WINN, M.D.; BALLARD, C.C.; COWTAN, K.D. et al. **Overview of the CCP4 suite and current developments.** *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, v.67, p. 235–242, 2011.
91. WOEGERBAUER, M.; ZEINZINGER, J.; GOTTSBERGER, R.A. et al. **Antibiotic resistance marker genes as environmental pollutants in GMO-pristine agricultural soils in Austria.** *Environmental Pollution*, v. 206, 342-351; 2015.
92. XIA, R.; REN, Y.; XU, H. **Identification of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in multidrug-resistant Gram-negative bacteria from hospital wastewaters and receiving waters in the Jinan Area, China.** *Microbial Drug Resistance*, v.19, p. 446-456, 2013.
93. YANG, G.; HAN, L.; WEN, J. et al. ***Pseudomonas guangdongensis* sp. nov., isolated from an electroactive biofilm, and emended description of the genus *Pseudomonas* Migula 1894.** *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 63, p. 4599-4605, 2013.
94. YE, L.; ZHANG, T. **Bacterial communities in different sections of a municipal wastewater treatment plant revealed by 16S rRNA 454 pyrosequencing.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 97, p. 2681–2690, 2013.
95. ZHANG, X-X.; ZHANG, T.; FANG, H.H.P. **Antibiotic resistance genes in water environment.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.82, p. 397-414, 2009.
96. <http://comp-bio.anu.edu.au/bellerophon/bellerophon.pl>
97. <http://graphpad.com/quickcalcs/contingency1.cfm>.
98. <http://www.lahey.org/qnrStudies>
99. <http://www.megasoftware.net>
100. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
101. <http://www.phrap.org/phredphrapconsed.html>
102. <http://www.tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>

**Supplementary Table 1 - Identification, distribution of *aac(6')Ib* and *aac(6')Ib-cr* genes and minimum inhibitory concentration to quinolones and aminoglycosides from NAL-enrichment culture of Raw Sewage (RS).**

RS isolates	Identification	Phylogenetic group	Minimum Inhibitory Concentration (µg/mL) Quinolones					Minimum Inhibitory Concentration (µg/mL) Aminoglycosides			Resistance genes	
			NAL	NOR	OFX	CIP	LVX	KAN	STR	GEN		AMI
RS 1	<i>Escherichia coli</i>	A	≥1024	64	16	16	8	512	8	32	16	-
RS 3	<i>Escherichia coli</i>	D	≥1024	16	16	4	<2	512	32	128	16	-
RS 5	<i>Escherichia coli</i>	A	≥1024	32	2	4	8	512	32	128	16	-
RS 6	<i>Escherichia coli</i>	B2	≥1024	32	4	4	4	4	128	128	2	-
RS 87	<i>Escherichia coli</i>	B2	≥1024	32	16	4	8	512	32	32	16	<i>aac(6')Ib-cr</i>
RS 89	<i>Escherichia coli</i>	A	≥1024	16	4	4	8	512	128	32	16	-
RS 90	<i>Escherichia coli</i>	A	≥1024	32	32	32	32	<2	32	32	8	-
RS 131	<i>Escherichia coli</i>	B2	≥1024	64	16	1	<2	4	128	128	64	-
RS 88	<i>Comamonas</i> sp.		≥1024	64	16	4	<2	64	16	128	2	-
RS 4	<i>Acidovorax</i> sp.		≥1024	16	16	4	4	<2	128	8	32	-
RS 12	<i>Morganella morganii</i>		≥1024	32	16	16	8	<2	16	2	8	-
RS 15	<i>Morganella morganii</i>		≥1024	32	64	32	32	512	16	32	8	<i>aac(6')Ib</i>
RS 110	<i>Pseudomonas guangdongensis</i>		≥1024	16	8	32	<2	<2	16	2	16	-
RS 102	<i>Alcaligenes faecalis</i>		≥1024	256	32	64	32	2	16	1	8	<i>aac(6')Ib-cr</i>
RS 2	<i>Alcaligenes faecalis</i>		≥1024	64	16	<4	8	64	128	128	2	-
RS 20	<i>Proteus mirabilis</i>		≥1024	256	32	32	<2	64	128	64	128	<i>aac(6')Ib-cr</i>
RS 21	<i>Proteus mirabilis</i>		≥1024	32	4	4	<2	2	32	2	8	-
RS 22	<i>Proteus mirabilis</i>		≥1024	16	4	4	8	64	16	64	32	<i>aac(6')Ib-cr</i>
RS 33	<i>Proteus mirabilis</i>		≥1024	64	64	64	<2	128	128	128	128	<i>aac(6')Ib</i>
RS 88-1	<i>Proteus mirabilis</i>		≥1024	256	16	32	8	512	32	4	128	-
RS 119	<i>Proteus mirabilis</i>		≥1024	32	16	4	8	512	128	128	128	-
RS 120	<i>Proteus mirabilis</i>		≥1024	32	2	4	<2	64	16	64	32	-
RS 121	<i>Proteus mirabilis</i>		≥1024	32	16	4	4	64	16	64	16	-
RS 122	<i>Proteus mirabilis</i>		≥1024	32	2	1	<2	64	16	128	32	-
RS 19	<i>Proteus mirabilis</i>		≥1024	32	64	32	8	64	8	4	8	<i>aac(6')Ib-cr</i>
RS 109	<i>Citrobacter freundii</i>		≥1024	16	16	4	8	32	64	64	128	-

NAL (Nalidixic acid), NOR (Norfloxacin), OFX (Ofloxacin), CIP (Ciprofloxacin), LVX (Levofloxacin), KAN (Kanamycin), STR (Streptomycin), GEN (Gentamicina), AMI (Amikacin)

**Supplementary Table 2 - Identification, distribution of *qnrS*, *aac(6')Ib* and *aac(6')Ib-cr* genes and minimum inhibitory concentration to quinolones and aminoglycosides from NAL-enrichment culture of Activated Sludge (AS).**

AS isolates	Identification	Minimum Inhibitory Concentration (µg/mL) Quinolones					Minimum Inhibitory Concentration (µg/mL) Aminoglycosides				Resistance genes
		NAL	NOR	OFX	CIP	LVX	KAN	STR	GEN	AMI	
AS 44-1	<i>Morganella morganii</i>	≥1024	32	16	4	8	32	8	32	32	<i>qnrS</i>
AS 52	<i>Morganella morganii</i>	>1024	4	4	1	8	<2	8	2	16	-
AS 63	<i>Morganella morganii</i>	>1024	32	64	64	<2	<2	16	64	16	-
AS 71	<i>Morganella morganii</i>	>1024	64	4	1	<2	<2	8	32	8	-
AS 72	<i>Morganella morganii</i>	>1024	32	32	16	8	<2	32	2	8	-
AS 73	<i>Morganella morganii</i>	>1024	64	16	16	8	<2	32	32	8	-
AS 76	<i>Morganella morganii</i>	>1024	4	2	16	<2	<2	8	32	8	-
AS 77	<i>Morganella morganii</i>	>1024	4	2	1	8	<2	8	2	8	-
AS 78	<i>Morganella morganii</i>	>1024	4	2	1	<2	<2	8	32	32	-
AS 79	<i>Morganella morganii</i>	>1024	64	2	16	8	256	32	32	8	-
AS 116	<i>Morganella morganii</i>	>1024	4	4	1	<2	<2	32	2	16	-
AS 117	<i>Morganella morganii</i>	>1024	64	16	1	8	512	128	256	16	<i>aac(6')Ib</i>
AS 84	<i>Morganella morganii</i>	>1024	128	4	4	<2	<2	32	128	128	-
AS 128-1	<i>Morganella morganii</i>	>1024	128	4	4	4	<2	8	2	16	<i>qnrS</i>
AS 129-1	<i>Morganella morganii</i>	>1024	4	2	16	<2	<2	8	2	8	-
AS 132	<i>Morganella morganii</i>	>1024	4	2	4	<2	<2	2	8	4	-
AS 137	<i>Morganella morganii</i>	>1024	64	16	4	8	<2	4	2	8	-
AS 151-2	<i>Morganella morganii</i>	512	256	64	64	8	128	64	32	128	<i>aac(6')Ib</i>
AS 44-2	<i>Morganella morganii</i>	≥1024	32	32	64	32	256	16	2	8	-
AS 113	<i>Morganella morganii</i>	>1024	64	32	32	32	256	16	2	128	-
AS 133	<i>Morganella morganii</i>	>1024	4	32	4	<2	4	32	2	8	-
AS 111	<i>Morganella morganii</i>	512	64	32	32	4	128	8	4	128	-
AS 139-2	<i>Morganella morganii</i>	>1024	64	64	16	8	512	32	4	128	-
AS 128-2	<i>Morganella morganii</i>	>1024	32	4	4	<2	512	32	32	64	-

