

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

ROSANNE APARECIDA CAPANEMA RIBEIRO

Transferência do gene *bla*_{TEM} entre *Salmonella* e *Escherichia coli* em condições de beneficiamento de produtos de origem animal: influência de um complexo de cobre

**UBERLÂNDIA
2023**

ROSANNE APARECIDA CAPANEMA RIBERIO

Transferência do gene *bla*_{TEM} entre *Salmonella* e *Escherichia coli* em condições de beneficiamento de produtos de origem animal: influência de um complexo de cobre

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciências Veterinárias, da Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Área de concentração: Investigação Etiológica

Orientador: Prof^a. Dr^a. Daise Aparecida Rossi

Co-orientador: Prof^a. Dr^a. Aline Diniz Cabral

**UBERLÂNDIA
2023**

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

R484 2023	<p>Ribeiro, Rosanne Aparecida Capanema, 1994- Transferência do gene blaTEM entre Salmonella e Escherichia coli em condições de beneficiamento de produtos de origem animal: influência de um complexo de cobre [recurso eletrônico] / Rosanne Aparecida Capanema Ribeiro. - 2023.</p> <p>Orientador: Daise Aparecida Rossi . Coorientador: Aline Diniz Cabral. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Ciências Veterinárias. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.di.2023.40 Inclui bibliografia.</p> <p>1. Veterinária. I. , Daise Aparecida Rossi, 1963-, (Orient.). II. Cabral, Aline Diniz, 1981-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Ciências Veterinárias. IV. Título.</p> <p>CDU: 619</p>
--------------	--

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias
BR 050, Km 78, Campus Glória , Uberlândia-MG, CEP 38400-902
Telefone: (34) 2512-6811 - www.ppgcv.famev.ufu.br - mesvet@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	CIÊNCIAS VETERINÁRIAS				
Defesa de:	DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO PPGCVET Nº 03/2023				
Data:	03 DE FEVEREIRO DE 2023	Hora de início:	09:30	Hora de encerramento:	11:55
Matrícula do Discente:	12112MEV019				
Nome do Discente:	ROSANNE APARECIDA CAPANEMA RIBEIRO				
Título do Trabalho:	Transferência gênica entre <i>Salmonella</i> e <i>Escherichia coli</i> em condições de beneficiamento de produtos de origem animal: influência de um complexo de cobre				
Área de concentração:	SAÚDE ANIMAL				
Linha de pesquisa:	INVESTIGAÇÃO ETIOLÓGICA				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	EPIDEMIOLOGIA DE ZOONOSES				

Reuniu-se por videoconferência, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, assim composta: Roberta Torres de Melo - FAMEV/UFU; Antônio Fernandes de Carvalho - DTA/UFV e Daise Aparecida Rossi - FAMEV/UFU, orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos a presidente da mesa, Daise Aparecida Rossi, apresentou a Comissão Examinadora e a candidata, agradeceu a presença do público, e concedeu ao discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovada).

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de **Mestre**.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Daise Aparecida Rossi, Professor(a) do Magistério Superior**, em 03/02/2023, às 12:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Roberta Torres de Melo, Professor(a) do Magistério Superior**, em 03/02/2023, às 13:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Antonio Fernandes de Carvalho, Usuário Externo**, em 06/02/2023, às 13:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4166073** e o código CRC **261E62F0**.

ROSANNE APARECIDA CAPANEMA RIBERO

Transferência do gene *bla*_{TEM} entre *Salmonella* e *Escherichia coli* em condições de beneficiamento de produtos de origem animal: influência de um complexo de cobre

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.
Área de concentração: Saúde Animal

Uberlândia, 03 de fevereiro de 2023

Banca examinadora

Profª. Dra. Daise Aparecida Rossi – FAMEV-UFU

Prof. Dr. Antônio Fernandes de Carvalho – DTA -UFV

Profª. Dra. Roberta Torres de Melo - FAMEV-UFU

Dedico esse trabalho a todos os cientistas brasileiros que, mesmo diante de tantas adversidades e falta de recursos, se dedicam de todo o coração a fazer pesquisa de qualidade.

AGRADECIMENTOS

Embora eu tenha certa dificuldade em expressar meus sentimentos, esse tópico de agradecimento precisava estar aqui, porque a minha vida sempre foi cercada de pessoas especiais e que fazem a diferença, e eu precisava enaltecê-las. Em primeiro lugar gostaria de agradecer a Deus, por ter colocado essas pessoas na minha vida e por todas as oportunidades e experiências vividas até aqui, além de estar ao meu lado em todos os momentos, me guiando e ajudando.

Preciso agradecer aos meus pais, Márcia e Rauer, e à minha irmã, Régia, por serem a minha base desde o início da minha vida, por sempre torcerem por mim, por me ensinarem o valor dos estudos, por acreditarem nos meus sonhos e me dar o suporte e a tranquilidade de saber que sempre posso contar com eles, mesmo que as coisas não saiam como planejado. Agradeço ao meu esposo, Yassushi, por sempre estar ao meu lado, por ser meu alicerce, por me compreender e por ter me apresentado com sua família, que me adotou como filha. Sem essas pessoas, sem o suporte, carinho e conselhos, toda a minha jornada seria muito mais árdua. Minha vida com certeza é mais feliz e completa tendo vocês ao meu redor.

Agradeço à minha orientadora, professora Daise, por ter aceitado esse desafio, por ter acreditado no meu potencial, por transmitir seus conhecimentos, por sempre agir com muita leveza e ter me dado asas para voar. Também sou grata à minha co-orientadora, professora Aline, que é uma doçura em pessoa, é brilhante e muito parceira. Não tenho palavras para agradecer à professora Roberta, que foi um anjo na minha vida, que esteve muito envolvida com o projeto, me ensinou coisas imprescindíveis, me guiou e foi peça fundamental para que eu chegasse até aqui. Também devo muito à Micaela, que sempre foi meu braço direito, que com toda a sua dedicação me conduziu e me ajudou de diversas formas para que esse projeto acontecesse. E também, aos membros da banca examinadora, que, tão gentilmente, aceitaram dispor de seu tempo na correção deste trabalho, adicionando experiência e conhecimento ao mesmo.

Agradeço ao pessoal do laboratório de química da UFU do professor Wendell, que foram nossos parceiros e disponibilizaram o complexo utilizado neste trabalho. Agradeço também às alunas de iniciação científica e aos estagiários que estiveram envolvidos diretamente; cada ajuda, fez a diferença para que esse estudo acontecesse da melhor forma possível. Sou grata também ao pessoal do nosso laboratório por me apoiarem, acalentarem, me incentivarem e torcerem por mim,

tenho até medo de citar e esquecer alguém, já que todos de alguma forma contribuíram para tornarem as coisas mais leves e divertidas.

Por fim, agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias e aos professores por seus ensinamentos e por sempre nos incentivar a sermos melhores a cada dia; à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Código de Financiamento 001, por ter me concedido a bolsa de pesquisa, tão necessária para aqueles que querem se dedicar mais intensamente a ciência, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo financiamento.

“A ciência serve para nos dar uma ideia
de quão extensa é a nossa ignorância”

Félicité Robert de Lamennais

RESUMO

A alta prevalência de infecções causadas pela ingestão de alimentos contaminados é um desafio para a saúde pública mundial, que se amplifica pela crescente resistência aos antimicrobianos (RAM). Como a recombinação gênica é uma importante ferramenta disseminadora da RAM, os fatores que a favorecem devem ser continuamente investigados. Subprodutos presentes em indústrias de beneficiamento de produtos de origem animal como o *chicken juice*, já demonstraram capacidade de interferir em mecanismos de virulência das bactérias, o que instiga a pesquisar o seu efeito e o do soro de leite na transferência de genes de resistência. A dissertação foi dividida em dois capítulos, o primeiro consta de revisão bibliográfica sobre o tema, e o segundo, de um artigo científico que objetivou avaliar a frequência de transferência do gene *bla*_{TEM} entre *Salmonella* Heidelberg (SH) e *Escherichia coli* (EC) em diferentes condições que mimetizam o ambiente de estabelecimento de beneficiamento de produtos de origem animal e a influência do complexo de cobre Lu54 como nova alternativa para mitigar o risco dessa transferência. Para isso, foi utilizada como doadora, SH positiva para o gene *bla*_{TEM} (resistência a ampicilina) e como receptora, EC J53 AzR, resistente a azida sódica e sensível a ampicilina. Os métodos de conjugação utilizados foram: 1) meio líquido/três horas de incubação, sob agitação; 2) meio sólido/*overnight* e; 3) meio líquido/*overnight*. Todos os ensaios foram realizados na presença e ausência de soro de leite (SL) e *chicken juice* (CJ). As taxas de recombinação foram confirmadas por método fenotípico (recuperação em ágar seletivo) e genotípico (confirmação do gene *bla*_{TEM} por PCR) e calculadas pela frequência de conjugação da receptora (FCR). A concentração 125µg/mL de Lu54 foi estabelecida em teste de microdiluição na determinação da concentração alvo nos ensaios de inibição da conjugação. A conjugação 1 apresentou aumento de FCR superior a 2,5 ordens de magnitude tanto na presença de SL quanto CJ quando comparado aos testes com ausência dos suplementos (tradicional). Na conjugação 2, as FCR's foram menores, inferiores a 1%, enquanto a conjugação em meio líquido/*overnight* apresentou FCR superior ao primeiro método apenas em SL. A presença do SL acidificou o meio, o que refletiu em maiores FCR. O complexo Lu54 foi testado na conjugação 1 e se mostrou eficaz no controle da transferência de *bla*_{TEM}, pois reduziu a FCR de 2,2 para 0,3% no teste tradicional, de 8,2 para 1,7% em SL e 6,2 para 0,9% com CJ, equivalentes a uma redução de 7,3, 4,8 e 6,9 vezes, respectivamente. As colônias de transconjugantes testadas apresentaram o gene *bla*_{TEM}, confirmando a efetividade do processo. Os resultados demonstraram que a presença de SL ou CJ é capaz de aumentar a transferência gênica quando presentes em meio líquido e o complexo de cobre Lu54 é eficaz na redução da conjugação, sendo uma alternativa promissora para o controle de trocas gênicas e mitigação da resistência antimicrobiana, especialmente em indústrias de beneficiamento de leite e carne.

Palavras chave: *bla*_{TEM}; *chicken juice*; soro de leite; resistência antimicrobiana; conjugação bacteriana; complexo de cobre Lu54

ABSTRACT

The high prevalence of infection caused by eating contaminated food is a challenge for public health, which is intensified by the increasing resistance to antimicrobials (RAM). As gene recombination is an important tool for disseminating bacterial resistance, the factors that promote it must be continuously investigated. Byproducts originating from the processing of products of animal origin such as chicken juice have already shown the ability to interfere in the mechanism of virulence of bacteria, which encourages research about their effect and of whey cheese on the transfer of resistance genes. The dissertation was divided into two chapters, the first with the bibliographic review about the subject, and the second with a scientific article whose objective was to evaluate the frequency of *bla*_{TEM} gene transfer between *Salmonella* Heidelberg (SH) and *Escherichia coli* (EC) in different conditions that simulate the environment found in an industry that processes products of animal origin, and the influence of the Lu54 copper complex as a new alternative to mitigate RAM. For this, SH positive for *bla*_{TEM} gene (resistant to ampicillin) was used as donor and, as a recipient, EC J53 AzR, resistant to sodic azide and sensible to ampicillin. The conjugation methods used were: 1) liquid medium/three hours of incubation, shaking; 2) solid medium/overnight and; 3) liquid medium/overnight. All the essays were carried out in the presence and absence of whey cheese (SL) and chicken juice (CJ). Recombination rates were confirmed by the phenotypic method (recovery in selective agar) and genotypic method (confirmation of the *bla*_{TEM} gene by PCR) and calculated by the frequency of conjugation using the recipient (FCR). The concentration of 125µg/mL of Lu54 was established by the minimum inhibitory concentration in a microdilution test. Conjugation 1 was chosen for treatment with Lu54, as it showed an increase in FCR greater than 2.5 orders of magnitude in the presence of SL and CJ when compared to the absence of supplement (traditional). In conjugation 2, the FCR's were lower, less than 1%, while the conjugation in liquid medium/overnight showed a higher FCR than the first method only in SL. The presence of SL acidified the medium, which resulted in higher FCR. The Lu54 complex was tested in conjugation 1 and proved to be effective in controlling the transfer of *bla*_{TEM}, as it reduced the FCR from 2.2 to 0.3% in the traditional test, from 8.2 to 1.7% in SL and 6.2 to 0.9% with CJ, that is equivalent to a reduction of 7.3, 4.8 and 6.9 times, respectively. The colonies of transconjugants tested had the *bla*_{TEM} gene, confirming the effectiveness of the process. The results demonstrate that the presence of SL or CJ is able to increase gene transfer when present in liquid medium and the Lu54 copper complex is effective in reducing conjugation, being a promising alternative for controlling gene exchange and mitigating antimicrobial resistance, especially in dairy and meat processing industries.