Continua

AS isolates	Identification	Phylogenetic group	Minimum Inhibitory Concentration (µg/mL) Quinolones					Minimum Inhibitory Concentration (µg/mL) Aminoglycosides				Resistance genes
			NAL	NOR	OFX	CIP	LVX	KAN	STR	GEN	AMI	
AS 45	<i>Escherichia coli</i>	A	≥1024	4	16	1	<2	256	16	64	128	-
AS 47	<i>Escherichia coli</i>	A	≥1024	128	32	16	8	4	2	2	8	-
AS 53	<i>Escherichia coli</i>	A	>1024	4	4	1	<2	64	128	128	32	-
AS 58	<i>Escherichia coli</i>	D	>1024	64	16	16	8	8	16	16	16	-
AS 60	<i>Escherichia coli</i>	D	>1024	64	64	32	32	4	16	16	32	<i>qnrS</i>
AS 64	<i>Escherichia coli</i>	A	>1024	1	2	16	<2	256	8	32	16	-
AS 65	<i>Escherichia coli</i>	B2	>1024	32	16	16	8	512	128	256	128	-
AS 66	<i>Escherichia coli</i>	B1	>1024	128	32	64	32	32	8	16	16	-
AS 70	<i>Escherichia coli</i>	D	>1024	64	16	16	8	<2	32	2	16	-
AS 75	<i>Escherichia coli</i>	A	>1024	128	32	1	8	<2	8	4	8	-
AS 81	<i>Escherichia coli</i>	D	>1024	32	16	16	8	<2	2	2	16	<i>qnrS</i>
AS 100-2	<i>Escherichia coli</i>	A	>1024	64	16	16	8	<2	128	2	8	-
AS 82 -2	<i>Escherichia coli</i>	D	>1024	32	64	4	32	512	128	64	128	-
AS 115-2	<i>Escherichia coli</i>	A	512	32	16	16	8	256	128	128	128	-
AS 126	<i>Escherichia coli</i>	D	>1024	8	4	16	<2	512	4	32	128	-
AS 139-1	<i>Escherichia coli</i>	A	>1024	256	64	64	8	128	8	32	16	-
AS 151	<i>Escherichia coli</i>	A	512	4	2	16	<2	128	2	8	16	-
AS 112	<i>Escherichia coli</i>	D	512	64	32	16	8	32	64	64	128	-
AS 80-1	<i>Escherichia coli</i>	A	>1024	32	16	8	<2	4	16	16	32	-
AS 83	<i>Escherichia coli</i>	D	>1024	16	8	4	<2	128	32	16	32	-
AS 85	<i>Escherichia coli</i>	A	>1024	16	2	4	<2	4	16	4	8	-
AS 124	<i>Escherichia coli</i>	D	>1024	4	4	1	<2	8	16	4	8	<i>qnrS</i>
AS 150	<i>Escherichia coli</i>	A	>1024	256	64	64	8	128	2	8	8	<i>qnrS/aac(6')Ib</i>
AS 129-2	<i>Escherichia coli</i>	A	512	4	2	1	<2	<2	16	2	16	-
AS 136	<i>Escherichia coli</i>	A	>1024	16	4	4	<2	4	32	32	16	-
AS 138	<i>Escherichia coli</i>	A	>1024	64	16	16	8	512	32	4	32	-
AS 118	<i>Escherichia coli</i>	B2	>1024	32	4	16	8	512	64	128	128	<i>qnrS</i>
AS 99	<i>Citrobacter freundii</i>		>1024	64	4	4	<2	<2	2	2	4	-
AS 81- 1	<i>Citrobacter freundii</i>		>1024	64	2	1	<2	<2	32	2	4	-
AS 48	<i>Pseudomonas guangdongensis</i>		≥1024	4	2	1	<2	<2	64	2	8	-
AS 49	<i>Pseudomonas guangdongensis</i>		512	256	4	1	<2	8	2	4	16	<i>qnrS</i>
AS 59	<i>Pseudomonas guangdongensis</i>		>1024	4	2	16	<2	256	256	8	128	-
AS 68	<i>Alcaligenes faecalis</i>		>1024	64	32	1	8	4	8	2	4	-

Continua

AS isolates	Identification	Quinolones					Concentration (µg/mL)				Resistance genes
		NAL	NOR	OFX	CIP	LVX	Aminoglycosides				
							KAN	STR	GEN	AMI	
AS 104	<i>Alcaligenes faecalis</i>	>1024	64	16	4	8	256	256	128	128	-
AS 105	<i>Alcaligenes faecalis</i>	>1024	64	32	16	8	128	128	8	8	-
AS 108	<i>Alcaligenes faecalis</i>	512	64	16	4	8	<2	16	1	2	-
AS 106	<i>Alcaligenes faecalis</i>	>1024	64	16	4	8	32	16	8	4	-
AS 107	<i>Alcaligenes faecalis</i>	>1024	32	4	4	<2	256	16	8	16	-
AS 86	<i>Proteus mirabilis</i>	512	32	16	32	8	32	32	32	16	-
AS 125-2	<i>Proteus mirabilis</i>	512	16	4	4	4	512	32	64	128	-
AS103 -1	<i>Providencia rettgeri</i>	>1024	64	32	32	32	256	8	128	32	<i>aac(6')Ib-cr</i>
AS 45 -1	<i>Providencia rettgeri</i>	≥1024	64	4	1	8	8	8	2	16	-
AS 57	<i>Providencia rettgeri</i>	>1024	4	2	1	<2	8	16	2	8	<i>qnrS</i>
AS 135	<i>Providencia rettgeri</i>	512	32	4	16	<2	512	8	8	128	-
AS 69	<i>Enterococcus gallinarum</i>	>1024	4	2	16	8	4	2	32	64	-
AS 140	<i>Shewanella xiamenensis</i>	>1024	4	16	1	<2	256	4	4	128	-

NAL (Nalidixic acid), NOR (Norfloxacin), OFX (Ofloxacin), CIP (Ciprofloxacin), LVX (Levofloxacin), KAN (Kanamycin), STR (Streptomycin), GEN (Gentamicina), AMI (Amikacin)

**Supplementary Table 3 – General features of the *qnrS* and *aac(6')Ib* from Raw Sewage (RS) and Activated Sludge (AS) libraries.**

	<i>qnrS</i>		<i>aac(6')Ib</i>	
	RS	AS	RS	AS
Number of sequences	49	33	81	30
Number of OTUs	4	5	2	2
Good's coverage %	98	88	79	97
Shannon Index	0.65	0.53	0.065	0.146
Simpson Index	0.67	0.76	0.97	0.93

OTU (Operational Taxonomic Unit)

**Supplementary Table 4 – Phylogenetic affiliation of *qnrS* OTUs and isolates based on Blastx protein database**

OTU	Blastx Best Results	Closed Microorganism/ Access number GenBank	ID %	Source
RSqnrS_OTU1	plasmid-mediated quinolone resistance protein S8	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (AHE41345.1)	99	Clinical
RSqnrS_OTU2	quinolone resistance protein	<i>Escherichia coli</i> (AFS33292.1)	100	Animal
RSqnrS_OTU3	QnrS - quinolone resistance protein	<i>Escherichia coli</i> (ABQ16541.1)	96	Animal
RSqnrS_OTU4	quinolone resistance protein	<i>Escherichia coli</i> (AFS33292.1)	100	Animal
ASqnrS_OTU1	quinolone resistance protein	<i>Escherichia coli</i> (AFS33292.1)	99	Animal
ASqnrS_OTU2	quinolone resistance protein variant	<i>Shigella flexneri</i> (AFM75687.1)	99	Clinical
ASqnrS_OTU3	QnrS- quinolone resistance protein	<i>Raoultella sp. PIB7</i> (CDL74400.1)	96	Sewage
ASqnrS_OTU4	quinolone resistance protein	<i>Escherichia coli</i> (AFS33292.1)	99	Animal
ASqnrS_OTU5	plasmid-mediated quinolone resistance protein S8	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (AHE41345.1)	81	Clinical
AS44-1 <i>M. morgani</i>	QnrS - quinolone resistance protein	<i>Escherichia coli</i> (ABQ16541.1)	98	Animal
AS49 <i>P.guangdongensis</i>	QnrS - quinolone resistance protein	<i>Escherichia coli</i> (ABQ16541.1)	100	Animal
AS57 <i>P.rettgeri</i>	quinolone resistance protein variant	<i>Shigella flexneri</i> (AFM75687.1)	100	Clinical
AS60 <i>E. coli</i>	quinolone resistance protein S8-like protein	<i>Aeromonas caviae</i> (AHK12803.1)	100	Clinical
LA81 <i>E. coli</i>	QnrS - quinolone resistance protein	<i>Escherichia coli</i> (ABQ16541.1)	100	Animal
AS118 <i>E. coli</i>	QnrS1 - quinolone resistance protein	<i>Shigella flexneri</i> (ACI42280.1)	100	Reference sequence
AS124 <i>E. coli</i>	QnrS - quinolone resistance protein	<i>Escherichia coli</i> (ABQ16541.1)	100	Animal
AS128-1 <i>M. morgani</i>	QnrS - quinolone resistance protein	<i>Escherichia coli</i> (ABQ16541.1)	100	Animal
AS150 <i>E. coli</i>	QnrS - quinolone resistance protein	<i>Escherichia coli</i> (ABQ16541.1)	99	Animal

OTU (Operational Taxonomic Unit), ASqnrS (sequence from isolates), RSqnrS OUT (OUT from RS), ASqnrS OUT (OUT from AS)

**Supplementary Table 5 – Phylogenetic affiliation of *aac(6')Ib* OTUs and isolates based on Blastx protein database**

OTU	Blastx Best Results	Closed Microorganism/ Access number GenBank	ID %	Source
RSaac_OTU1	AacA8 aminoglycoside acetyltransferase	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (AAS20533.1)	95	Clinical
RSaac_OTU2	aminoglycoside acetyltransferase-6' type Ib	<i>Providencia rettgeri</i> (AAW78355.1)	100	Clinical
ASaac_OTU1	aminoglycoside (6')-N-acetyltransferase	<i>Escherichia coli</i> (ADC80806.1)	97	Clinical
ASaac_OTU2	aminoglycoside (6')-N-acetyltransferase	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (AAD02244.1)	98	Clinical
RS15 <i>Morganella morganii</i>	aminoglycoside-(6')-N-acetyltransferase AAC(6')-Ib	<i>Aeromonas hydrophila</i> (AFK79086.1)	100	Water
RS19 <i>Proteus mirabilis</i>	aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase type Ib-cr	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (AHZ92228.1)	100	Clinical
RS20 <i>Proteus mirabilis</i>	fluoroquinolone acetylating aminoglycoside acetyltransferase	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ABO28757.1)	100	Clinical
RS22 <i>Proteus mirabilis</i>	aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase type Ib-cr	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (AHZ92228.1)	100	Clinical
RS33 <i>Proteus mirabilis</i>	aminoglycoside N6'-acetyltransferase	<i>Klebsiella pneumoniae</i> BIDMC 2A(EWF08648.1)	92	Reference sequence
RS87 <i>Escherichia coli</i>	aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase type Ib-cr	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (AHZ92228.1)	100	Clínico
RS102 <i>Alcaligenes faecalis</i>	aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase type Ib-cr	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (AHZ92228.1)	100	Clinical
AS103-1 <i>Providencia rettgeri</i>	aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase type Ib-cr	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (AHZ92228.1)	100	Clinical
AS117 <i>Morganella morganii</i>	aminoglycoside 6'-N-acetyl transferase type Ib	<i>Vibrio cholerae</i> (ABC54722.1)	100	Clinical
AS150 <i>Escherichia coli</i>	aminoglycoside (6')-N-acetyltransferase	<i>Escherichia coli</i> (ADC80806.1)	100	Clinical
AS151-2 <i>Morganella morganii</i>	aminoglycoside (6') acetyltransferase	<i>Staphylococcus aureus</i> (AGX85857.1)	100	Clinical

OTU (Operational Taxonomic Unit), Asaac (sequence from isolates), Rsaac OTU (OTU from RS), ASaac OTU (OTU from AS)

## **6 - Discussão Geral**

## 6. Discussão Geral

Resistência bacteriana aos antimicrobianos é um problema global de saúde pública. Vários estudos têm mostrado a contribuição do ambiente natural na emergência e disseminação de genes de resistência aos antimicrobianos. As atividades antrópicas contribuem para o aumento da contaminação ambiental com concentrações residuais de diferentes compostos químicos, dentre os quais aqueles com atividade antimicrobiana (WELLINGTON et al., 2013; WANG et al., 2014; SU et al., 2014). Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs) são destacadas como um dos grandes ambientes contaminados por resíduos de antimicrobianos, além de abrigarem uma gama de bactérias em constante processo de adaptação às pressões seletivas. Dentre os antimicrobianos, as quinolonas, uma classe de antimicrobianos de relevância clínica, é atualmente considerada um micropoluente ambiental (VAN DOORSLAERS et al., 2014). As quinolonas são metabolizadas incompletamente pelo organismo humano e animal e são excretados por mamíferos, podendo fazer parte do esgoto, contaminar ambientes aquáticos e terrestres. A resistência bacteriana as quinolonas via transferência horizontal de genes, de particular preocupação em função do seu potencial de disseminação, foi descrita em 1998 e teve sua origem atribuída a bactérias aquáticas (MARTINEZ –MARTINEZ et al., 1998; POIREL et al., 2005). No Brasil, as comunidades bacterianas de ETEs são pouco estudadas. Além disso, os mais frequentes genes de resistência a quinolonas (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS* e *aac(6')Ib-cr*) têm sido investigados apenas em bactérias isoladas de espécimes clínicos, não sendo conhecida a distribuição e diversidade destes genes nestes ambientes, os quais são considerados reservatórios naturais de bactérias resistentes aos antimicrobianos.

Ao contrário das quinolonas, os aminoglicosídeos são sintetizados por bactérias do solo. A estreptomicina, produzida por *Streptomyces griseus*, foi o primeiro antimicrobiano desta classe disponibilizado para uso clínico (SCHATZ et al., 1944; BECKER &

COOPER, 2013). Posteriormente, outros aminoglicosídeos foram disponibilizados, no entanto o amplo uso destes antimicrobianos resultou em desenvolvimento de resistência bacteriana. Dentre os vários mecanismos descritos, destaca-se a modificação enzimática destes compostos. Enzimas como as acetiltransferases, codificadas pelo gene *aac(6')Ib*, são importantes inativadoras de aminoglicosídeos e podem comprometer o seu uso clínico (RAMIREZ & TOLMASKY, 2010). Variantes deste gene são descritos, sendo que o variante *cr* codifica uma enzima com amplo espectro de substrato e tematividade contra aminoglicosídeos e fluoroquinolonas (ROBICSEK et al., 2006; RAMIREZ et al., 2013).

Estudo metagenômico das comunidades bacterianas do esgoto bruto (EB) e lodos ativados (LA) mostrou a dominância de membros pertencentes ao filo Proteobacteria, especialmente as classes Beta e Gamaproteobacteria. Mc Lellan e colaboradores (2010) em um estudo em amostras de esgoto bruto nos Estados Unidos mostraram que o filo Proteobacteria foi o mais abundante, correspondendo a 59% do total da comunidade bacteriana, assim como também demonstrado por estudos prévios (WALNNER et al., 1985; SNAIDR et al., 1997; WAGNER & LOY, 2002). Outro estudo mais recente, conduzido na China por Wang e colaboradores (2014) em várias amostras de esgoto, mostrou que apesar das variações na composição bacteriana de cada amostra, houve um predomínio de Proteobacteria, seguido por Bacteroidetes e Firmicutes. Neste estudo, diferenças na comunidade bacteriana de LA, tais como o enriquecimento de algumas bactérias do filo Bacteroidetes e das classes Gama, Alfa e Deltaproteobacteria, além da redução de Firmicutes, sugerem que este ambiente apresenta características particulares, possivelmente atribuídas a sua função em ETEs. De acordo com estudos prévios em lodos ativados, Proteobacteria foi o filo predominante, enquanto Firmicutes, Bacteroidetes, Acidobacteria e Chroflexi foram subdominantes (ZHANG et al., 2012; HAI et al., 2014). Um dado importante deste trabalho foi a detecção de unidades operacionais taxonômicas

(OTUs) relacionadas aos gêneros *Neisseria*, *Acinetobacter* e *Streptococcus*, nos quais estão incluídas espécies potencialmente patogênicas. No entanto, foi observado menor número de *reads* associadas a esses gêneros em LA, sugerindo que o processo de lodos ativados pode contribuir para redução destes patógenos. A presença de gêneros nos quais estão espécies consideradas patogênicas tem sido revelada em vários estudos metagenômicos, destacando-se *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Vibrio*, *Streptococcus*, *Enterococcus* e *Clostridium* (MC LELLAN et al., 2010; CAI & ZHANG et al., 2013; YE & ZHANG, 2013; WANG et al., 2014).

Estudos em ambientes, incluindo ETEs, têm investigado a presença de integrons classe 1, considerando sua importância na mobilidade de genes entre as bactérias, incluindo genes de resistência aos antimicrobianos (GUO et al., 2011; STALDER et al., 2013; MA et al., 2013). Neste estudo foi observado que a carga bacteriana em LA foi maior do que em EB, porém houve uma redução de células abrigando integron classe 1 em LA, consistente com o estudo de Ma et al. (2013). Foi observado também que a remoção de bactérias abrigando integron classe 1 foi acompanhada de uma redução na abundância relativa de Gamaproteobacteria em LA. Esses dados mostram a importância do tratamento biológico por lodos ativados e sugerem que integrons classe 1 são amplamente distribuídos entre membros de Proteobacteria.

Em contraste com a abordagem metagenômica, a composição bacteriana de EB e LA revelada por cultura sob pressão seletiva com ácido nalidíxico, revelou a presença de bactérias, na maioria, potencialmente patogênicas. Membros da classe Gamaproteobacteria dominaram ambos os ambientes, seguido por Betaproteobacteria. Um único isolado Gram-positivo (*Enterococcus gallinarum*) foi recuperado de LA. Said et al. (2015), em um estudo de diversidade de *Enterococcus* em amostras de ETEs, observaram que *E. gallinarum* foi encontrado em menor frequência. *Enterococcus* spp. têm sido considerados

indicadores biológicos de contaminação fecal de água, sobretudo as espécies *E. faecalis* e *E. faecium* (BOEHM & SASSOUBRE, 2014). Entretanto, membros deste gênero têm sua sobrevivência no ambiente comprometida pela presença de estressores, tais como condições oligotróficas e luz solar (BYAPPANAHALLI et al., 2012).

Como esperado, a maioria dos isolados pertenceram a família Enterobacteriaceae, frequentemente recuperadas de ETes (FERREIRA DA SILVA et al. 2007; KAPLAN et al., 2013). As espécies mais abundantes foram *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* e *Morganella morganii*. Vale ressaltar que, no estudo metagenômico, poucas *reads* foram afiliadas a *Escherichia-Shigella* em EB e LA, assim como também relatado em estudos metagenômicos prévios de ETes (MC LELLAN et al., 2010; YE et al., 2013). O menor número de filos detectados pela abordagem dependente de cultivo se deve, em parte, as limitações dos nutrientes presentes no meio de cultura e aos parâmetros físico-químicos usados no isolamento das bactérias presentes em EB e LA. A análise dos grupos filogenéticos das espécies de *E. coli*, encontradas em proporções similares em EB e LA, mostrou que a maioria das espécies foram classificadas nos grupos A e B<sub>1</sub>, que são frequentes em ambientes aquáticos (ORSI et al., 2008; MOKRACKA et al., 2011). No entanto, deve ser considerado o achado de *E. coli* afiliadas aos grupos B<sub>2</sub> e D, as quais são causadores de infecções extraintestinais em seres humanos (GORDON et al., 2004; JANG et al., 2014).

O perfil de susceptibilidade as fluoroquinolonas e aminoglicosídeos foi determinado para os isolados bacterianos resistentes ao ácido nalidíxico recuperados de EB e LA. Altos valores de concentrações inibitórias mínimas (CIM) para quinolonas e aminoglicosídeos foram observados para os isolados bacterianos recuperados em ambos os ambientes. Dentre os isolados de Enterobacteriaceae, espécies exibindo resistência a todos os antimicrobianos testados neste estudo foram encontradas (*M. morganii*, *E.coli* e *P.*

*mirabilis*). No entanto, foi observada a ocorrência de isolados de Enterobacteriaceae sensíveis a todas as fluoroquinolonas e aminoglicosídeos. De uma maneira geral, os isolados de Enterobacteriaceae de EB foram mais resistentes a quinolonas e aminoglicosídeos do que os de LA, o que contradiz os achados de Kaplan e colaboradores (2013). Esses autores sugerem que os lodos ativados podem favorecer um aumento da resistência bacteriana ao ácido nalidíxico e ciprofloxacina, o que não foi observado no presente estudo. Para os isolados Gram-negativos não Enterobacteriaceae, os baixos valores de CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> encontrados sugerem que a maioria das quinolonas e aminoglicosídeos testados é ativa contra *Pseudomonas guangdongensis* e *Alcaligenes faecalis*. Para *E. gallinarum*, foi observada resistência a algumas fluoroquinolonas e NAL, além de CIM=32 µg/mL para gentamicina, o que é esperado uma vez que *Enterococcus* spp. são intrinsecamente resistentes a baixos níveis de aminoglicosídeos (CERCENADO et al., 2011).

Resistência a quinolonas é originalmente atribuída a mutações em genes cromossômicos (*gyrA*, *gyrB*, *parC* e *parE*). Aos genes de resistência a quinolonas mediados por plasmídios (PMQR), é atribuída resistência em baixos níveis a estes antimicrobianos. Entretanto, a aquisição destes genes apresenta uma vantagem para a seleção de mutantes com resistência cromossômica (ROBICSEK et al., 2006; JACOBY et al., 2014). Os PMQR (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS* e *aac(6')Ib-cr*) são amplamente disseminados em bactérias provenientes tanto do ambiente clínico quanto ambiental e são frequentemente encontrados em membros da família Enterobacteriaceae (JACOBY et al., 2014). Neste estudo, apenas os genes *qnrS* e *aac(6')Ib* foram detectados e apresentaram distribuição distinta entre as amostras. Baixa diversidade destes genes foi observada em ambos os ambientes, mas *qnrS* parece ser mais diverso que *aac(6')Ib*. *qnrS* foi detectado no DNA metagenômico de EB e LA e nos isolados bacterianos recuperados somente de LA,

enquanto *aac(6')Ib* foi encontrado em todas as amostras. É provável que o maior número de isolados abrigando gene de resistência a quinolonas em LA seja em função da maior densidade de células encontradas no lodo ativado, o qual é considerado um *hot spot* para trocas de genes, como sugerido por Szczepanowski e colaboradores (2009). A maioria dos isolados abrigando *qnrS* e *aac(6')Ib* pertenceram a família Enterobacteriaceae, assim como relatado em estudos prévios (JACOBY et al., 2014). No entanto, estes genes também foram detectados em *P. guangdongensis* e *A. faecalis*.