Keywords: *bla*_{TEM}; chicken juice; cheese whey; antimicrobial resistance; bacterial conjugation; Lu54 copper complex

LISTA DE GRÁFICOS E TABELAS

CAPÍTULO 2

	Pág.
GRÁFICO 1 Porcentagem de frequências de conjugação nas diferentes metodologias.....	44
GRÁFICO 2 Variação de pH dos meios de conjugação em líquido nos diferentes momentos de incubação.....	45
TABELA 1 Contagem média (Log UFC/mL) de bactérias doadoras, receptoras e transconjugantes e frequência de conjugação obtida nos três protocolos, com e sem a adição de 5% de soro de leite e <i>chicken juice</i>	46
GRÁFICO 3 Comparação das contagens e frequência de conjugação obtidas nas conjugações com e sem tratamento com 125ug/mL de Lu54 [Cu(Clmp)(mftpy)](PF6)2.....	47
TABELA 2 Primers e condições utilizados para identificar a presença do gene <i>bla_{TEM}</i>	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA - Análise de variância

BHI - Infusão de cérebro e coração

CDC – Center of Disease Control

CIM – Concentração inibitória mínima

CJ - *Chicken juice*

Clmp - 4-cloro-N-(piridina-2-metileno)anilina

CMP - Caseinomacropéptido

Cu - Cobre

ECDC - Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças

ESBL - betalactamases de espectro estendido

FC - Frequência de conjugação

FCR - Frequência de conjugação pela receptora

FT - Frequência de transferência

J53 - *E. coli* J53 AzR

LB - Luria Bertani

Lu 54 - $[\text{Cu}(\text{Clmp})(\text{mftpy})](\text{PF}_6)_2$

MCT - Ágar MacConkey transconjugante

Mftpy - 4-metilfenilinterpiridina

OMS - Organização Mundial de Saúde

oriT - origem da transferência

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

RAM - Resistência aos antimicrobianos

ROS - Espécies reativas de oxigênio

SH - *Salmonella* Heidelberg

SHV - Sulfidrilvariável

SNT - *Salmonella* não tifoide

SL - Soro de leite

T – Tradicional

TBE - Tris/Borato/EDTA

TEM - Temoniera

THG - Transferência horizontal de genes

T4SS - Sistema de secreção do tipo IV

WHO - World Health Organization

SUMÁRIO

CAPÍTULO I - CONSIDERAÇÕES GERAIS	15
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	16
2 OBJETIVOS.....	18
2.1 OBJETIVO GERAL	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
3 REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1 Resistência antimicrobiana	19
3.2 Transferência horizontal de genes: Conjugação bacteriana.....	21
3.3 <i>Salmonella</i> spp.....	23
3.4 <i>Escherichia coli</i>	25
3.5 <i>Chicken juice</i> (CJ) e soro de leite (SL)	27
3.6 Complexo de cobre	29
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31
CAPÍTULO II	38
ANEXO I.....	72

CAPÍTULO I
CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 INTRODUÇÃO GERAL

Doenças infecciosas são responsáveis por consideráveis taxas de morbidade e mortalidade em todo o mundo, situação que tem trazido preocupação devido ao aumento da resistência aos antimicrobianos (RAM), que desta forma, se constitui cada vez mais em uma ameaça à saúde pública mundial. Tal fato é exemplificado pelos dados do Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (2019), que demonstram que a cada ano, mais de 2,8 milhões de infecções resistentes a antibióticos ocorrem nos Estados Unidos, tendo como consequência mais de 35 mil mortes. Um dos mecanismos de emergência da RAM se dá quando há exposição, mesmo que em baixas concentrações, das bactérias aos antibióticos, que gera pressão de seleção e alterações em sucessivas gerações bacterianas, levando ao surgimento de cepas hipermutáveis, com alta capacidade de adquirir resistência até mesmo a outros agentes antimicrobianos, de modo que os medicamentos utilizados para as combater se tornam pouco efetivos (REYGAERT, 2018; CDC, 2019; MURRAY et al., 2022).

Dentre os agentes etiológicos de doenças infecciosas importantes mundialmente, e frequentemente associadas a surtos de origem alimentar, destacam-se *Salmonella* e *Escherichia coli*, responsáveis por doenças entéricas tanto em humanos quanto em animais (ELHARIRI et al., 2020; CDC, 2022a). Um dos sorovares mais envolvidos em surtos alimentares por *Salmonella enterica* é o Heidelberg, um patógeno que não possui hospedeiro específico, que pode ser encontrado em várias fontes de infecção e com rápida disseminação, o que o torna muito prevalente em surtos provocados pelo consumo de alimentos contaminados, como aves, suínos e produtos lácteos (SOUZA et al., 2020). Já patótipos de *E. coli* podem causar diarreia com diferentes graus de gravidade, além de infecções no trato urinário, problemas respiratórios, pneumonias, entre outros. Essa espécie possui um grupo grande e diverso de cepas que podem ser encontradas no meio ambiente, em alimentos e intestinos de animais e humanos (CDC, 2022a).

A maior parte do tratamento de infecções bacterianas se dá pelo uso de antibióticos, porém, o aumento da resistência a esses compostos é preocupante. Dentre os mecanismos utilizados pelas bactérias que contribuem para o aumento da RAM, pode-se citar as mutações em seu próprio DNA cromossômico ou aqueles em que há recombinação gênica pela aquisição, temporária ou permanente, de material genético de forma horizontal, como a transformação, transdução e conjugação (REYGAERT, 2018). A conjugação bacteriana é um dos mecanismos mais frequentes

e necessita do contato direto entre uma bactéria e outra, pelo qual ocorre a transferência de um gene, que se for envolvido a RAM propicia o surgimento de um novo patógeno resistente (SULTAN et al., 2018; NEIL; ALLARD; RODRIGUE, 2021).

O problema da RAM amplifica-se pelo aumento da multirresistência dos micro-organismos aos desinfetantes, o que é especialmente preocupante na indústria de alimentos. Adiciona-se ainda, o fato de as instalações industriais possuírem subprodutos que podem ser estimuladores do crescimento bacteriano, como o *chicken juice* (CJ). CJ é composto por proteínas, carboidratos, lipídeos e açúcares, está amplamente presente na indústria avícola, e comprovadamente beneficia a multiplicação e formação de biofilmes por importantes patógenos alimentares como *Campylobacter* e *Salmonella*, frequentemente envolvidos em doenças transmitidas pelo consumo de alimentos contaminados (MELO et al., 2017; MELO et al., 2021). Assim, pode-se inferir que o soro de leite (SL), comum em laticínios, pode exercer o mesmo efeito na multiplicação e formação de biofilmes, porém o SL não têm sido um alvo frequente em estudos semelhantes.

Diante das dificuldades relacionadas à eliminação das bactérias com os métodos atuais, especialmente quando estão em biofilmes, destaca-se a importância de procurar novas alternativas. Algumas opções têm se mostrado promissoras como agentes antimicrobianos, em especial, os complexos de cobre (KRASNOVSKAYA et al., 2020; ZALEVSKAYA; GUR'EVA, 2021). O cobre é um elemento fundamental para o funcionamento do organismo e atua em várias enzimas envolvidas no metabolismo energético, respiração e síntese de DNA celular, o que faz com que o desenvolvimento de drogas utilizando esse complexo seja muito interessante. Além disso, sua eficácia em inibir *S. Typhimurium* quando em sinergismo com outros antimicrobianos já foi demonstrada por MONTEIRO et al. (2022).

Considerando a importância da conjugação bacteriana na transferência horizontal de genes, a relevância dos patógenos *Salmonella* e *E. coli* na saúde pública e que a presença de SL e CJ no ambiente das indústrias beneficiadoras de leite e carne podem potencialmente favorecer a conjugação bacteriana, é extremamente importante investigar opções seguras e eficazes, como alternativas para o controle de bactérias patogênicas, suas formas de aquisição e disseminação da resistência, o que justifica este estudo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar diferentes metodologias de conjugação bacteriana e a ação do complexo de cobre Lu 54 [Cu(Clmp)(mftpy)](PF₆)₂ sobre a transferência horizontal do gene *bla*_{TEM}, que confere resistência aos β-lactâmicos, entre *Salmonella* Heidelberg (doadora) e *E. coli* J53 AzR (receptora), na ausência e presença de soro de leite e *chicken juice*, que mimetizam condições presentes em indústrias de alimentos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i) Estabelecer as frequências de conjugação em três condições distintas: conjugação 1 (em meio líquido/3 horas de incubação, sob agitação), conjugação 2 (membrana em meio sólido/incubação *overnight*) e conjugação 3 (meio líquido com renovação e incubação *overnight*);
- ii) quantificar a frequência de transferência do gene plasmidial *bla*_{TEM}, por meio da conjugação na presença e ausência de soro de leite e *chicken juice* em células planctônicas;
- iii) mensurar as alterações de pH do meio de conjugação líquido em 0 horas, 3 horas e *overnight*, na presença e ausência de soro de leite e *chicken juice*;
- iv) determinar a concentração alvo do complexo de cobre Lu 54 para atuar na conjugação entre *S. Heidelberg* e *E. coli* J53 AzR;
- v) verificar a capacidade e a frequência de aquisição do gene *bla*_{TEM}, na conjugação bacteriana após o tratamento com a formulação Lu54.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Resistência antimicrobiana

Doenças infecciosas são uma grande preocupação para a saúde pública mundial devido as altas taxas de morbidade e mortalidade, o que tem se agravado ainda mais devido à crise da resistência antimicrobiana (RAM) (GIL-GIL et al., 2019). Os antimicrobianos são frequentemente utilizados para tratar infecções bacterianas, no entanto, algumas bactérias têm demonstrado resistência a essas drogas, ou seja, adquiriram a capacidade de crescerem ou se manterem viáveis mesmo em contato com concentrações de antibióticos que normalmente seriam suficientes para exercer atividade bacteriostática ou bactericida (GUT et al., 2018).

A RAM não impacta apenas os humanos, mas é um problema de saúde única, uma vez que os animais, solo e organismos aquáticos também contribuem para a origem, manutenção e propagação desse fenômeno (BERENDONK et al., 2015). Além disso, as bactérias que possuem resistência aos antimicrobianos podem ser facilmente disseminadas para outras regiões geográficas do mundo, sendo considerado também um problema de saúde global (HERNANDO-AMADO et al., 2019).