Considerando o potencial de disseminação dos genes *qnrS* e *aac(6')Ib* e a hipótese de reservatório ambiental de resistência bacteriana, é relevante investigar a ocorrência de PMQR em bactérias de ETEs. Este trabalho confirma a presença dos genes *qnrS* e *aac(6')Ib* nos ambientes da ETE e revela a primeira detecção destes genes em *M. morganiie* *P. rettgeri* recuperadas a partir de amostras coletadas em ETE. Além disso, descreve também pela primeira vez *A. faecalis* e *P. guangdongensis* abrigando *aac(6')Ib-cr* e *qnrS*, respectivamente. Deve ser ressaltado que *P. guangdongensis* foi descrita como uma nova espécie em 2013 e até o momento tem sido detectada apenas em amostras ambientais (YANG et al., 2013).

Os poucos estudos que avaliaram a relação da estrutura das proteínas QnrS (CATTOIR et al., 2007; RODRIGUEZ-MARTINEZ et al., 2009; TÁVIO et al., 2014) e Aac(6')Ib (RATHER et al., 1992; SHMARA et al., 2001; POURREZA et al 2005), com a sua atividade por mutagênese sítio-dirigido mostraram que várias substituições de aminoácidos podem ser críticas para a atividade da enzima. O presente estudo revelou substituições nos aminoácidos em QnrS e Aac(6')Ib ainda não descritas em estudos prévios ocorrendo em isolados bacterianos e no ambiente. Algumas destas substituições de aminoácidos ocorreram em posições previamente descritas, mas estas parecem não ter impacto na estrutura molecular destas proteínas. Exceções foram observadas nas alterações

em G52 de QnrS, a qual localiza-se no loop A e em F171 de Aac(6')Ib, ocorrendo no motivo A da proteína. Além disso, foram observadas também sequências acumulando alterações de aminoácidos em posições conservadas localizadas no loop B de QnrS, considerado importante para a resistência a quinolonas. Com relação a Aac(6')Ib, a alteração detectada em L119S, obtida previamente por Rather e colaboradores (1992) em ensaios de mutagênese, ocorreu na maioria das sequências genômicas e metagenômicas. Esse achado sugere que esta alteração é importante para o *fitness* bacteriano, fora do contexto da resistência aos antimicrobianos. Outra alteração frequente em Aac(6')Ib foi R173K, para a qual estudos futuros são necessários para elucidar sua possível interferência na atividade desta enzima. Interessantemente, o gene variante *aac(6')Ib-cr* que apresenta atividade bifuncional para aminoglicosídeos e quinolonas (ROBICSEK et al., 2006) não foi encontrado no DNA metagenômico. No entanto, foram encontradas sequências apresentando a alteração em D181Y, a qual associada com a alteração W104R é requerida para a atividade desta variante da enzima.

## **7- Conclusão Geral**

## 7. Conclusão Geral

As abordagens metagenômica e dependente de cultivo utilizadas neste estudo mostraram-se complementares e possibilitaram uma ampla caracterização da microbiota de EB e LA, revelando a presença de potenciais patógenos humanos. Além disso, permitiram ampliar o conhecimento sobre os genes *qnrS*, *aac(6')Ib* e *aac(6')Ib-cr* circulando nos ambientes das ETEs. Os dados deste estudo mostraram que estes genes estão predominantemente distribuídos entre membros da família Enterobacteriaceae, mas alertam para a sua detecção em um isolado considerado, até o momento, exclusivamente de origem ambiental (*P. guangdongensis*). A baixa diversidade de *qnrS* e *aac(6')Ib* observadas no esgoto bruto e nos lodos ativados sugere que estes genes são altamente conservados, no entanto apresentam alta variabilidade genética, possivelmente em resposta adaptativa ao ambiente, devido as várias alterações de aminoácidos detectadas sem implicações óbvias na atividade das proteínas.

## **8- Referências Bibliográficas**

## 8. Referências bibliográficas

1. AHMED, A.M.; MOTOI, Y.; SATO, M. et al. **Zoo animals as reservoirs of Gram negative bacteria harboring integrons and antimicrobial resistance genes.** *Applied Environmental Microbiology*, v. 73, p. 6686–6690, 2007.
2. AL AUKIDY, M.; VERLICCHI, P.; JELIC, A. et al. Monitoring release of pharmaceutical compounds: occurrence and environmental risk assessment of two WWTP effluents and their receiving bodies in the Po Valley, Italy. *Science of the Total Environment*, v. 438, p.15–25, 2012.
3. ALDRED, K. J., KERNS; R. J. ; OSHEROFF , N. **Mechanism of Quinolone Action and Resistance.** *Biochemistry*, v. 53, p. 1565-1574, 2014.
4. AMINOV, R.I. **Horizontal gene exchange in environmental microbiota.** *Frontiers Microbiology*, v.2, p. 1-19, 2011.
5. ANDREOLI, C.; VON SPERLING, M.; FERNANDES, F. **Lodos de esgotos: tratamento e disposição final** In: Princípios do tratamento biológico de águas residuais, v.6, 484 p., 2001.
6. APPELBAUM, P.C.; HUNTER, P.A. **The fluoroquinolone antibacterials: past, presente and future perspectives.** *International Journal of Antimicrobial Agents*, v.16, p.5-15, 2000.
7. ARAUJO, S.M.; MOURAO, T.C.; OLIVEIRA, J.L. et al. **Antimicrobial resistance of uropathogens in women with acute uncomplicated cystitis from primary care settings.** *International Urology and Nephrology*, v.43, p. 461–466, 2011.
8. BABIĆ, S.; PERIŠA, M. ŠKORIĆ, I. **Photolytic degradation of norfloxacin, enrofloxacin and ciprofloxacin in various aqueous media.** *Chemosphere*, v. 91, p. 1635–1642, 2013.
9. BACKHAUS, T., SCHOLZE, M., GRIMME, L.H. **The single substance and mixture toxicity of quinolones to the bioluminescent bacterium *Vibrio fischeri*.** *Aquatic Toxicology*, v. 49, 49–61, 2000.
10. BANSAL, S.; TANDON, V. **Contribution of mutations in DNA gyrase and topoisomerase IV genes to ciprofloxacin resistance in *Escherichia coli* clinical isolates.** *International Journal of Antimicrobial Agents*, v.37, p. 253-255, 2011.
11. BAQUERO, F., MARTÍNEZ, J.L., CANTÓN, R. **Antibiotics and antibiotic resistance in water environments.** *Current Opinion in Biotechnology*, v.19, p.260–265, 2008.
12. BARRAUD O.; BADELL E.; DENIS F. et al. **Antimicrobial drug resistance in *Corynebacterium diphtheriae mitis*.** *Emerging Infectious Diseases Journal*, v. 17, p. 2078–2080, 2011.
13. BATT, A.L.; BRUCE, B.; AGA, D.S. **Evaluating the vulnerability of surface waters to antibiotic contamination from varying wastewater treatment plant discharges.** *Environmental Pollution*, v. 142, p. 295-302, 2006.
14. BECKER, B.; COOPER, M. A. **Aminoglycoside Antibiotics in the 21st Century.** *ACS Chemical Biology*, v. 8, p. 105–115, 2013.
15. BLONDEAU, J.M. **Fluoroquinolones: Mechanism of action, classification, and development of resistance.** *Survey of Ophthalmology*, v.49, p.73-78, 2004.
16. BOEHM, A.; SASSOUBRE, L.M. **Enterococci as indicators of environmental fecal contamination.** In: Gilmore, M.S.; Cleveland, D.B.; Ike, Y.; Shankar, N. Enterococci, from commensals to leading causes of drug resistant infectious (internet). *Massachusetts Eye and Ear Infirmary*, Boston, 2014. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190421/>

17. BONELLI, R. R.; MOREIRA, B. M.; PICÃO, R. C. **Antimicrobial resistance among Enterobacteriaceae in South America: history, current dissemination status and associated socioeconomic factors.** *Drug Resistance Updates*, v, 17(1-2), p. 24–36, 2014.
18. BOYD, L.B.; MAYNARD, M.J.; MORGAN-LINNEL, S.; HORTON, L.B. et al. **Relationships among ciprofloxacin, gatifloxacin, levofloxacin and norfloxacin MICs for fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* clinical isolates.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 53,p. 229-234, 2009.
19. BYAPPANAHALLI, M.N.; NEVERS, M.B.; KORAJKIC, A. et al. **Enterococci in the environment.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.76, p. 685-706, 2012.
20. CAI, L.; ZHANG, T. **Detecting Human Bacterial Pathogens in Wastewater Treatment Plants by a High-Throughput Shotgun Sequencing Technique.** *Environmental Science and Technology*,v.47, 5433–5441, 2013.
21. CAMBRAY, G.; GUEROUT, A.M.; MAZEL, D. **Integrans.** *Annual Review of Genetics*, v.44, p. 141–166, 2010.
22. CANO, M.E.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, J.M.; AGUERO, J.; PASCUAL, A.; CALVO, J. et al. **Detection of plasmid-mediated quinolone resistance genes in clinical isolates of *Enterobacter* spp in Spain.** *Journal Clinical of Microbiology*, v.47, n. 07, p. 2033-2039, 2009.
23. CARATTOLI, A. **Plasmids and the spread of resistance.***International Journal of Medical Microbiology*, v.303, p. 298– 304, 2013.
24. CARATTOLI, A. **Resistance Plasmid Families in *Enterobacteriaceae*.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.53, p.2.228-38, 2009.
25. CATTOIR V.; POIREL L.; MAZEL D. et al. ***Vibrio splendidus* as the source of plasmid-mediated QnrS-like quinolone resistance determinants.** *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v.51, p. 2650–2651, 2007.
26. CATTOIR, V.; POIREL, L.; NORDMAN, P. **Plasmid-mediated quinolone resistance pump QepA2 in an *Escherichia coli* isolate from France.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.52, p.3.801-3804, 2008.
27. CAVACO, L. M.; HASMAN, H.; XIA, S.; AARESTRUP, F.M. ***qnrD*, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* Serovar Kentucky and Bovismorbificans strains of human origin.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.53, p.603-608, 2009b.
28. CAVACO, L.M., AARESTRUP, F.M. **Evaluation of quinolones for detection of acquired quinolone resistance, including the new transmissible resistance mechanisms (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS* and *aac(6')Ib-cr*) in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* and determinations of wild type distributions.** *Journal Clinical of Microbiology*, v. 47, p. 2752-2758, 2009a.
29. CERCENADO, E. ***Enterococcus*: resistencias fenotípicas y genotípicas y epidemiología em España.** *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, v.29, p. 59-65, 2011.
30. CESARO, A.; BETONNI, R.R.D.; LASCOLS, C.; MÉRENS, A.; SOUSSY, C. J.; CAMBAU, E. **Low selection of topoisomerase mutants from strains of *Escherichia coli* harbouring plasmid-borne *qnr* genes.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.61, p. 1007 -1015, 2008.
31. CHENIA, H.Y.; PILLAY, B.; PILLAY, D. **Analysis of the mechanisms of fluoroquinolone resistance in urinary tract pathogens.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.58, p. 1274 - 1278, 2006.