Muitos agentes infecciosos que anteriormente eram tratados com êxito por várias classes de antibióticos desenvolveram resistência para a maioria, ou em alguns casos, praticamente a todos esses medicamentos. A grande ameaça está sobre os agentes antimicrobianos, no entanto, antivirais, antiparasitários e antifúngicos também estão em perigo. Apesar da RAM ser um evento natural nos micro-organismos, está havendo maior pressão de seleção, propagação mundial e exposição de indivíduos a agentes etiológicos RAM. Dentre os grandes impulsionadores desse fenômeno estão o uso excessivo e inadequado de antimicrobianos humanos e veterinários, antibióticos de baixa qualidade, deficiência nos programas de controle e prevenção de infecções, contaminação ambiental, deslocamento geográfico de humanos e animais infectados, vigilância e monitoramento precários e escassa regulamentação e fiscalização do uso de antibióticos (MCEWEN; COLLIGNON, 2018; MAPA, 2022).

A presença de bactérias resistentes aos antimicrobianos em animais pode se refletir em um problema para a saúde humana se ambos compartilharem microbiomas com as mesmas espécies e/ou genes RAM. Após a transmissão de bactérias comensais oportunistas ou patogênicas entre pessoas e animais de produção, ocorre a adaptação ao nicho do novo hospedeiro, onde podem se

125 multiplicar e transferir suas características para outras do microbioma (HERNANDO-AMADO et
126 al., 2019).

127 Porém, há também outros fatores bióticos e abióticos influenciando na RAM, como
128 contaminantes ambientais, condições físico-químicas, heterogeneidade fenotípica, indução de
129 respostas ao estresse e adaptação bacteriana. Estes fatores também aumentam a pressão seletiva e
130 fazem com que a evolução bacteriana seja levada em direção a RAM. Além disso, há mecanismos,
131 que podem ocorrer de forma isolada ou concomitantemente, que são provavelmente, as principais
132 causas para o aumento da disseminação de bactérias resistentes, que incluem a transferência
133 horizontal de genes (THG) de resistência aos antibióticos, mutação e a proliferação provocada pela
134 pressão de seleção causada por compostos antibióticos ou outros contaminantes (BERENDONK
135 et al., 2015).

136 Dados apresentados pelo Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças (ECDC)
137 em parceria com a Organização Mundial de Saúde (OMS), demonstram que *E. coli*, uma das
138 bactérias mais envolvidas em infecções humanas, possui 25% ou mais das cepas apresentando
139 RAM em cerca de 50% dos 40 países/áreas europeias avaliados. Em 2020, na União
140 Europeia/Espaço Econômico Europeu, mais da metade (54%) dos isolados de *E. coli* apresentaram
141 resistência à pelo menos um dos grupos antimicrobianos sob vigilância (aminopenicilinas,
142 fluoroquinolonas, cefalosporinas de terceira geração, aminoglicosídeos e carbapenêmicos), sendo
143 que a maior porcentagem de resistência foi relatada para as aminopenicilinas (54,6%) (ECDC,
144 2022).

145 A ampicilina é um antibiótico β -lactâmico de amplo espectro pertencente à classe das
146 aminopenicilinas. Este medicamento pode ser utilizado para o tratamento de infecções
147 respiratórias, meningites bacterianas, septicemias, endocardites e infecções geniturinárias e
148 gastrointestinais e atua contra bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus*
149 spp., *Streptococcus* spp. e *Enterococcus* spp. ou Gram-negativas como *Escherichia*
150 *coli*, *Salmonella* spp. e *Proteus mirabilis*. O mecanismo de ação da ampicilina se dá pela inativação
151 de proteínas de ligação encontradas na membrana interna da parede celular bacteriana. Essa
152 inativação dificulta a ligação cruzada de cadeias de peptideoglicanos, que é essencial para a
153 resistência e rigidez da parede celular, provocando seu enfraquecimento e consequente lise celular
154 (NCBI, 2022; PEECHAKARA; BASIT; GUPTA, 2022). No entanto, embora ainda muito
155 utilizada na terapêutica, essa droga tem sido alvo de muitos estudos que demonstram o crescente

aumento da RAM entre agentes patogênicos importantes, em especial, pela presença de genes de resistência aos β -lactâmicos, como o *bla*_{TEM} (SRICHUMPORN et al., 2022; ELHARIRI et al., 2020; DELMANI et al., 2017).

3.2 Transferência horizontal de genes: Conjugação bacteriana

Uma das estratégias para diminuir a RAM é reduzir a propagação horizontal de genes relacionados à esta característica entre a comunidade bacteriana. A resistência está relacionada a mutações em genes já existentes ou ocorre por meio da aquisição horizontal de plasmídeos ou outros elementos genéticos móveis que contêm genes RAM (SOUCY; HUANG; GOGARTEN, 2015).

Os principais mecanismos para a transferência horizontal de genes são a transformação, transdução e conjugação. A transformação está relacionada a bactérias que tem competência natural ou artificialmente induzida de internalizar moléculas de DNA dispersas no meio extracelular (HASEGAWA; SUZUKI; MAEDA, 2018). A transdução é mediada por bacteriófagos que se ligam a bactéria e carregam genes ou fragmentos do seu DNA em seu capsídeo e o transportam para o novo hospedeiro. Esse segmento de DNA pode ser combinado com o cromossomo do hospedeiro e a característica adquirida ser transferida para novas gerações. Já a conjugação bacteriana é a forma de recombinação e disseminação de genes RAM mais frequente, e ocorre por meio do contato entre uma bactéria e outra, propiciando a transferência de um gene de uma bactéria doadora para a receptora. A conjugação requer componentes genéticos como elementos conjugativos integrativos no cromossomo e os genes em plasmídeos com capacidade de autorreplicação e de se movimentar da célula doadora para a receptora, por meio de contato direto da superfície celular via *pili* (SULTAN et al., 2018; NEIL; ALLARD; RODRIGUE, 2021; VON WINTERSDORFF et al., 2016).

A transferência horizontal de genes (THG) proporciona novas capacidades metabólicas à bactéria receptora, o que a ajuda a se adaptar a diferentes nichos ecológicos. Já as habilidades que podem ser adquiridas para a resistência aos antibióticos pela aquisição de elementos genéticos cromossômicos ou móveis incluem a indução de mutações, inativação de medicamentos por hidrólise ou modificação, mudanças na droga alvo, diminuição na permeabilidade de ligação e redução na permeabilidade da membrana a antimicrobianos pela diminuição da absorção ou efluxo (SULTAN et al., 2018).

A THG mais comum é a conjugação mediada por plasmídeos, que são pequenas moléculas de DNA circular, independentes do DNA cromossômico, e que se replicam de forma independente (DAYAL, 2022). Uma vez que os genes de resistência se estabelecem em plasmídeos bem-sucedidos, eles podem se espalhar rapidamente entre diferentes cepas, espécies ou gêneros bacterianos. Essa transferência de plasmídeos entre patógenos já levou à disseminação global de vários genes que codificam resistência a β -lactâmicos, quinolonas, aminoglicosídeos, tetraciclina, sulfonamidas e várias outras classes de drogas (VON WINTERSDORFF et al., 2016; HUDDLESTON, 2014).

Para que a transferência do DNA pela conjugação seja realizada é necessário o envolvimento do sistema de secreção do tipo IV (T4SS), de um relaxossomo e de um *pili* conjugativo. O início da conjugação ocorre no citoplasma, onde o relaxossomo, que é composto principalmente pela proteína relaxase e proteínas acessórias, é formado para se ligar e processar uma região do DNA conhecida como origem da transferência (*oriT*). O complexo do relaxossomo é posteriormente recrutado por meio de uma proteína de ligação (T4CP) que o conecta ao T4SS, formando um canal responsável pelo movimento do DNA da célula doadora para a receptora. A relaxase corta o *oriT* na região *nick* do elemento conjugativo, se liga covalentemente à extremidade 5' da fita de DNA por meio de uma ligação fosfotirosil e inicia a transferência de 5' para 3' de uma fita do elemento para a célula receptora. A relaxase termina a transferência unindo as extremidades do plasmídeo e liberando um círculo de DNA de fita simples na receptora, quando então a fita complementar é sintetizada (ILANGO VAN; CONNERY; WAKSMAN, 2015; LEE; GROSSMAN, 2007).

Dentro do sistema T4SS existem morfologicamente dois tipos de *pili*, o tipo F que é longo e flexível e o tipo P, que é curto e rígido. *Pili* são estruturas tubulares extracelulares que se estendem para fora da superfície da doadora e fazem contato físico com a receptora. Então, por meio de um mecanismo conhecido como “estabilização do par de acasalamento”, se retrai, aproximando a receptora da doadora e forma uma junção de acoplamento (LOW et al., 2022; ILANGO VAN; CONNERY; WAKSMAN, 2015). Nas bactérias Gram negativas, o *pili* conjugativo mais bem caracterizado é *pili* F, elaborado pelos fatores de fertilidade F ou plasmídeos F. Após estabelecer uma “junção de acasalamento” estável, o sistema F muda do modo de acasalamento para o modo de transferência do DNA e permite a aquisição do plasmídeo. O canal de acoplamento F e o *pili* F necessitam de quase o mesmo conjunto de operons *Tra* para sua

produção, dessa forma, eles são frequentemente descritos como uma unidade estrutural (HU; KHARA; CHRISTIE, 2019).

Assim que entra na receptora, o plasmídeo precisa escapar da degradação por endonucleases de restrição da receptora, que reconhecem seus sítios de restrição, e os fatores do hospedeiro devem ser capazes de promover a replicação do plasmídeo e garantir que as cópias sejam distribuídas de forma igualitária entre as células filhas durante a divisão celular (ALDERLIESTEN et al., 2020).

Uma das formas de avaliar a eficiência da conjugação é determinando a frequência de conjugação (FC). Esse índice pode ser afetado por diferentes aspectos como a presença de outros plasmídeos na célula receptora, relação taxonômica entre doadora e receptora, taxa de crescimento, densidade celular, meio sólido ou líquido, temperatura, presença de nutrientes, entre outros (ALDERLIESTEN et al., 2020; SHINTANI; OHKUMA; KIMBARA, 2019).

PALLARES-VEGA et al. (2021) observaram que temperaturas mais baixas (25°C ou menos) podem reduzir o número de eventos conjugativos, assim como meios pouco nutritivos. Outro estudo demonstrou que a eficiência da conjugação realizada entre diferentes cepas de *Enterococcus faecalis*, decaiu na presença de alta concentração de doadoras, ou seja, o número de transconjugantes formados diminuiu com o aumento da densidade de doadoras (CHATTERJEE et al., 2013). A transferência de plasmídeos pode acontecer em maior frequência quando a bactéria receptora pertence a mesma espécie que a doadora do que para receptoras diferentes, quando em proporção 1:1, tanto em meio líquido quanto em meio sólido, onde o processo ocorre sobre filtros. O mesmo estudo também observou que embora a frequência de transferência de plasmídeos tenha sido similar tanto em três quanto em 16 horas, a tendência foi menor em 16 horas (SAKUDA et al., 2018). Diante disso, é possível perceber que o processo de trocas gênicas é multifatorial e envolve fatores intrínsecos e extrínsecos que podem influenciar na sua eficiência.

3.3 *Salmonella* spp.

Dentre as bactérias patogênicas mais importantes para a saúde pública mundial estão as do gênero *Salmonella*, consideradas como umas das quatro principais causas de doenças diarreicas em todo o mundo (WHO, 2018). Estima-se que nos Estados Unidos, anualmente, aproximadamente 1,35 milhões de infecções e 420 mortes sejam causadas por *Salmonella* não

tifoide (SNT) e que a incidência de infecção por *Salmonella* seja de 15,2 doentes a cada 100.000 indivíduos (CDC, 2022b).