32. CORDEIRO, N.F.; ROBINO, L.; MEDINA, J. et al. **Ciprofloxacin-resistant enterobacteria harboring the *aac(6')-Ib-cr* variant isolated from feces of inpatients in an intensive care unit in Uruguay.** *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v. 52, p. 806–807, 2008.
33. COUCE, A.; BLAZQUEZ, J. **Side effects of antibiotics on genetic variability.** *FEMS Microbiology Review*, v. 33, p. 531-538, 2009.
34. DALHOFF, A. **Global fluorouinolone resistance epidemiology and implications for clinical use.** *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, v.2012, p. 1-37, 2012.
35. DAVIES, J. **Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes.** *Science*, v.264, p. 375-382, 1994.
36. DECENTRALIZED WASTEWATER GLOSSARY, 2009. Disponível em <http://www.biomicrobics.com/>.
37. DEVARAJAN, N.; LAFFITE, A.; GRAHM, N.D. et al. **Accumulation of clinically relevant antibiotic-resistance genes, bacterial load, and metals in freshwater lake sediments in Central Europe.** *Environmental Science & Technology*, v. 49, p. 6528-6537, 2015.
38. DRLICA, K.; HIASA, H.; KERNS, R. **Quinolones: Action and resistance updated.** *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v. 9, p. 981–998, 2009.
39. DU, J.; REN, H.; GENG, J.; ZHANG, Y. **Occurrence and abundance of tetracycline, sulfonamide resistance genes, and class 1 integron in five wastewater treatment plants.** *Environmental Science and Pollution Research*, v. 21, p. 7276-7284, 2014.
40. DUESBERG C.B.; MALHOTRA-KUMAR S.; GOOSSENS H. et al. **Interspecies recombination occurs frequently in quinolone resistance determining regions of clinical isolates of *Streptococcus pyogenes*.** *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v. 52, p. 4191–4193, 2008.
41. EVERETT, M.J.; JIN, Y.F.; RICCI, V.; PIDDOCK, J.V. **Contributions of individuals mechanisms to fluoroquinolone resistance in 36 *E. coli* strains isolated from humans and animals.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 40, p.2380 -2386, 1996.
42. FERRÁNDIZ, M.J.; FENOLL, A.; LINARES J.; DE LA CAMPA, A.G. **Horizontal transfer of *parC* and *gyrA* in fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*.** *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v. 44, p. 840–847, 2000.
43. FERRARI, R.; GALIANA, A.; CREMADES, R.; RODRIGUEZ, J.C.; MAGNANI, M.; TOGNIM, M.C. et al. **Plasmid-mediated quinolone resistance by genes *qnrA1* and *qnrB19* in *Salmonella* strains isolated in Brazil.** *Journal Infection Developing Countries*, v.5, p.496-498, 2011.
44. FERREIRA DA SILVA, M.; VAZ-MOREIRA, I.; GONZALEZ-PAJUELO, M. et al. **Antimicrobial resistance patterns in Enterobacteriaceae isolated from an urban wastewater treatment plant.** *FEMS Microbiology Ecology*, v. 60(1), p. 166–176, 2007.
45. FERREIRA, F.D.; CORAIOLA, M. **Eficiência do lodo ativado em fluxo contínuo para tratamento de esgoto.** *Revista Acadêmica Ciência Agrária e Ambiental*, v.6(2), p. 259-279, 2008.
46. FLUIT, A.C.; SCHMITZ, F.J. **Resistance integrons and super-integrons.** *Clinical Microbiology and Infection*, v. 10, p. 272–288, 2004.
47. FONSECA, E. L.; DOS SANTOS FREITAS, F.; VIEIRA, V. V.; VICENTE, A. **New *qnr* gene cassettes associated with superintegron repeats in *Vibrio cholerae* O1.** *Emerging Infectious Diseases*, v. 14, p. 1129–1131, 2008.
48. FRIEDMAN, S.; LU, T.; DRLICA, K. **Mutation in the DNA gyrase A gene of *Escherichia coli* that expands the quinolone resistance-determining region.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.45, p.2378- 2380, 2001.

49. GALES, A.C.; CASTANHEIRA, M.; JONES, R.N.; SADER, H.S. **Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008–2010).** *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v.73, p. 354–360, 2012.
50. GALIMAND, M.; SABTCHEVA, S.; COURVALIN, P.; LAMBERT, T., 2005. **Worldwide disseminated *armA* aminoglycoside resistance methylase gene is borne by composite transposon Tn1548.** *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v. 49, p. 2949–2953, 2005.
51. GAO, L.; SHI, Y.; LI, W. et al. **Occurrence of antibiotics in eight sewage treatment plants in Beijing, China.** *Chemosphere*, v.86, p. 665–671, 2012.
52. GAY, K.; ROBICSEK, J.; STRAHILEVITZ, C.; PARK, H.; JACOBY, G.; et al. **Plasmid-mediated quinolone resistance in non-Typhi serotypes of *Salmonella enterica*.** *Clinical Infectious Disease*, v.43, p. 297-304, 2006.
53. GAZE, W.H.; ZHANG, L.; ABDOUSLAM, N.A. et al. **Impacts of anthropogenic activity on the ecology of class 1 integrons and integrin-associated genes in the environment.** *The ISME Journal*, v. 5, p. 1253-1261, 2011.
54. GIEDRAITIENĖ, A.; VITKAUSKIENE, A.; NAGINIENE, R. et al. **Antibiotic Resistance Mechanisms of Clinically Important Bacteria.** *Medicina (Kaunas)*, v.47(3), p.137-46, 2011.
55. GOMES, G.C.; LOPES, C.C.; MARONA, H.R.N. **Quinolonas: aplicações clínicas.** *Revista Brasileira de Medicina*, p 57- 64, 2003.
56. GORDON, D.M. **The influence of ecological factors on the distribution and genetic structure of *Escherichia coli*.** In: *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology*. Neidhardt, F. et al., Washington, DC, 2004.
57. GRACIA-PAEZ, J. I.; FERRAZ, J. R.; SILVA, I. A. F. E. et al. 2013). ***Smqnr* variants in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia* in Brazil.** *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 55(6), p. 417–420, 2013.
58. GUAN, X.; XUE, X.; LIU, Y. et al. **Plasmid mediated quinolone resistance-current knowledge and future perspectives.** *Journal of International Medical Research*, v. 41, p. 20–30, 2013.
59. GUINDON S.; DUFAYARD J. F.; LEFORT V. et al. **New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0.** *Systematic Biology*, v. 59, p.307–321, 2010.
60. GUO L.; ZHANG J.; XU C. et al. **Molecular characterization of fluoroquinolone resistance in *Haemophilus parasuis* isolated from pigs in South China.** *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, v. 66, p. 539–542, 2011.
61. Gürtler V. & Stanisich V.A. (1996) **New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S–23S rDNA spacer region.** *Microbiology*, 142:3–16.
62. HAI, R., WANG; Y., WANG, X.; LI, Y.; DU, Z. **Bacterial community dynamics and taxa-time relationships within two activated sludge bioreactors.** *PloS One*,v. 9(3), e90175, 2014.
63. HALL R.M.; COLLIS C.M. **Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination.** *Molecular Microbiology*, v. 15, p. 593-600, 1995.
64. HANSEN, L.H.; JOHANNESSEN, E.; BURMOLLE, M.; SORENSEN, A.H.; SORENSEN, S.J. **Plasmid-encoded multidrug efflux pump conferring resistance to olanzapine in *Escherichia coli*.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.48, p. 3332- 3337, 2004.

65. HATA, M.; SUZUKI, M.; MATSUMOTO, M.; TAKAHASHI, M.; SATO, K.; IBE, S.; SAKAE, K. **Cloning of a novel gene for quinolone resistance from a transferable plasmid in *Shigella flexneri* 2b.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.49, p. 801-803, 2005.
66. HAWKEY, P. M.; JONES, A. M. **The changing epidemiology of resistance.** *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 64 Suppl 1, 3–10, 2009.
67. HENRIQUES, I.; MOURA, A.; ALVES, A., SAAVEDRA, M.J., CORREIA, A. **Analysing diversity among beta-lactamase encoding genes in aquatic environments.** *FEMS Microbiology Ecology*; v.56, p. 418–429, 2006.
68. HERNÁNDEZ, A.; SÁNCHEZ, M.B.; MARTÍNÉZ, J. **Quinolone resistance: much more than predicted.** *Frontiers Microbiology*, v.2, p.1-6, 2011.
69. HERNANDO, M.D.; VETTORI, S.D.; BUENO, M.J.M; FERNANDEZ-ALBA, A.R. **Toxicity evaluation with *Vibrio fischeri* test of organic chemicals used in aquaculture.** *Chemosphere*, v. 68, p. 724-730, 2007.
70. HOOPER, D.C. **Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance.** *Emerging Infectious Disease*, v. 7, p. 337-341, 2001.
71. HOOPER, D.C.; WOLFSON, J.S. **The fluoroquinolones: pharmacology, clinical uses and toxicities in humans.** *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v. 28, p. 716-721, 1985.
72. HOPKINS, K.L.; DAVIES, R.H.; THRELFALL, E.J. **Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments.** *International Journal of Antimicrobial Agents*, v.25, p. 358-373, 2005.
73. HOUGHTON, J.L.; GREEN, K.D.; CHEN, W. et al. **The future of aminoglycosides: the end or renaissance?** *Chembiochem*, v.11, p. 880–902, 2010.
74. JACOBY G.A.; GRIFFIN C.; HOOPER D.C. ***Citrobacter* spp. as a source of *qnrB* alleles.** *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v. 55, p. 4979–4984, 2011.
75. JACOBY, G. A.; GACHARNA, N.; BLACK, T. A.; MILLER, G.H.; HOOPER, D.C. **Temporal appearance of plasmid-mediated quinolone resistance genes.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.53, n. 04, p. 1665 -1666, 2009.
76. JACOBY, G.; CATTOIR, V.; HOOPER et al. D. ***qnr* gene nomenclature.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; v. 52, p. 2297-2209, 2008.
77. JACOBY, G.A.; STRAHILEVITZ, J.; HOOPER, D.C. **Plasmid-mediated quinolone resistance.** *Microbiology Spectrum*, v. 2, p. 1- 42, 2014.
78. JACOBY, G.A.; WALSH, K.E.; MILLIS, D.M.; WALKER, V.J.; OH, H.; ROBICSEK, A.; HOOPER, D.C. ***qnrB*, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.50, p.1178-1182, 2006.
79. JANG, J.; DI, D.Y.W.; LEE, A. et al. **Seasonal and genotypic changes in *Escherichia coli* phylogenetic groups in the Yeongsan River Basin of South Korea.** *Plos One*, v. 9, e100585, 2014.
80. JANOIR C.; PODGLAJEN I.; KITZIS M.D. et al. **In vitro exchange of fluoroquinolone resistance determinants between *Streptococcus pneumoniae* and viridans streptococci and genomic organization of the *parE*–*parC* region in *S. mitis*.** *Journal Infectious Diseases*, v. 180, p. 555–558, 1999.
81. JIA, A.; WAN, Y.; XIAO, Y.; HU, J. **Occurrence and fate of quinolone and fluoroquinolone antibiotics in a municipal sewage treatment plant.** *Water Research*, v. 46(2), p. 387–394, 2012.