A principal via de disseminação desta bactéria para os humanos envolve o consumo de produtos de origem animal contaminados, especialmente ovos, carne, aves e leite. As manifestações comuns da salmonelose são dor abdominal, febre, náuseas e vômitos, com início dos sintomas entre 6-72 horas (normalmente 12-36 horas) após a ingestão, podendo durar de dois a sete dias. Os sintomas da salmonelose são geralmente leves, não sendo necessário tratamento na maioria dos casos, no entanto, especialmente em crianças e idosos, a enfermidade pode ser grave e até levar a morte (WHO, 2018).

Pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, as bactérias do gênero *Salmonella* são Gram negativas, possuem formato de bastonete, não formam esporos, são anaeróbias facultativos e produzem gás sulfídrico a partir da fermentação da glicose e redução do enxofre. Boa parte das espécies desse gênero conseguem se desenvolver em temperatura que variam de 7°C a 45°C e pH entre 4,5 a 9,0, sendo também muito resistentes a dessecação e congelamento, o que facilita sua sobrevivência (PALMER et al. 2021; WHO, 2018). O gênero *Salmonella* comporta duas espécies (*S. enterica* e *S. bongori*), além de mais de 2.600 sorovares. Baseado na bioquímica e em alterações genéticas, *S. enterica* pode ser classificada nas subespécies *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica* (ANDINO; HANNING, 2015; BANERJI et al., 2020).

Vários sorovares são identificados em cada subespécie por meio das características de seus antígenos somáticos e flagelares. *S. enterica* subespécie *enterica* é a que possui a maior quantidade de sorovares entre as espécies e subespécies (BRASIL, 2011), incluindo *S. Heidelberg* (SH), que é um patógeno que se dissemina facilmente, possui várias fontes de infecção e nenhum hospedeiro específico (BUTAYE et al. 2006). O aumento da prevalência e a disseminação mundial desse sorotipo tem chamado atenção. Além disso, ele está frequentemente associado a quadros graves em humanos, com aproximadamente 13% dos casos de infecção por SH evoluindo para doença sistêmica (WEBBER et al., 2019).

A severidade da salmonelose depende de fatores relacionados aos hospedeiros e o sorotipo envolvido. Em quadros clínicos com manifestações leves ou moderados, não se recomenda a terapia antimicrobiana, no entanto, em casos mais graves ou em pacientes imunocomprometidos, bebês ou idosos, pode ser necessária a antibioticoterapia (WHO, 2018).

Alguns dos antimicrobianos recomendados para o tratamento de episódios mais graves causados por SNT são ciprofloxacina, ceftriaxona e ampicilina (GUT et al., 2018). Em alguns grupos, como crianças e mulheres grávidas, a terapia pode ser muito limitada devido a problemas de toxicidade, sendo os β -lactâmicos a única alternativa disponível para o tratamento de infecções graves em diversos casos (COLLIGNON; MCEWEN, 2019).

No entanto, é preocupante os índices de resistência determinados em *Salmonella* isolada de surtos alimentares aos β -lactâmicos, como a ceftriaxona e a ampicilina, que são as drogas de primeira escolha para o tratamento. A inativação direta de antimicrobianos por hidrólise enzimática é um dos mecanismos de resistência contra os β -lactâmicos mais utilizados pelas bactérias, sendo que na maioria das *Enterobacteriaceae*, um importante artifício de resistência é a produção de β -lactamases de espectro estendido (ESBLs). Os tipos mais comuns de β -lactamases são a temoniera (TEM) e a variável sulfidril (SHV), distribuídas abundantemente na natureza, com mais de 90 tipos de TEM e mais de 50 tipos de SHV (NAIR; VENKITANARAYANAN; KOLLANOOR JOHNY, 2018).

Os genes *bla*_{TEM} e *bla*_{PSE} são frequentemente associados a resistência por β -lactamases em *Salmonella*, sendo que o gene *bla*_{TEM-1}, que é tipicamente mediado por plasmídeos, é considerado a expressão de β -lactamase mais encontrada em *Salmonella* na Europa (WALSH et al., 2008). Dai et al. (2021) avaliaram a presença de genes de resistência em *Salmonella* Enteritidis isoladas de diferentes fontes e observaram a presença de *bla*_{TEM} em 76% das amostras, sendo que a maior taxa de resistência se deu ao ácido nalidíxico, seguido pela ampicilina. Outro estudo encontrou resultados similares em isolados de bezerros diarreicos tratados com sulfonamidas, sendo que a presença do gene *bla*_{TEM} foi encontrada em 83,3% das amostras de *E. coli* e 79,2% das amostras de *Salmonella* (HAQUE et al., 2022).

3.4 *Escherichia coli*

E. coli pertence a um grupo grande e diverso de bactérias que podem ser encontradas no meio ambiente, em alimentos e em intestinos de animais e humanos. Enquanto a maior parte das cepas de *E. coli* não são patogênicas, algumas podem provocar doenças intestinais como diarreia ou enfermidades sistêmicas, incluindo pneumonia, doenças respiratórias, infecções no trato urinário, entre outras (CDC, 2022a).

Em animais, *E. coli* é responsável por causar comorbidades como enterites, septicemias, mastites e problemas reprodutivos em aves. Enquanto algumas cepas dessa espécie parecem ser espécie-específicas, outras podem infectar várias espécies, incluindo humanos. Apesar de demonstrarem comportamento comensal no intestino de animais e humanos, cepas de *E. coli* podem se apresentar como um patógeno oportunista, além de servirem como fonte de material genético para a disseminação da RAM (MCEWEN.; COLLIGNON, 2018).

E. coli é uma bactéria Gram-negativa, anaeróbia facultativa, possui formato de bastonete e pertence à família *Enterobacteriaceae*. Em condições ideais de crescimento, se replica rapidamente, em aproximadamente 20 minutos. Esse micro-organismo possui várias estirpes que se diferenciam com base nos antígenos somáticos, flagelares e capsulares e são classificadas de acordo com seus fatores de virulência, mecanismos de patogenicidade, síndromes clínicas e sorologia. Algumas estirpes são capazes de crescer em temperaturas entre 7 e 46°C, sendo que a temperatura ótima é em torno de 37°C. Podem crescer em pH a partir de 4,5 e o limite mínimo de atividade de água que permite seu crescimento é 0,95 (JANG et al., 2017; ASAE, 2022).

A existência de cepas de *E. coli* multirresistentes isoladas de diferentes fontes e hospedeiros já foi relatada e tem sido motivo de preocupação em termos de saúde única. A produção de ESBL's por *Enterobacteriaceae*s, especificamente por *E. coli*, é um dos alvos de maior atenção e já foi encontrado até mesmo em cepas de *E. coli* isoladas de animais saudáveis (FUGA et al., 2022). CHAUDHARY, JADHAV e BANJARA (2021) destacam que tanto médicos quanto microbiologistas estão seriamente preocupados com a emergência de *E. coli* multirresistentes e produtoras de ESBL, com elevadas taxas de RAM a drogas rotineiramente utilizadas. Um dos genes envolvido na resistência aos β -lactâmicos é o *bla*_{TEM}, que implica na resistência à ampicilina e é muito comum em cepas de *E. coli*, como relatado por DELMANI et al. (2017), que encontraram 67% de resistência a ampicilina em *E. coli* proveniente de amostras clínicas.

Um extenso estudo conduzido na Alemanha avaliou cepas de *E. coli* produtoras de ESBL isoladas de animais produtores de alimentos que se encontravam doentes entre os anos de 2008 e 2014. Foi detectada a presença do gene *bla*_{CTX-M-1} em 69,9%, *bla*_{CTX-M-15} em 13,6%, *bla*_{CTX-M-14} em 11,7%, *bla*_{TEM-52} em 1,9% e *bla*_{SHV-12} em 1,4% das cepas (MICHAEL et al., 2017). Outro estudo conduzido por Gundran et al. (2019) encontrou 57,97% e 27,54% de positividade para os genes *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV}, respectivamente, em isolados de *E. coli* provenientes de granjas de frangos de corte nas Filipinas. Em isolados clínicos já se encontrou 63,4% de positividade para *bla*_{TEM} em

342 cepas de *E. coli*, sendo que este foi o genótipo de ESBL mais predominante (CHAUDHARY;
343 JADHAV; BANJARA, 2021).

344 Um agravante em relação a constatação da RAM em *E. coli*, é a capacidade de essa espécie
345 trocar material genético de forma eficiente tanto com outras bactérias da mesma espécie
346 patogênicas como com espécies de outros gêneros como *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* e *Vibrio*
347 (DELMANI et al., 2017). A habilidade de transferir elementos genéticos móveis por essa bactéria
348 tem contribuído significativamente na disseminação de genes de resistência clinicamente
349 relevantes, o que é particularmente preocupante devido às infecções associadas (MBELLE et al.,
350 2019; FUGA et al., 2022). *E. coli* é capaz tanto de doar quanto de receber genes de resistência. A
351 aquisição de genes que codificam β -lactamases de espectro estendido é preocupante e a
352 identificação desses genes em isolados de *E. coli* vem crescendo nas últimas décadas, sendo a THG
353 responsável pela maior parte destes eventos (POIREL et al., 2018).

354 Dentre as cepas de *E. coli* envolvidas em THG destaca-se *E. coli* J53 AzR, que é derivada
355 da *E. coli* K12, isolada inicialmente de amostra de fezes colhida de um paciente com difteria em
356 1922. Esta cepa é uma das cepas mais utilizadas como receptora em estudos experimentais sobre
357 o processo de conjugação e resistente à azida sódica devido à substituição de um único nucleotídeo
358 no gene *secA*, e ainda, negativa para fatores de fertilidade (YI et al., 2012).

360 **3.5 Chicken juice (CJ) e soro de leite (SL)**

361
362 Na indústria processadora de alimentos, a remoção insuficiente de matéria orgânica das
363 superfícies e ambientes pode se tornar uma importante fonte de contaminação bacteriana. A
364 matéria orgânica serve como substrato para as bactérias e facilita a colonização e posterior
365 formação de biofilmes (CARVALHO et al., 2019).

366 Além da influência direta da matéria orgânica como nutriente, estudos têm demonstrado
367 que alguns subprodutos naturalmente presentes na indústria, como o exsudato de frango ou *chicken*
368 *juice* (CJ), estimulam a formação de biofilmes fortes por *Campylobacter jejuni* e *S. Minnesota*. O
369 CJ é composto por 2,79% de proteínas, 0,06% de carboidratos, lipídeos e açúcares e é uma fonte
370 de nutrientes que proporciona um meio ideal para os micro-organismos sobreviverem, se aderirem
371 e se multiplicarem (MELO et al., 2017; MELO et al., 2021).

372 Os exsudatos de carne de frango após esterilização por filtração vêm sendo utilizados como
373 modelo para mimetizar o ambiente presente no processamento de carnes. A suplementação dos

meios de cultivo usuais com cerca de 5% de *CJ* demonstrou influência positiva no crescimento e indução de resposta transcricional de micro-organismos, possivelmente causados pela capacidade que o *CJ* tem de fornecer uma camada de condicionamento em superfícies abióticas, o que propicia maior fixação e adesão da bactéria (LI et al., 2017; BROWN et al., 2014; BROWN et al., 2013; LIGOWSKA et al., 2011).

Além disso, a manutenção de células viáveis e a formação de biofilmes fortes com a suplementação com *CJ* dão suporte à hipótese de que este coproduto favorece a sobrevivência e permanência de micro-organismos na cadeia produtiva e pode configurar importante papel na inocuidade do alimento oferecido ao consumidor (MELO et al., 2017). O problema amplia-se quando esse ambiente pode promover a disseminação da RAM, considerando que biofilmes possuem alta densidade celular e proximidade entre as células, o que facilita a transferência horizontal de genes por conjugação (VIROLLE et al., 2020).

Outro coproduto usualmente presente em indústrias processadoras de leite e derivados é o soro gerado na produção de queijos. As características e composição do SL dependem da composição do leite, que é influenciada pela raça, espécie do animal, saúde, dieta e estágio de lactação, entre outros, além da variedade de queijo produzida e tecnologia de fabricação utilizada (PRAZERES; CARVALHO; RIVAS, 2012).

Na produção da maioria dos queijos é utilizada a coagulação enzimática, onde a K-caseína do leite, que é insensível ao cálcio, é hidrolisada pela enzima quimosina em dois grandes peptídeos, sendo um hidrofóbico (para-k-caseína) e outro hidrofílico e denominado glicomacropetídeo ou caseinomacropetídeo (CMP), que não é incorporado à massa coagulada. Com isso, grande parte da água de constituição do leite e porcentagens variadas dos outros componentes são removidos na forma de soro, um líquido verde amarelado, devido a presença de vitamina B2. A composição média do SL proveniente de coagulação enzimática é basicamente água (93-94%), lactose (4,5-5,0%), proteínas (0,8-1,0%), gorduras (0,3-0,5%), sais minerais (0,6-1,0%) como cálcio, sódio, magnésio, potássio e fósforo, vitaminas solúveis do leite como a vitamina B12, B6 e C, ácido pantotênico, riboflavina, tiamina e retinol, além de ácido láctico, ácido cítrico, compostos nitrogenados não-proteicos (ureia e ácido úrico) e CMP (VIDAL; SARAN NETTO, 2018; PRAZERES; CARVALHO; RIVAS, 2012; NUNES; SANTOS, 2015).

No entanto, pouco se sabe a respeito da influência do soro de leite na multiplicação bacteriana, estímulo à formação de biofilmes e taxas de recombinação gênica. Isto instiga a realização de pesquisas para investigar se este subproduto possuiu efeitos similares ao *CJ*.

3.6 Complexo de cobre

O cobre (Cu) é um metal essencial, de número atômico 29 e uma massa atômica de 63,546u. A essencialidade desse elemento se deve à habilidade de modificar os estados de oxidação, alternando entre cobre (I) (íon cuproso) e cobre (II) (íon cúprico) e atuar como doador e receptor de elétrons. Além disso, como um componente enzimático alostérico, o cobre é necessário como cofator catalítico em diversas reações enzimáticas críticas, está envolvido no metabolismo energético, respiração e síntese de DNA na célula e é também um potente antioxidante com um papel importante no sistema de defesa oxidante (STERN, 2010; MONTEIRO, 2022).

Porém, apesar de o cobre ser um nutriente necessário para humanos, animais e plantas, o excesso de exposição pode representar riscos à saúde humana, como danos hepáticos e renais, anemia, imunotoxicidade e toxicidade no desenvolvimento embrionário. Por outro lado, a deficiência desse elemento é ainda mais preocupante, pois afeta de forma direta ou indireta os componentes do sistema de defesa oxidante, e como consequência, aumenta a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) provocando danos oxidativo a lipídeos, DNA e proteínas (ATSDR, 2022; PAVELKOVÁ et al., 2018).

Apesar do cobre estar envolvido no crescimento de micro-organismos, por ser um cofator para várias enzimas, possui propriedades antimicrobianas. Ainda não está totalmente esclarecido quais mecanismos o Cu utiliza para exercer a atividade antimicrobiana, mas sabe-se que esse efeito depende de diversos fatores como: forma física (íons ou nanopartículas), composição, estado químico (estado de oxidação), proximidade de micróbios a superfícies contendo Cu, concentração, temperatura e forma de aplicação (úmido ou seco) e presença de tampões ou contaminantes no ambiente químico (MITRA; KANG; NEOH, 2019).

Estudos demonstraram que a atividade antimicrobiana deste elemento está relacionada a seu comportamento oxidativo, bem como com as propriedades de solubilidade dos óxidos de cobre. Acredita-se que a “morte por contato” inicia-se pela liberação dos íons de Cu e seu acúmulo dentro da célula ou na membrana bacteriana, o que provoca danos à membrana por despolarização e vazamento de componentes intracelulares. Esta situação pode ser desencadeada por dano

oxidativo dos fosfolipídios da membrana. Outros mecanismos de ação do cobre também têm sido sugeridos como: inibição da respiração celular, inativação de proteínas, potencial de causar danos celulares por produção de ROS, que leva a destruição oxidativa de componentes celulares e, por fim, degradação de DNA genômico e/ou plasmidial (VINCENT et al., 2018; GRASS; RENSING; SOLIOZ et al. 2011; MITRA; KANG; NEOH, 2019).

No presente estudo foi utilizado o complexo de cobre $[Cu(Clmp)(mftpy)](PF_6)_2$, (Clmp: (4-cloro-N-(piridina-2-metileno)anilina) e mftpy (4-metilfenilterpiridina), que foi sintetizado e caracterizado por análise elementar, espectrometria de massa de alta resolução, espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier, ultravioleta-visível e espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica. Nesse complexo, os íons Cu (II) assumem uma geometria piramidal quadrada, envolvendo os três átomos de nitrogênio do ligante mftpy e dois átomos de nitrogênio de Clmp. Em ambos os casos, dois ânions PF_6^- atuam como contra íons (TAKEUCHI et al. – em fase de elaboração).

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR) (2022) **Toxicological profile for copper**. ATSDR. Atlanta, Georgia. Disponível em: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp132.pdf>. Acesso em: 18 nov. 2022.
- ALDERLIESTEN, J. B. *et al.* Effect of donor-recipient relatedness on the plasmid conjugation frequency: a meta-analysis. **BMC microbiology**, London, v. 20, n. 1, p. 1-10, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01825-4>.
- ANDINO, A.; HANNING, I. Salmonella enterica: survival, colonization, and virulence differences among serovars. **The Scientific World Journal**, United Kingdom, v. 2.015, 2015. DOI: 10.1155/2015/520179.
- AUTORIDADE DE SEGURANÇA ALIMENTAR E ECONOMICA – ASAE. **Escherichia coli**. Lisboa, PT, 2022. Portal. Disponível em: <https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/riscos-biologicos/escherichia-coli.aspx>. Acesso em: 24 nov. 2022.
- BANERJI, S. *et al.* Genome-based Salmonella serotyping as the new gold standard. **Scientific reports**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 1-10, 2020. DOI: 10.1038/s41598-020-61254-1
- BERENDONK, T. U. *et al.* Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. **Nature reviews microbiology**, London, v. 13, n. 5, p. 310-317, 2015. DOI: 10.1038/nrmicro3439.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual técnico de diagnóstico laboratorial de Salmonella spp.**: diagnóstico laboratorial do gênero Salmonella, 2011. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/publicacoes-svs/doencas-diarreicas-agudas/manual-tecnico-de-diagnostico-laboratorial-das-salmonella-spp.pdf/view>. Acesso: 05 jan. 2023.
- BROWN, H. L. *et al.* Chicken juice enhances surface attachment and biofilm formation of Campylobacter jejuni. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 80, n. 22, p. 7.053-7.060, 2014. DOI: 10.1128/AEM.02614-14.
- BROWN, H. L. *et al.* Tetrazolium reduction allows assessment of biofilm formation by Campylobacter jejuni in a food matrix model. **Journal of applied microbiology**, Oxford, v. 115, n. 5, p. 1.212-1.221, 2013. DOI: 10.1111/jam.12316.
- BUTAYE, P. *et al.* The clonal spread of multidrug-resistant non-typhi Salmonella serotypes. **Microbes and Infection**, Paris, v. 8, n. 7, p. 1.891-1.897, 2006. DOI: 10.1016/j.micinf.2005.12.020.
- CARVALHO, A. C. *et al.* Formação e resistência do Biofilme Microbiano em indústrias processadoras de alimentos. **Enciclopédia Biosfera**, Jandáia, GO, v. 16, n. 30, 2019. DOI: 10.18677/EnciBio_2019B31.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. CDC. Antibiotic Resistance Threats in the United States. **US Department of Health and Human Services**, Washington, DC, USA, 2019. Disponível em: <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/2019-ar-threats-report-508.pdf>. Acesso em: 19 dez. 2022.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **CDC**. Atlanta, Estados Unidos, 2022a. Portal. Disponível em: <https://www.cdc.gov/ecoli/index.html>. Acesso em: 22 nov. 2022.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **CDC**. Atlanta, Estados Unidos, 2022b. Portal. Disponível em: <https://www.cdc.gov/salmonella/general/technical.html#one>. Acesso em: 16 set. 2022.

CHATTERJEE, A. *et al.* Antagonistic self-sensing and mate-sensing signaling controls antibiotic-resistance transfer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 110, n. 17, p. 7.086-7.090, 2013. DOI: 10.1073/pnas.1212256110.

CHAUDHARY, M. K.; JADHAV, I.; BANJARA, M. R. Molecular Detection of *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} and *bla*_{SHV} Genes in Extended Spectrum β -Lactamase (ESBL) *Escherichia Coli* from Clinical Samples, **Journal of Microbiology and Bacteriology Research**, [S. l.], p. 1–16, 2021. DOI: 10.21203/rs.3.rs-965153/v1.

COLLIGNON, P. J.; MCEWEN, S. A. One health – Its importance in helping to better control antimicrobial resistance. **Tropical medicine and infectious disease**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 22, 2019. DOI: 10.3390/tropicalmed4010022.

DAI, W. *et al.* Analysis of antibiotic-induced drug resistance of *Salmonella enteritidis* and its biofilm formation mechanism. **Bioengineered**, [S. l.], v. 12, n. 2, p. 10.254-10.263, 2021. DOI: 10.1080/21655979.2021.1988251.

DELMANI, F. A. *et al.* Characterization of ampicillin resistant gene (*bla*_{TEM-1}) isolated from *E. coli* in Northern Jordan. **Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 7, p. 11-15, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3390/app12199964>.

ELHARIRI, M. *et al.* Virulence and antibiotic resistance patterns of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Salmonella enterica* serovar Heidelberg isolated from broiler chickens and poultry workers: a potential hazard. **Foodborne Pathogens and Disease**, [S. l.], v. 17, n. 6, p. 373-381, 2020. DOI: 10.1089/fpd.2019.2719.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2022. Annual report of the European antimicrobial resistance surveillance network (EARS-net). **ECDC**, 2022. DOI: 10.2900/112339.