82. JONES, G.L.; WARREN, R.E.; SKIDMORE, S.J.; DAVIES, V.A.; GIBREEL, T. and UPTON, M. **Prevalence and distribution of plasmid-mediated quinolone resistance genes in clinical isolates of *Escherichia coli* lacking extended-spectrum  $\beta$ -lactamases.** *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, v. 62, p. 1245-1251, 2008.
83. JONES, R.N.; GUZMAN-BLANCO, M.; GALES, A.C. et al. **Susceptibility rates in Latin American nations: report from a regional resistance surveillance program (2011).** *Brazilian Journal Infectious Diseases*, v.17, p. 672-681, 2013.
84. JÜNEMANN, S.; PRIOR, K. SZCZEPANOWSKI, R. et al. **Bacterial community shift in treated periodontitis patients revealed by ion torrent 16S rRNA gene amplicon sequencing.** *PLoS One*, v,7, e41606, 2012.
85. JUNG, C. M.; HEINZE, T. M.; STRAKOSHA, R. et al. **Acetylation of fluoroquinolone antimicrobial agents by an *Escherichia coli* strain isolated from a municipal wastewater treatment plant.** *Journal of Applied Microbiology*, v.106(2), p.564–571, 2009.
86. KAPLAN, E.; OFEK, M.; JURKEVITCH, E.; CYTRYN, E. **Characterization of fluoroquinolone resistance and qnr diversity in Enterobacteriaceae from municipal biosolids.** *Frontiers in Microbiology*, v.4:144, eCollection, 2013.
87. KEMPER, N. (2008) **Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment.** *Ecological Indicators*, v. 8, p. 1-13, 2008.
88. KIM, H.B.; PARK, C.H.; KIM, C.J.; KIM, E.C.; JACOBY, G.A.; HOOPER, D.C. **Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants over 9-year period.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.53, p. 639 -645, 2009.
89. KOHANSKI, M.A.; DWYER, D.J.; COLLINS, J.J. **How antibiotics kill bacteria: from targets to networks.** *Nature Reviews*, v.8, p. 423-435, 2010.
90. KUMMERER, K. **Antibiotics in the aquatic environment.** *Department of Environmental Health Sciences*, p. 435-441, 2008.
91. LI, W; SHI, Y., GAO, L. et al. **Occurrence of antibiotics in water, sediments, aquatic plants, and animals from Baiyangdian lake in North China.** *Chemosphere*, v. 89, p. 1307-1315, 2012.
92. LI, X-Z. **Quinolone resistance in bacteria: emphasis on plasmid-mediated mechanisms.** *International Journal of Antimicrobial Agents*, v.25, p. 453-463, 2005.
93. LINDGREN, P.K.; KARLSSON, A.; HUGHES, D. **Mutation rate and evolution of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolates from patients with urinary tract infections.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 47, p. 3222-3232, 2003.
94. LIU, X.C.; ZHANG, Y.; YANG, M. et al. **Analysis of bacterial community structure in two sewage treatment plants with different sludge properties and treatment performance by nested PCR-DGGE method.** *Journal of Environmental Science*, v. 19, p. 60-66, 2007.
95. LIU, L.; LI, Y.; LI, S.; HU, N. et al. **Comparison of next-generation sequencing systems.** *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, Article ID 251364, p.1-11, 2012.
96. LUCENA, R.M. **Identificação molecular da diversidade microbiana em reator UASB de estação de tratamento de esgoto.** Dissertação – Universidade Federal Pernambuco, 2008.
97. LUO, Y.; GUO, W.; NGO, H.H. et al. **A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment.** *Science of the Total Environment*, v. 473-474, p. 619-641, 2014.
98. MA, L.; ZHANG, X-X; ZHAO, F. et al. **Sewage treatment plant serves as a hot-spot reservoir of integrons and gene cassettes.** *Journal of Environmental Biology*, v. 34, p. 391-399, 2013.

99. MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. São Paulo: Prentice Hall, 10ª ed., 2004.
100. MAGNET, S.; BLANCHARD, J.S. **Molecular insights into aminoglycoside action and resistance**. *Chemical Reviews*, v. 105, p. 477-498, 2005.
101. MARDIS, E.R. **Next-generation DNA sequencing methods**. *Annual Review of Genomics and Human Genetic*, v. 9, p. 387-402, 2008.
102. MARTINEZ-MARTINEZ, L.; GARCIA, I.; BALLESTA, S. et al. **Energy dependent accumulation of fluoroquinolones in quinolone resistant *Klebsiella pneumoniae* strains**. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.42, p. 1850 -1852, 1998.
103. MC LELLAN, S L; HUSE, S. M.; MUELLER-SPITZ, S. R. et al. **Diversity and population structure of sewage-derived microorganisms in wastewater treatment plant influent**. *Environmental Microbiology*, v.12(2), p.378–392, 2010.
104. MESA, R.J.; BLANC, V., BLANCH, A.R., et al. **Extended-spectrum betalactamase-producing Enterobacteriaceae in different environments (humans, food, animal farms and sewage)**. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 58, p. 211–215, 2006.
105. MINARINI, L.A.R.; DARINI, A.L.C. **Mutations in the quinolone resistance-determining regions of Gyra and Parc in Enterobacteriaceae isolates from Brazil**. *Brazilian Journal of Microbiology*, p. 1309-1314, 2012.
106. MINARINI, L.A.R.; POIREL, L. et al. **Plasmid-mediated quinolone resistance determinants among enterobacterial isolates from outpatients in Brazil**. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.62, p. 474-478, 2008.
107. MOKRACKA, J.; KOCZURA, R.; JABŁOŃSKA, L.; KAZNOWSKI, A. **Phylogenetic groups, virulence genes and quinolone resistance of integron-bearing *Escherichia coli* strains isolated from a wastewater treatment plant**. *Antonie van Leeuwenhoek*, v.99,p. 817–824, 2011.
108. MONTERO, C.; MATEU; G.; RODRIGUEZ; R.; TAKIFF, H. **Intrinsic resistance of *Mycobacterium smegmatis* to fluoroquinolones may be influenced by new pentapeptide protein MfpA**. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.45, p.3387 - 3392, 2001.
109. MOON, C.D.; SEOL, S.Y., GURUNG, M.; JIN, J.S. et al. **Emergence of a new mutation and its accumulation in the topoisomerase IV gene confers high levels of resistance to fluoroquinolone in *Escherichia coli* isolates**. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 35, p. 76-79, 2010.
110. MULLIS, K.B.; FALOONA, F.A. **Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction**. *Methods in Enzymology* , v.155, p.335-350, 1987.
111. NAIDOO, S.; OLANIRAN, A. O. **Treated wastewater effluent as a source of microbial pollution of surface water resources**. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v.11, p. 249–270, 2014.
112. NAKAMINAMI, H.; NOGUCHI, N.; SASATSU, M. **Fluoroquinolone efflux by the plasmid mediated multidrug efflux pump QacB variant QacBIII in *Staphylococcus aureus***. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*,v. 54, p. 4107-4111, 2010.
113. NASCIMENTO, A.M.A. **Use of the rRNA operon and genomic repetitive sequences for the identification of bacteria**. In: Bruijn J, Willey J *Handbook of Molecular Microbial Ecology I: Metagenomics and Complementary Approaches*, 2011.
114. NIKAIIDO, H.; ZGURSKAYA, H.I. **AcrAB and related multidrug efflux pumps of *Escherichia coli***. *Journal Molecular Microbiology Biotechnology*, v.3, p. 215-218, 2001.

115. NOCKER, A.; BURR, M.; CAMPER, A.K. **Genotypic microbial community profiling: a critical technical review.** *Microbial Ecology*, v. 54, p. 276-289, 2007.
116. NORDMANN, P.; POIREL, L. **Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in *Enterobacteriaceae*.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.56, p. 463-469, 2005.
117. NORDSTROM, K. **Plasmid R1 – replication and its control.** *Plasmid*, v. 55, p.1–26, 2005.
118. ORSI, R.H.; STOPPE, N.C.; SATO, M.I.Z. et al. **Phylogenetic group distribution among *Escherichia coli* isolated from rivers in São Paulo, Brazil.** *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 24, p. 1573-1577, 2008.
119. PACHECO, A.J.; PACHECO, A.J.; POLO, M.A.A., OSCAÑA, M.N. **Resistencias a quinolonas en aislados clínicos de *Escherichia coli* productores de betalactamasas de espectro extendido.** *Higiene y Sanidad Ambiental*, v. 9, p. 449-466, 2009.
120. PAIVA, M.C., NASCIMENTO, A.M., CAMARGO, I.L. **The first report of the *qnrB19*, *qnrS1* and *aac(6)-Ib-cr* genes in urinary isolates of ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* in Brazil.** *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, v. 107, p. 687–689, 2012.
121. PAIVA, M.C.; ÁVILA, M.P.; REIS, M.P. et al. **The Microbiota and Abundance of the Class I Integron-Integrase Gene in Tropical Sewage Treatment Plant Influent and Activated Sludge.** *Plos One*, p. 1-12, 2015.
122. PALLECCHI, L.; RICCOBONO, E.; MANTELLA, A. et al. **High prevalence of *qnr* genes in comensal *Enterobacteria* from healthy children in Peru and Bolivia.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.53, p. 2632-2635, 2009.
123. PARTRIDGE, S.R.; TSAFNAT, G.; COIERA, E.; IREDELL, Jr. 2009. **Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons.** *FEMS Microbiology Review*, v. 33(4), p. 757-784, 2009.
124. PELLEGRINI, C.; CELENZA, G.; SEGATORE, B. et al. **Occurrence of class 1 and 2 integrons in resistant *enterobacteriaceae* collected from a urban wastewater treatment plant: first report from central Italy.** *Microbial Drug Resistance*, v. 17, p. 229–234, 2011.
125. PERRY, J.A.; WRIGHT, G.D. **The antibiotic resistance “mobilome”: searching for the link between environmental and clinic.** *Frontiers in Microbiology*, v. 4, p. 1-7, 2013.
126. PICÃO, R.C.; POIREL, L.; DEMARTA, A.; SILVA, C.S.; CORVAGLIA, A.R.; PETRINI, O.; NORDMANN, P. **Plasmid-mediated quinolone resistance in *Aeromonas allosaccharophila* recovered from a Swiss lake.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.62, p. 948-950, 2008.
127. POIREL, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, J.M.; MAMMERI, H.; LIARD, A.; NORDMANN, P. **Origin of plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrA.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 49, p. 3523-3525, 2005.
128. PONS, M.J.; GOMES, C.; RUIZ, J. **QnrVC, a new transferable Qnr-like family.** *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, v. 31, 191-194, 2013.
129. PONTES, D,S.; LIMA-BITTENCOURT, C.I.; CHARTONE-SOUZA, E.; NASCIMENTO, A.M.A. **Molecular approaches: advantages and artifacts in assessing bacterial diversity.** *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 120, p.95-99, 2007.
130. POURREZA, A.; WITHERSPOON, M.; FOX, J. et al. **Mutagenesis Analysis of a Conserved Region Involved in Acetyl Coenzyme A Binding in the Aminoglycoside 6 N -Acetyltransferase Type Ib Encoded by Plasmid pJHCMW1.** *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v. 49(7), p. 2979–2982, 2005.

131. PRADO, T., PEREIRA, W.C., SILVA, D.M. et al. **Detection of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in effluents and sludge of a hospital sewage treatment plant.** *Letters Applied Microbiology*, v.46: 136–141, 2008.
132. QUIROGA, M.P.; ANDRES, P.; PETRONI, A. et al. **Complex class 1 integrons with diverse variable regions, including *aac(6')-Ib-cr*, and a novel allele, *qnrB10*, associated with ISCR1 in clinical enterobacterial isolates from Argentina.** *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v. 51, p. 4466–4470, 2007.
133. RAMIREZ, M. S.; NIKOLAIDIS, N.; TOLMASKY, M. E. **Rise and dissemination of aminoglycoside resistance: the *aac(6')-Ib* paradigm.** *Frontiers in microbiology*, v. 121, eCollection, 2013.
134. RAMIREZ, M.S; TOLMASKY, M. E. **Aminoglycoside modifying enzymes.** *Drug Resistance Updates*, v. 13(6), p. 151–171, 2010.
135. RAPPÉ, M.S.; GIOVANNONI, S.J. **The uncultured microbial majority.** *Annual Review Microbiology*, v. 57, p. 369-394, 2003.
136. RATHER, P. N.; MUNAYYER, H.; MANN, P. A. et al. **Genetic Analysis of Bacterial Acetyltransferases: identification of amino acids determining the specificities of the aminoglycoside 6'-N-Acetyltransferase Ib and IIa proteins** *Journal Of Bacteriology*, v. 174(10), p. 3196–3203, 1992.
137. ROBICSEK, A.; STRAHILEVITZ, J.; JACOBY, G.A. MACIELAG, M. et al. **Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase.** *Nature Medicine*, v. 12, p. 83-88, 2006.
138. ROCHA, J.L., TUON, F.F., JOHNSON, J.R. **Sex, drugs, bugs, and age: rational selection of empirical therapy for outpatient urinary tract infection in an era of extensive antimicrobial resistance.** *Brazilian Journal Infectious Diseases*, v. 16, p. 115–121, 2012.
139. RODRIGUES-SILVA, C.; MANIERO, M.G.; PERES, M.S.; GUIMARÃES, J.R. **Ocorrência e degradação de quinolonas por processos oxidativos avançados.** *Química Nova*, v.37 (5), p. 868-885, 2014.
140. RODRIGUEZ – MARTINES, J.M.; PASCUAL, A.; GARCIA, I. et al. **Detection of the plasmid – mediated quinolone resistance determinant *qnr* among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* producing AmpC-type  $\beta$  – lactamase.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.52, p. 703-706, 2003.
141. RODRIGUEZ-MARTINEZ, J.M.; BRIALES, A.; VELASCO, C. et al. **Mutational analysis of quinolone resistance in the plasmid-encoded pentapeptide repeat proteins QnrA, QnrB and QnrS.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.63, p. 1128-1134, 2009.
142. RODRIGUÉZ-MARTINÉZ, J.M.; CANO, M.E.; VELASCO, C.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; PASCUAL, A. **Plasmid-mediated quinolone resistance: an update.** *Journal of Infection and Chemotherapy*, v.17, p.149-182, 2011.
143. RODRIGUEZ-ROJAS, A.; RODRIGUEZ-BELTRAN, J.; COUCE, A. et al. **Antibiotics and antibiotic resistance: a bitter fight against evolution.** *International Journal of Medical Microbiology*, v. 303, p. 293-297, 2013.
144. RUIZ, E.; SÁENZ, Y.; ZARAZAGA, M. et al. ***qnr*, *aac(6')-Ib-cr* and *qepA* genes in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp.: genetic environments and plasmid and chromosomal location.** *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 67(4), p. 886–97, 2012.
145. RUIZ, J. **Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.51, p. 1109-1117, 2003.

- 146.SAID, L.B.; KLIBI, N.; LOZANO, C. **Diversity of enterococcal species and characterization of high-level aminoglycoside resistant enterococci of samples of wastewater and surface water in Tunisia.** *Science of Total Environment*, v. 530-531, p. 11-17, 2015.
- 147.SANDEGREN, L. **Selection of antibiotic resistance at very low antibiotic concentrations.** *Upsala Journal of Medical Sciences*, v. 119(2), p. 103–107, 2014.
- 148.SANGER, F., NICKLEN S.; COULSON, A.R. **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 74, p. 5463-5467, 1977.
- 149.SCHATZ, A.; BUGIE, E.; WAKSMAN, S. A. **Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against Gram positive and Gram negative bacteria.** *Proceeding Society Experimental Biology Medicine*, v. 55, p. 66–69, 1944.
- 150.SCHLÜTER, A.; SZCZEPANOWSKI, R.; PÜHLER, A.; TOP, E.M. **Genomics of IncP-1 antibiotic resistance plasmids isolated from wastewater treatment plants provides evidence for a widely accessible drug resistance gene pool.** *Federation of European Microbiological Societies (FEMS Microbiol Rev)*, v.31, p. 449-477, 2007.
- 151.SHEIK, A. R.; MULLER, E. E. L.; WILMES, P. **A hundred years of activated sludge: time for a rethink.** *Frontiers in Microbiology*, v. 5, p. 1 -7, 2014.
- 152.SHI, L.; ZHENG, M.; XIAO, Z. et al. **Unnoticed spread of class 1 integrons in Gram-positive clinical strains isolated in Guangzhou, China.** *Microbiology and Immunology*, v. 50, p. 463–467, 2006.
- 153.SHIMIZU K.; KIKUCHI K.; SASAKI T. et al. **Smqnr, a new chromosome-carried quinolone resistance gene in *Stenotrophomonas maltophilia*.** *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v. 52, p.3823- 3825, 2008.
- 154.SHINTANI, M.; SANCHEZ, Z.K.; KIMBARA, K. **Genomics of microbial plasmids: classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy.** *Frontiers in Microbiology*, v.6, p.1-16, 2015.
- 155.SHMARA, A. L. I.; WEINSETEL, N.; DERY, K. E. N. J. et al. **Systematic analysis of a conserved region of the aminoglycoside 6 N -acetyltransferase type Ib,** *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, v. 45, p. 3287–3292, 2001.
- 156.SILVA, A.V.A.; VON SPERLING, M.; OLIVEIRA FILHO, J.M. **Avaliação das unidades de tratamento do lodo em uma ETE de lodos convencional submetida a distintas estratégias operacionais.** *Engenharia Sanitária Ambiental*, v.12, p. 127-133, 2007.
- 157.SMILLIE, C.; GARCILLAN-BARCIA, M.P.; FRANCA, M.V. et al. **Mobility of plasmids.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.74, p. 434-452, 2010.
158. SMITH, A.; PENNEFATHER, P.M.; KAYE, S.B.; HART, C.A. **Fluoroquinolones: place in ocular therapy.** *Drugs*, v.61, p. 747-761, 2001.
- 159.SNAIDR, J.; AMANN, R.; HUBER, I. et al. **Phylogenetic analysis and in situ identification of bacteria in activated sludge.** *Applied Environmental Microbiology*, v. 63, p. 2884–2896, 1997.
- 160.SOLORZANO, A., GUTIERREZ, J., JIMENEZ, A., LUNA, J.D., MARTINÉZ, J.L. **Contribution of a new mutation in *parE* to quinolone resistance in extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates.** *Journal of Clinical Microbiology*, v. 45, p. 2740-2742, 2007.
- 161.SONUNE, A.; GHATE, R. **Developments in wastewater treatment methods.** *Desalination*, v. 167, p. 55–63, 2004.