FUGA, B. *et al.* Who Critical Priority *Escherichia coli* as One Health Challenge for a Post-Pandemic Scenario: Genomic Surveillance and Analysis of Current Trends in Brazil. **Microbiology spectrum**, [S. l.], v. 10, n. 2, p. e01256-21, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1128/spectrum.01256-21>

- GIL-GIL, T. *et al.* Antimicrobial resistance: A multifaceted problem with multipronged solutions. **Microbiologyopen**, [S. l.], v. 8, n. 11, p. e945, 2019. DOI: 10.1002/mbo3.945.
- GRASS, G.; RENSING, C.; SOLIOZ, M. Metallic copper as an antimicrobial surface. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 77, n. 5, p. 1.541-1.547, 2011. DOI: 10.1128/AEM.02766-10.
- GUNDRAN, R. S. *et al.* Prevalence and distribution of blaCTX-M, blaSHV, blaTEM genes in extended-spectrum β -lactamase-producing *E. coli* isolates from broiler farms in the Philippines. **BMC veterinary research**, [S. l.], v. 15, n. 1, p. 1-8, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1975-9>.
- GUT, A. M. *et al.* Salmonella infection–prevention and treatment by antibiotics and probiotic yeasts: a review. **Microbiology**, New York, v. 164, n. 11, p. 1.327-1.344, 2018. DOI: 10.1099/mic.0.000709.
- HAQUE, M. A. *et al.* Isolation of multidrug-resistant *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. from sulfonamide-treated diarrheic calves, **Veterinary World**, [S. l.], v. 15, n. 12, p. 2.870-2.876, 2022. DOI: www.doi.org/10.14202/vetworld.2022.2870-2876.
- HASEGAWA, H.; SUZUKI, E.; MAEDA, S. Horizontal plasmid transfer by transformation in *Escherichia coli*: environmental factors and possible mechanisms. **Frontiers in microbiology**, London, v. 9, p. 2.365, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02365>.
- HERNANDO-AMADO, S. *et al.* Defining and combating antibiotic resistance from One Health and Global Health perspectives. **Nature microbiology**, London, v. 4, n. 9, p. 1.432-1.442, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0503-9>.
- HU, B.; KHARA, P.; CHRISTIE, P. J. Structural bases for F plasmid conjugation and F pilus biogenesis in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 116, n. 28, p. 14.222-14.227, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1904428116>.
- HUDDLESTON, J. R. Horizontal gene transfer in the human gastrointestinal tract: potential spread of antibiotic resistance genes. **Infection and drug resistance**, [S. l.], v. 7, p. 167, 2014. DOI: 10.2147/IDR.S48820.
- ILANGO VAN, A.; CONNERY, S.; WAKSMAN, G. Structural biology of the Gram-negative bacterial conjugation systems. **Trends in microbiology**, Cambridge, v. 23, n. 5, p. 301-310, 2015. DOI: 10.1016/j.tim.2015.02.012.
- JANG, J. *et al.* Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications – A review. **Journal of applied microbiology**, Oxford, v. 123, n. 3, p. 570-581, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1111/jam.13468>.

KRASNOVSKAYA, O. *et al.* Copper coordination compounds as biologically active agents. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 21, n. 11, p. 3.965, May 2020. DOI: 10.3390/ijms21113965.

LEE, C. A.; GROSSMAN, A. D. Identification of the origin of transfer (oriT) and DNA relaxase required for conjugation of the integrative and conjugative element ICE Bs1 of *Bacillus subtilis*. **Journal of bacteriology**, Washington, v. 189, n. 20, p. 7.254-7.261, 2007. DOI: 10.1128/JB.00932-07.

LI, J. *et al.* Effects of meat juice on biofilm formation of *Campylobacter* and *Salmonella*. **International journal of food microbiology**, Amsterdam, v. 253, p. 20-28, 2017. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.04.013.

LIGOWSKA, M. *et al.* Effect of chicken meat environment on gene expression of *Campylobacter jejuni* and its relevance to survival in food. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 145, p. S111-S115, 2011. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.08.027.

LOW, W. W. *et al.* Mating pair stabilization mediates bacterial conjugation species specificity. **Nature microbiology**, London, v. 7, n. 7, p. 1.016-1.027, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41564-022-01146-4>.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Resistência aos Antimicrobianos**. 24 Nov. 2022. Portal. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/resistencia-aos-antimicrobianos/antimicrobianos>. Acesso em: 10 dez. 2022.

MBELLE, N. M. *et al.* The resistome, mobilome, virulome and phylogenomics of multidrug-resistant *Escherichia coli* clinical isolates from Pretoria, South Africa. **Scientific reports**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 1-16, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52859-2>.

MCEWEN, S. A.; COLLIGNON, P. J. Antimicrobial resistance: a one health perspective. **Microbiology spectrum**, [S. l.], v. 6, n. 2, p. 6.2.10, 2018. DOI: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0009-2017.

MELO, R. T. *et al.* Intrinsic and extrinsic aspects on *Campylobacter jejuni* biofilms. **Frontiers in Microbiology**, London, v. 8, p. 1.332, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01332>.

MELO, R. T. *et al.* *Salmonella enterica* serovar Minnesota biofilms, susceptibility to biocides, and molecular characterization. **Pathogens**, Switzerland, v. 10, n. 5, p. 581, May 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens10050581>.

MICHAEL, G. B. *et al.* Extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolates collected from diseased food-producing animals in the GERM-Vet monitoring program 2008–2014. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 200, p. 142-150, 2017. DOI: 10.1016/j.vetmic.2016.08.023.

MITRA, D.; KANG, E.-T.; NEOH, K. G. Antimicrobial copper-based materials and coatings: potential multifaceted biomedical applications. **ACS applied materials & interfaces**, [S. l.], v. 12, n. 19, p. 21.159-21.182, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsami.9b17815>.

MONTEIRO, G. P. *et al.* A Ternary Copper (II) Complex with 4-Fluorophenoxyacetic Acid Hydrazide in Combination with Antibiotics Exhibits Positive Synergistic Effect against *Salmonella Typhimurium*. **Antibiotics**, [S. l.], v. 11, n. 3, p. 388, March 2022. DOI: 10.3390/antibiotics11030388.

MURRAY, C. J. L. *et al.* Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **The Lancet**, [S. l.], v. 399, n. 10.325, p. 629-655, fev. 2022. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)02724-0.

NAIR, D. V. T; VENKITANARAYANAN, K.; KOLLANOOR JOHNY, A. Antibiotic-resistant *Salmonella* in the food supply and the potential role of antibiotic alternatives for control. **Foods**, [S. l.], v. 7, n. 10, p. 167, 2018. DOI: 10.3390/foods7100167.

NCBI. PubChem Compound Summary for CID 6249, Ampicillin. **NCBI – National Center for Biotechnology Information**. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ampicillin>. Acesso em: 28 dez. 2022. DOI: 10.5281/zenodo.2628786.

NEIL, K.; ALLARD, N.; RODRIGUE, S. Molecular mechanisms influencing bacterial conjugation in the intestinal Microbiota. **Frontiers in microbiology**, London, v. 12, p. 673260, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.673260>.

NUNES, L.; SANTOS, M. G. Caracterização físico-química de soros obtidos de diferentes tipos de queijos. **Horizonte Científico**, Uberlândia, MG, v. 9, n. 2, 2015.

PALLARES-VEGA, R. *et al.* Temperature and nutrient limitations decrease transfer of conjugative IncP-1 plasmid pKJK5 to wild *Escherichia coli* strains. **Frontiers in microbiology**, London, v. 12, p. 656250, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.656250>.

PALMER, T. R. S. *et al.* Structure of the cytoplasmic domain of SctV (SsaV) from the *Salmonella* SPI-2 injectisome and implications for a pH sensing mechanism. **Journal of Structural Biology**, Orlando, v. 213, n. 2, p. 107729, jun. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2021.107729>

PAVELKOVÁ, M. *et al.* Biological role of copper as an essential trace element in the human organism. Biologická role mědi jako základního stopového prvku v lidském organismu. **Ceska Slov Farm**, Praha, v. 67, n. 4, p. 143-153, 2018. Disponível em: <https://www.prolekare.cz/en/journals/czech-and-slovak-pharmacy/2018-4-14/biological-role-of-copper-as-an-essential-trace-element-in-the-human-organism-107068>. Acesso em: 01 dez. 2022.

PEECHAKARA, B.V.; BASIT, H.; GUPTA, M. Ampicillin. *In: StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing, 2022.

PLASMID. Definicion. **NIH Researchers** – On-line, 2023. Disponível em: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Plasmid>. Acesso em: 19 jan. 2023.

POIREL, L. *et al.* Antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. **Microbiology Spectrum**, [S. l.], v. 6, n. 4, p. 6.4.14, 2018. DOI: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0026-2017.

PRAZERES, A. R.; CARVALHO, F.; RIVAS, J. Cheese whey management: A review. **Journal of environmental management**, London, v. 110, p. 48-68, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.05.018>.

REYGAERT, W. C. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. **AIMS microbiology**, [S. l.], v. 4, n. 3, p. 482, 2018. DOI: 10.3934/microbiol.2018.3.482.

SAKUDA, A. *et al.* Conjugative selectivity of plasmids is affected by coexisting recipient candidates. **Msphere**, [S. l.], v. 3, n. 6, p. e00490-18, 2018. DOI: 10.1128/mSphere.00490-18.

SHINTANI, M.; OHKUMA, M.; KIMBARA, K. High-resolution comparison of bacterial conjugation frequencies. **Journal of Visualized Experiments**, London, n. 143, p. e57812, 2019. DOI: 10.3791/57812.

SOUCY, S.M.; HUANG, J.; GOGARTEN, J. P. Horizontal gene transfer: building the web of life. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 16, n. 8, p. 472-482, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrg3962>.

SOUZA, A. I. *et al.* High occurrence of β -lactamase-producing *Salmonella* Heidelberg from poultry origin. **PLoS One**, San Francisco, v. 15, n. 3, p. e0230676, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230676>.

SRICHUMPORN, W. *et al.* Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* from pork in Muang district, Chiang Mai Province, Thailand, **Veterinary World**, Wankaner, v. 15 n. 12, p. 2.903-2.909, 2022. DOI: 10.3201/eid1707.110209.

STERN, R. B. Essentiality and toxicity in copper health risk assessment: overview, update and regulatory considerations. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, [S. l.], v. 74, p. 114-127, 2010. DOI: 10.1080/15287390903337100.

SULTAN, I. *et al.* Antibiotics, resistome and resistance mechanisms: a bacterial perspective. **Frontiers in microbiology**, London, v. 9, p. 2.066, 2018. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02066.

TAKEUCHI, M. G. *et al.* Synthesis, design and *in vitro* activity of new copper compounds against *Campylobacter* spp. Ainda não publicado.

TAYLOR, A. A. *et al.* Critical review of exposure and effects: implications for setting regulatory health criteria for ingested copper. **Environmental management**, New York, v. 65, n. 1, p. 131-159, 2020. DOI: 10.1007/s00267-019-01234-y.

VIDAL, A. M. C.; SARAN NETTO, A. (Org.). **Obtenção e processamento do leite e derivados**. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (FZEA-USP), Pirassununga-SP, 2018. DOI: 10.11606/9788566404173.

VINCENT, M. *et al.* Contact killing and antimicrobial properties of copper. **Journal of applied microbiology**, Oxford, v. 124, n. 5, p. 1.032-1.046, 2018. DOI: 10.1111/jam.13681.

VIROLLE, C. *et al.* Plasmid transfer by conjugation in gram-negative bacteria: from the cellular to the community level. **Genes**, *[S. l.]*, v. 11, n. 11, p. 1.239, 2020. DOI: 10.3390/genes11111239.

VON WINTERSDORFF, C. J. H. *et al.* Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. **Frontiers in microbiology**, London, v. 7, p. 173, 2016. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00173.

WALSH, C. *et al.* Transfer of ampicillin resistance from Salmonella Typhimurium DT104 to Escherichia coli K12 in food. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 210-215, 2008. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2007.02288.x.

WEBBER, B. *et al.* Detection of virulence genes in Salmonella Heidelberg isolated from chicken carcasses. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 61, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1590/s1678-9946201961036>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO**. Genova, Suíça, 2018. Portal. Disponível em: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal)). Acesso em: 16 set. 2022.

YI, H. *et al.* Genome sequence of Escherichia coli J53, a reference strain for genetic studies. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 194, n. 14, 2012. DOI: 10.1128/JB.00641-12.

ZALEVSKAYA, O. A.; GUR'EVA, Y. A. Recent Studies on the Antimicrobial Activity of Copper Complexes. **Russian Journal of Coordination Chemistry**, *[S. l.]*, v. 47, n. 12, p. 861-880, Dec. 2021. DOI:10.1134/s1070328421120046.

785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818

CAPÍTULO II

Transferência do gene *bla*_{TEM} entre *Salmonella* e *Escherichia coli* em condições de beneficiamento de produtos de origem animal: influência de um complexo de cobre

Artigo a ser publicado no periódico
Microbiology Spectrum
FI: 9,043 (JCR 2022)

Normas para publicação:
<https://journals.asm.org/journal/spectrum/article-types>
(ANEXO I)

**Transfer of *bla*_{TEM} Gene Between *Salmonella* and *Escherichia Coli* under
Processing Conditions of Animal Products: Influence of a Copper Complex**

**Rosanne Aparecida Capanema Ribeiro,^{a*} Micaela Guidotti-Takeuchi,^a Roberta Torres de
Melo,^a Carolyne Ferreira Dumont,^a Bárbara de Araújo Brum,^a Thais Jansen Martins,^a
Wendell Guerra^b, Luana Munique Sousa Ramos,^b Daise Aparecida Rossi^a**

^aLaboratório de Biotecnologia Animal Aplicada, Faculdade de Medicina Veterinária,
Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Brasil

^b Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Brasil

* Autor correspondente (e-mail: rosanneacr@yahoo.com.br)

RESUMO

A alta prevalência de infecções causadas por alimentos contaminados, associada à crescente resistência antimicrobiana, em especial por transferência horizontal de genes, é um desafio para a saúde pública mundial. É possível que essa situação se intensifique na presença de subprodutos provenientes de indústrias beneficiadoras de produtos de origem animal. Diante disso, investigamos a transferência horizontal do gene *bla*_{TEM} de *S. Heidelberg* para *E. coli* J53 AzR, na ausência e presença de soro de leite (SL) e *chicken juice* (CJ) em: i) meio líquido por três horas sob agitação; ii) meio sólido *overnight*; iii) meio líquido *overnight* e a influência do complexo de cobre Lu54 na mitigação dessa transferência. O primeiro método apresentou maior frequência de conjugação (FCR), de 2,23% na ausência de suplementos, e intensificado em três e quatro ordens de magnitude na presença de CJ e SL e foi selecionado para tratamento com Lu54. Em sólido/*overnight*, houve FCR inferiores a 1%, enquanto o meio líquido/*overnight* apresentou FCR

superior ao primeiro método apenas em SL. A presença do SL acidificou o meio, o que refletiu em maiores FCR. O Lu 54 reduziu FCR, de 2,2 para 0,3%, 8,2 para 1,7% e 6,2 para 0,9%, respectivamente, para os testes sem subprodutos e com SL e *CJ*. Os resultados comprovam que o SL e *CJ* aumentam a transferência de *bla*_{TEM} em meio líquido, e o complexo Lu54 é uma alternativa promissora para mitigar a conjugação e, conseqüentemente, a disseminação da resistência aos antimicrobianos, especialmente em indústrias de beneficiamento de leite e carne.

IMPORTÂNCIA

A Organização Mundial da Saúde descreve a resistência aos antimicrobianos (RAM) como crise global e uma catástrofe iminente de um retorno à era pré-antibiótica. As estratégias globais de mitigação devem identificar situações facilitadoras da disseminação da RAM e, assim, considerando que a recombinação gênica é um dos principais motores da evolução bacteriana, conhecer as frequências de transferência (FT) de genes responsáveis pela RAM em ambientes beneficiadores de alimentos e o efeito de novos agentes antimicrobianos sobre este fenômeno é particularmente importante. Investigamos métodos para determinar FT por conjugação sob a influência da presença do soro de leite e *chicken juice*, comumente presentes no ambiente industrial e efluentes, e o efeito de um complexo de cobre como método de controle na transferência do gene *bla*_{TEM} entre *Salmonella* e *Escherichia coli*. Nossos resultados demonstram circunstâncias que podem interferir nas frequências de conjugação, fornecendo estratégia de controle para disseminação da RAM.

PALAVRAS-CHAVE: Conjugação bacteriana, soro de leite, *chicken juice*, complexo de cobre, *bla*_{TEM}.

INTRODUÇÃO

Salmonella Heidelberg e *Escherichia coli* são patógenos de importância mundial, frequentemente relacionados a surtos de origem alimentar (1, 2). As manifestações clínicas associadas ao consumo de alimentos contaminados por essas bactérias caracterizam-se especialmente por sintomas entéricos, porém, dependendo da relação hospedeiro vs parasita, podem ser observadas complicações até mesmo fatais (3, 4).

Além dos perigos à saúde e prejuízos econômicos associados às doenças infecciosas devido às consideráveis taxas de morbidade e mortalidade, há crescente preocupação com um problema adicional, o aumento da resistência aos antimicrobianos (RAM), que faz com que o tratamento e controle sejam mais difíceis. Apesar da RAM ocorrer naturalmente em bactérias, alguns fatores podem agravar o problema e contribuir na disseminação. Entre esses, incluem-se o uso inadequado de antimicrobianos, a escassa regulamentação e fiscalização do uso de antibióticos veterinários e humanos, que exercem pressão de seleção de cepas resistentes, estendendo-se, até mesmo, a outros antimicrobianos não envolvidos no desafio inicial (5, 6, 7). Como consequência, dados apresentados pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (2019) demonstram que mais de 2,8 milhões de infecções resistentes a antibióticos ocorrem nos Estados Unidos a cada ano, resultando em mais de 35 mil mortes (8).

Um dos antibióticos amplamente utilizados para tratar diversas infecções por bactérias Gram positivas e negativas é o beta lactâmico ampicilina, que atua inibindo a síntese da parede celular bacteriana, provocando seu enfraquecimento e lise celular (9). Entretanto, embora ainda muito utilizada, o aumento da RAM a essa droga é crescente, em especial pela presença de genes de resistência aos β -lactâmicos, como o *bla*_{TEM} (1, 10, 11).

887 Dentre os fatores que contribuem para a disseminação da RAM, destaca-se a transferência
888 horizontal de genes, em que há aquisição, temporária ou permanente, de material genético de outro
889 micro-organismo. A transferência pode ocorrer por meio da transformação, transdução e
890 conjugação (5). A conjugação envolve a transferência de plasmídeos pelo contato direto entre uma
891 bactéria doadora e uma receptora, e é considerada a forma mais comum de transferência de genes
892 de resistência (12). Os plasmídeos que contêm genes de RAM podem se espalhar rapidamente
893 entre diferentes cepas, espécies ou gêneros bacterianos, o que leva à disseminação global de vários
894 genes responsáveis pela resistência a diferentes classes de drogas (13, 14). A transferência gênica
895 também pode proporcionar à bactéria receptora novas capacidades metabólicas, que a ajuda a se
896 adaptar a variados nichos ecológicos (15).

897 Diferentes situações podem influenciar a frequência de conjugação como a densidade
898 celular, substrato sólido ou líquido, temperatura, presença de nutrientes, entre outros (16, 17), mas
899 as estratégias de compartilhamento de genes entre bactérias ainda apresentam um cenário pouco
900 conhecido na esfera da cadeia produtiva de alimentos. Isso instiga ao questionamento a respeito
901 da influência de subprodutos presentes em beneficiadores de produtos de origem animal, como o
902 *chicken juice* e o soro de leite nas taxas de conjugação bacteriana. Sabe-se que o *chicken juice*
903 estimula a multiplicação e é capaz de interferir positivamente em mecanismos de virulência
904 bacteriana, como a formação de biofilme (18), porém sua atuação não é conhecida quando se trata
905 de transferências gênicas. Também não foram encontrados na literatura estudos que investigam se
906 o soro de leite pode exercer alguma influência neste fenômeno.

907 Como forma de mitigar os perigos da resistência aos antimicrobianos disponíveis, destaca-
908 se a importância de se procurar novas alternativas, e dentre as opções estão os complexos de cobre,
909 que têm demonstrado propriedades antimicrobianas (19, 20). O cobre é um elemento essencial,

atua como cofator em diferentes reações enzimáticas, metabolismo energético, respiração, síntese de DNA celular, é também um poderoso antioxidante e já apresentou, por exemplo, eficácia na inibição de *S. Typhimurium* quando em sinergismo com outros antimicrobianos, o que faz com que a sua utilização no desenvolvimento de drogas antimicrobianas seja interessante (21, 22).

Objetivamos avaliar a influência de *chicken juice* e soro de leite na transferência do gene *bla*_{TEM} entre *Salmonella* Heidelberg e *E. coli* J53 AzR em diferentes condições, como meio sólido e líquido em diferentes tempos de incubação, e determinar a eficácia do complexo de cobre Lu54 ([Cu(Clmp)(mftpy)](PF₆)₂) em mitigar as taxas de recombinação por conjugação.

RESULTADOS

Frequência de conjugação – diferentes metodologias. As contagens da bactéria doadora, receptora e transconjugantes em todas essas repetições não demonstraram diferença estatística entre si ($p < 0,05$ – one way ANOVA), garantindo assim a manutenção quantitativa de cada teste.

Ao comparar os resultados obtidos nas três metodologias (GRÁFICO 1), consideramos que a conjugação 1 foi a mais efetiva, uma vez que a frequência de conjugação (FCR) foi de 2,23%, em detrimento a 0,79% e 1,98% identificados nos métodos 2 e 3, respectivamente. Em paralelo, detectamos que a técnica 1 também foi mais promissora na presença de SL e *CJ*, cujos percentuais de FCR foram equivalentes a 8,16 e 6,22%, respectivamente. A exceção coube ao método 3, que foi o mais efetivo na presença de SL (10,16%).

Evidenciamos que o SL aumentou as taxas de recombinação gênica, em especial em meios líquidos, nas conjugações 1 e 3, com valores equivalentes a quatro e cinco ordens de magnitude, respectivamente. Já o *CJ* aumentou as taxas em três ordens de magnitude para conjugação em líquido com três horas de incubação.

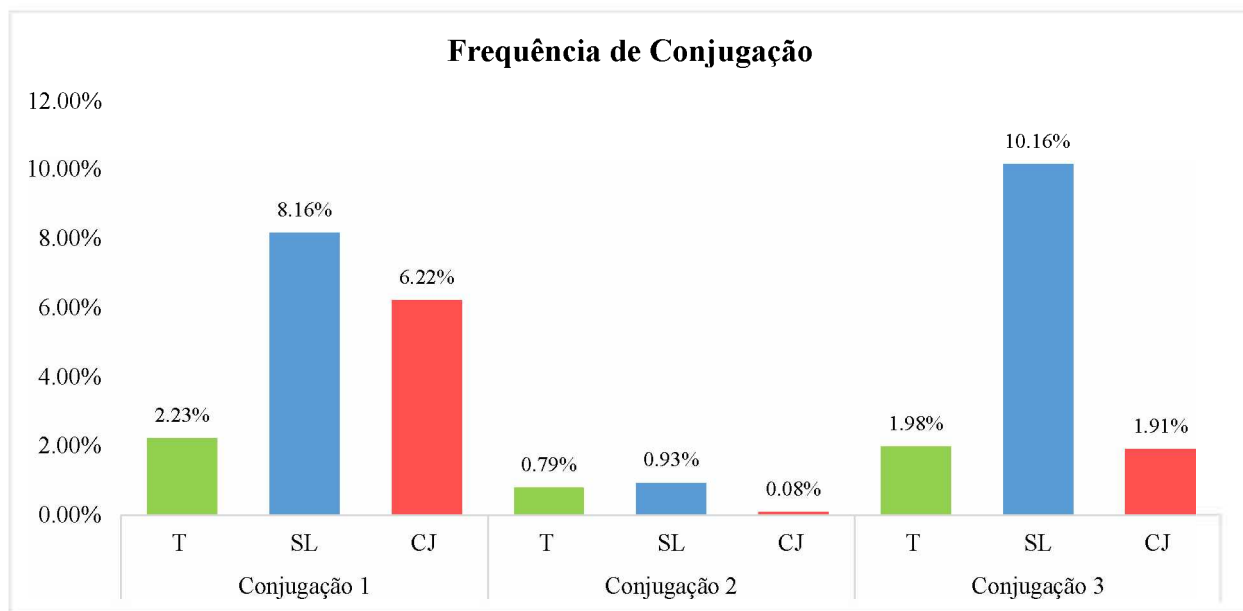


GRÁFICO 1 Porcentagem de frequências de conjugação nas diferentes metodologias.