162. SORENSEN, A.H.; HANSEN, L.H.; JOHANNESSEN, E.; SORENSEN, J. **Conjugative plasmid conferring resistance to olaquinox.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.47, p. 798-799, 2003.
163. STALDER, T.; ALRHMOUN, M.; CASELLAS, M. et al. (2013). **Dynamic assessment of the flocc morphology, bacterial diversity, and integron content of an activated sludge reactor processing hospital effluent.** *Environmental Science and Technology*, v.47, p. 7909-7917, 2013.
164. STRAHILEVITZ, J., JACOBY, G.A., HOOPER, D.C., ROBICSEK, A. **Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat.** *Clinical Microbiology Reviews*, v. 22, p. 664-689, 2009.
165. SU, H-C.; YING, G-G.; HE, L-Y. et al. **Antibiotic resistance, plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes and ampC gene in two typical municipal wastewater treatment plants.** *Environmental Science*, v.16, p. 324-332, 2014.
166. SUZUKI, S.; HOA, P.T.P. **Distribution of quinolone, sulfonamides, tetracyclines in aquatic environment and antibiotic resistance in Indochina.** *Frontiers in Microbiology*, v.3, p. 1-8, 2012.
167. SZCZEPANOWSKI, R.; LINKE, B.; KRAHN, I. et al. **Detection of 140 clinically relevant antibiotic-resistance genes in the plasmid metagenome of wastewater treatment plant bacteria showing reduced susceptibility to selected antibiotics.** *Microbiology*, v. 155, p. 2306-2319, 2009.
168. TAMTAM, F.; VAN OORT, F.; LE BOT, B. et al. **Assessing the fate of antibiotic contaminants in metal contaminated soils four years after cessation of long-term waste water irrigation.** *Science of the Total Environment*, V.409, 540-547, 2011.
169. TAVARES, W. et al. **Antibióticos e Quimioterápicos para o Clínico.** Editora Atheneu, São Paulo, 2ª edição, Capítulo 21, p.343 -360, 2007.
170. TAVIO, M.M.; JACOBY, G.A.; HOOPER, D.H. **QnrS1 structure-activity relationships.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.69, p. 2102-2109, 2014.
171. THOMAS, C. M.; K. M. NIELSEN. 2005. **Mechanisms of, and barriers to horizontal gene transfer between bacteria.** *Nature Review Microbiology*, v. 3, p. 711-721, 2005
172. TOLMASKY, M.E. **Aminoglycoside-modifying enzymes: characteristics, localization, and dissemination.** In: Bonomo, R.A., Tolmasky, M.E. (Eds.), *Enzyme-Mediated Resistance to Antibiotics: Mechanisms, Dissemination, and Prospects for Inhibition.* ASM Press, Washington, DC, p. 35-52, 2007.
173. TOLMASKY, M.E.; ROBERTS, M.; WOŁOJ, M.; CROSA, J.H. **Molecular cloning of amikacin resistance determinants from a *Klebsiella pneumoniae* plasmid.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.30, p. 315-320, 1986.
174. TORNIAINEN, K.; MATTINEN, J.; ASKOLIN, C.; TAMMILEHTO, S. **Structure elucidation of a photodegradation product of ciprofloxacin.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 15, p. 887-894, 1997.
175. TORPDAHL, M.; HAMMERUM, A. M.; ZACHARIASEN, C.; NIELSEN, E. M. **Detection of qnr genes in *Salmonella* isolated from humans in Denmark.** *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, v. 63, p. 406-408, 2009.
176. TOUROVA, T.P. **Copy Number of Ribosomal Operons in Prokaryotes and Its Effect on Phylogenetic Analyses.** *Microbiology*, v. 72, p. 389-402, 2003.
177. TRAN, Q.T.; NAWAZ, M.S.; DECK, J. et al. **Plasmid-mediated quinolone resistance in *Pseudomonas putida* isolates from imported shrimp.** *Applied Environmental Microbiology*, v. 77, p. 1885-1887, 2011.

178. TRAN, J.H.; JACOBY, G.A. **Mechanisms of plasmid-mediated quinolone resistance.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.99, p. 5638-5642, 2002.
179. TRINGE, S.G.; HUGENHOLTZ, P. **A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene.** *Current Opinion in Microbiology*, v.11, p. 442-446, 2008.
180. VAN DOORSLAER, X.; DEWULF, J.; VAN LANGENHOVE, H. et al. **Fluoroquinolone antibiotics: an emerging class of environmental micropollutants.** *Science of the Total Environment*, v. 500-501, p. 250-269, 2014.
181. VETTING, M.W.; HEGDE, S.S.; WANG, M. et al.. **Structure of QnrB1, a plasmid-mediated fluoroquinolone resistance factor.** *The Journal of Biological Chemistry*, v.86, p. 25265-25273, 2011.
182. VETTING, M.W.; PARK, C.H.; HEDGE, S.S.; JACOBY, G.A.; HOOPER, D.C.; BLANCHARD, J.S. **Mechanistic and structural analysis of aminoglycoside N-acetyltransferase AAC(6')-Ib-cr and its bifunctional, fluoroquinolone-active AAC(6')-Ib-cr variant.** *Biochemistry*, v.47, p. 9825-9835, 2008.
183. VIANA, A.L., CAYO, R., AVELINO, C.C. et al. 2013. **Extended-spectrum beta-lactamases in Enterobacteriaceae isolated in Brazil carry distinct types of plasmid-mediated quinolone resistance genes.** *Journal Medical Microbiology*, v. 62, p. 1326-1331, 2013.
184. VON SPERLING, M. **Lodos ativados** in *Princípios do tratamento biológico de águas residuárias*, v.4, 416 p., 1997.
185. VON SPERLING, M. **Princípios do tratamento biológico de águas residuárias: Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos.** 3. ed. Belo Horizonte, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – UFMG,. 452 p., 2005.
186. VON SPERLING, M.; GONÇALVES, R.F. **Lodos de esgotos: características e produção.** In Andreoli, C.V.; Von Sperling, M.; Fernandes, F. *Lodo de esgotos: tratamento e disposição final in Princípios do tratamento biológico de águas residuárias*, v.6, cap. 2, p. 17-67, 2001.
187. WAGNER, M.; LOY, A. **Bacterial community composition and function in sewage treatment systems.** *Current Opinion in Biotechnology*, v.13(3), p 218-227, 2002.
188. WALLNER, G.; ERHART, R.; AMANN, R. **Flow cytometric analysis of activated sludge with rRNA-targeted probes.** *Applied and Environmental Microbiology*, v. 61, p. 1859-1866, 1995.
189. WANG, M.; GUO, Q.; XU, X.; WANG, X.; WANG, F.; YE, X.; HOOPER, D.C; WU, S.; WANG, M. **New Plasmid-mediated quinolone resistance gene qnrC, found in clinical isolate of *Proteus mirabilis*.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 53, p. 1892- 1897, 2009.
190. WANG, M.; TRAN, J.H.; JACOBY, G.A.; ZHANG, Y.; WANG, F.; HOOPER, D.C. **Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.47, p. 2242- 2248, 2003.
191. WANG, Z. H., YANG, J. Q., ZHANG, D. J et al.. **Composition and structure of microbial communities associated with different domestic sewage outfalls.** *Genetics and Molecular Research*, v. 13, 7542-7552, 2014.
192. WAREHAM D.W.; GORDON N.C.; SHIMIZU K. **Two new variants of and creation of a repository for *Stenotrophomonas maltophilia* quinolone protection protein (Smqnr) genes.** *International Journal Antimicrobial Agents*, v. 37, p.89-90, 2011.
193. WELLINGTON, E.M.H.; BOXALL, A.B.A.; CROSS, P. et al. **The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria.** *The Lancet Infectious Diseases*, v.13, p. 155-65, 2013.

194. WOESE, C.R. **Bacterial Evolution**. *Microbiology Review*, v. 51, p. 221-271, 1987.
195. WOZNIACK, R.A.; WALDOR, M.K. **Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements. Enabling dynamic lateral gene flow**. *Nature Review Microbiology*, v.8, p.552-563, 2010.
196. XIA R.; GUO X.; ZHANG Y.; XU H. **qnrVC-like gene located in a novel complex class 1 integron harboring the ISCR1 element in an *Aeromonas punctata* strain from an aquatic environment in Shandong Province, China**. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v. 54, p. 3471–3474. 2010.
197. XIE, Y.F., LI, X.W., WANG, J.F. Et al. **Spatial estimation of antibiotic residues in surface soils in a typical intensive vegetable cultivation area in China**. *Science of Total Environment*, v.430, p.126-131,2012.
198. XU, J. (2011) **Microbial ecology in the age of metagenomics**. In: Bruijn J, Willey J Handbook of Molecular Microbial Ecology I: Metagenomics and Complementary Approaches, 2011.
199. XU, W.H.; ZHANG, G.; WAI, O.W.H. et al. **Transport and adsorption of antibiotics by marine sediments in a dynamic environment**. *Journal of Soils and Sediments*, v.9, p.364–373, 2009.
200. YADAV, T. C.; KHARDENAVIS, A.; KAPLEY, A. K. **Shifts in microbial community in response to dissolved oxygen levels in activated sludge**. *Bioresource Technology*, v. 165, p. 257–64, 2014.
201. YAMANE, K.; WACHINO, J., SUZUKI, S. et al. **New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in *Escherichia coli* clinical isolate**. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.51, p. 3354-3360, 2007.
202. YANG, G.; HAN, L.; WEN, J. et al. ***Pseudomonas guangdongensis* sp. nov., isolated from an electroactive biofilm, and emended description of the genus *Pseudomonas* Migula 1894**. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 63, p. 4599-4605, 2013.
203. YANG, J.; LUO, Y.; LI, J.; MA, Y.; HU, C.; JIN, S.; YE, L.; and CUI, S. **Characterization of clinical *Escherichia coli* isolates from China containing transferable quinolone resistance determinants**. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.52, p. 4268- 4273, 2010.
204. YAO, J.; MOELLERING, R. **Antibacterial agents**. In: Murray, P., Baron, E., Jorgensen, J., Landry, M., Tenover, P., Tenover, M. (Eds.), *Manual of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology Press, Washington, DC, p. 1077–1113, 2007.
205. YE, L.; ZHANG, T. **Bacterial communities in different sections of a municipal wastewater treatment plant revealed by 16S rDNA 454 pyrosequencing**. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.97, p. 2681–2690, 2013.
206. YOSHIDA, H.; BOGAKI, M.; NAKAMURA, M.; NAKAMURA, S. **Quinolone resistance determining regions in the DNA girase *gyrA* gene of *Escherichia coli***. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.37, p. 839 -845, 1990.
207. ZHANG, M.Q.; HAEMERS, A. **Quinolone antimicrobial agents, structure activity relationships**. *Pharmazie*, v.46, p. 687-700, 1991.
208. ZHANG, T.; SHAO, M. F.; YE, L. **454 Pyrosequencing reveals bacterial diversity of activated sludge from 14 sewage treatment plants**. *The ISME Journal*, V. 6(6), p. 1137–1147, 2012.
209. **Normas para apresentação de documentos científicos** (Teses, Dissertações, Monografias e outros Trabalhos Acadêmicos), 2ª Edição, Universidade Federal do Paraná- Sistema de Bibliotecas.
210. <http://www.lahey.org/qnrStudies>