T: tradicional; SL: Soro de leite; CJ: *chicken juice*

Vale considerar que o tempo de incubação nos meios de conjugação líquidos influenciou nos índices de pH, especialmente na presença do SL (GRÁFICO 2). Foi evidente a redução do pH do meio com SL, variando de um pH médio de 7,4 nos testes Tradicional e CJ para 5,2 no SL ($p < 0,0001$, one way ANOVA) após três horas e de 8,32 nos testes Tradicional e CJ, para 6,5 na suplementação com SL ($p = 0,0005$, one way ANOVA) na incubação *overnight*.

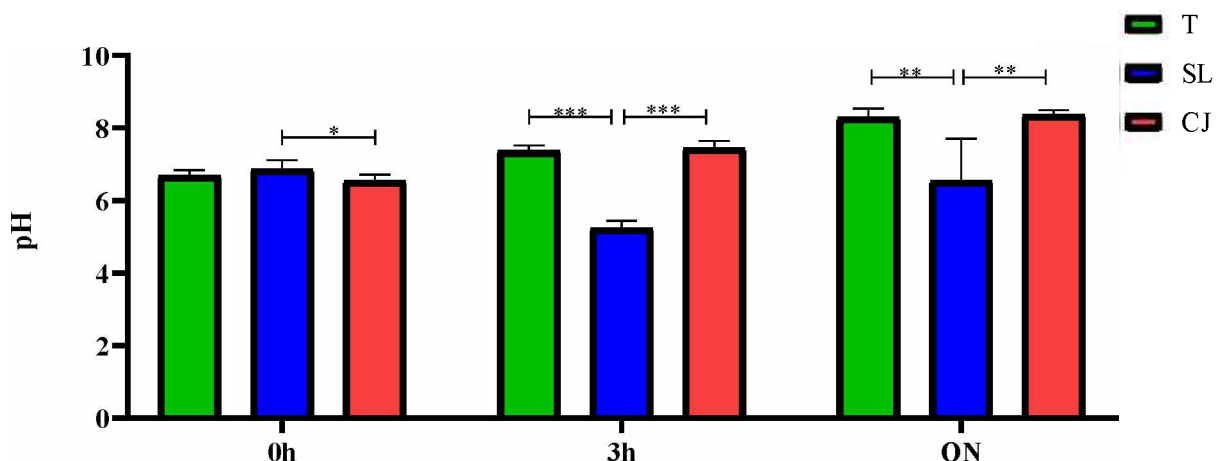


GRÁFICO 2 Variação de pH dos meios de conjugação em líquido nos diferentes momentos de incubação.

T= tradicional, com Luria Bertani (LB). SL= LB + 5% de soro de leite. CJ= LB + 5% de *chicken juice*. 0h: Imediatamente após a junção de doadora e receptora (início da conjugação). 3h: Fim da conjugação 1. ON= *overnight* (Fim da conjugação 3). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (one way ANOVA).

A TABELA 1 destaca as contagens médias (log UFC/mL) obtidas nos protocolos de conjugação em todos os testes. Em números absolutos, constamos que na conjugação 1 obtivemos um aumento médio de 0,4 e 0,5 log UFC/mL ($p=0,0130$) quando na presença de SL e CJ. Nos métodos 2 e 3, o aumento foi identificado somente na presença de SL e foram equivalentes às médias de 0,3 e 0,4 log UFC/mL ($p=0,0444$ e $p>0,05$), respectivamente. De maneira geral, a conjugação 2 foi a menos efetiva estatisticamente na produção de transconjugantes tanto no teste tradicional com LB quanto com a suplementação de SL e CJ ($p<0,0001$).

TABELA 1 Contagem média (Log UFC/mL) de bactérias doadoras, receptoras e transconjugantes e frequência de conjugação obtida nos três protocolos de conjugação, com e sem a adição de 5% de soro de leite e *chicken juice*

Cepa	Conjugação 1 (log UFC/mL)	Conjugação 2 (log UFC/mL)	Conjugação 3 (log UFC/mL)
Doadora (SH)	7,60±0,21 ^{Aa}	7,42±0,47 ^{Aa}	7,73±0,32 ^{Aa}
Receptora (J53)	7,63±0,34 ^{Ba}	7,50±0,12 ^{Ba}	7,76±0,33 ^{Ba}
Transconjugantes (T)	6,08±0,48 ^{Cb}	5,37±0,28 ^{Db}	6,27±0,28 ^{Cb}
Transconjugantes (SL)	6,47±0,50 ^{Ebc}	5,62±0,27 ^{Fb}	6,71±0,40 ^{Ec}
Transconjugantes (CJ)	6,54±0,32 ^{Gc}	4,23±0,52 ^{Hc}	6,11±0,39 ^{Gb}

Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística pelo teste de ANOVA ($p < 0,05$); Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística pelo teste de ANOVA ($p < 0,05$); T= Tradicional/Sem suplemento; SL= Soro de leite; CJ: *Chicken juice*. Conjugação 1: Meio líquido, incubado a 37°C, por três horas, 20rpm; Conjugação 2: Meio sólido, incubado a 37°C, *overnight*, sem agitação; Conjugação 3: Meio líquido, incubado a 37°C, *overnight*, sem agitação.

Tratamento com o complexo de cobre Lu54. Os testes para determinar a melhor concentração do complexo de cobre Lu 54 permitiram identificar que a concentração inibitória mínima (CIM) foi equivalente a 250 ug/mL, enquanto a concentração de 125 ug/mL foi a mais efetiva para a conjugação, uma vez que não houve diferença significativa na redução da contagem de *E. coli* ($p=0,42$) ou *Salmonella* Heidelberg ($p=0,46$), e desta forma, não interferiu nos resultados das conjugações. Nessa concentração, tivemos uma contagem de 6,71±0,30 log UFC/mL no controle e 6,84±0,37 log UFC/mL no teste com o Lu 54 em *E. coli*, já no teste com *S. Heidelberg* 6,81±0,58 log UFC/mL e 7,00±0,52 log UFC/mL no controle e teste, respectivamente.

O método de conjugação 1 foi selecionado para os testes com o Lu54 pela efetividade na produção de transconjugantes. O uso deste complexo de cobre mostrou eficiência no controle do processo de conjugação uma vez que houve redução na FCR de 2,2 para 0,3% no teste tradicional, de 8,2 para 1,7% na conjugação com SL e 6,2 para 0,9% com a presença de *CJ*, equivalentes a uma redução de 7,3, 4,8 e 6,9 vezes, respectivamente. Os valores absolutos encontrados também mostraram diferença estatística nas contagens de transconjugantes de 6,1 para 5,2 log UFC/mL na conjugação tradicional, 6,5 para 6,0 log UFC/mL na presença de SL e de 6,5 para 5,6 log UFC/mL com suplementação de *CJ* (GRÁFICO 3).

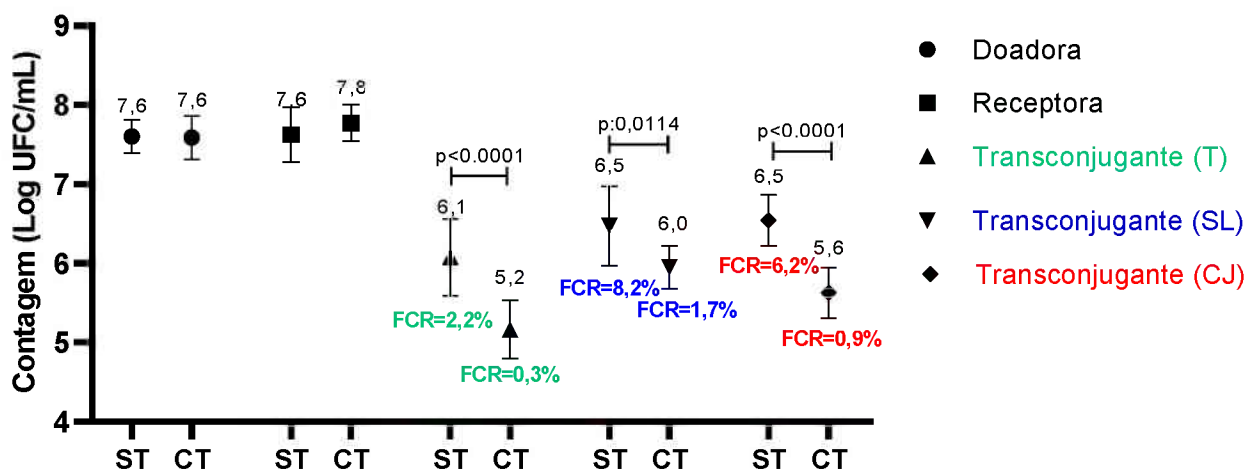


GRÁFICO 3 Comparação das contagens e frequência de conjugação obtidas nas conjugações com e sem tratamento com 125 ug/mL de Lu54 [Cu(Clmp)(mftpy)](PF₆)₂. ST: Sem tratamento Lu54; CT: Com tratamento Lu54; T: tradicional; SL: Soro de leite; *CJ*: chicken juice. FCR: Frequência da conjugação da receptora em percentual. p<0,0001 e p=0,0114, diferença estatística pelo Teste T na comparação com e sem tratamento com Lu54.

Análises moleculares. As análises moleculares evidenciaram a presença do gene *bla*_{TEM} em todas as colônias submetidas à PCR, de todas as metodologias testadas e também no tratamento com o complexo Lu54 (FIG 1). Esse resultado confirma de forma genotípica a conjugação já verificada nos métodos fenotípicos.

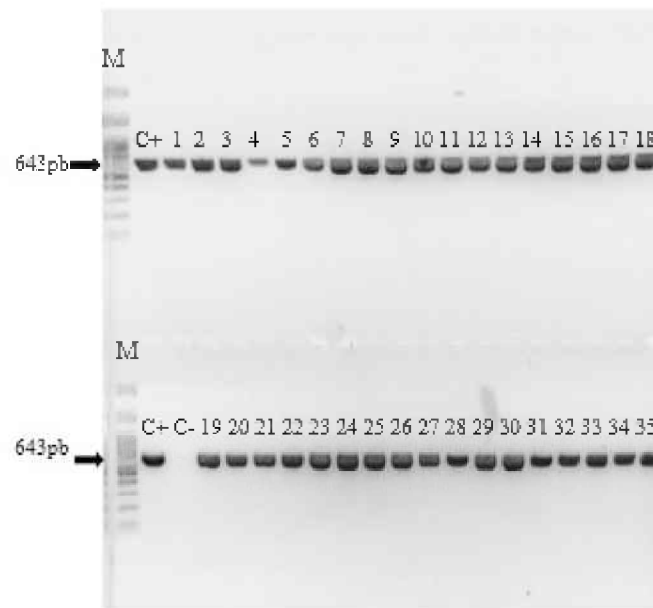


FIG 1 Gel de eletroforese confirmando a presença do gene *bla*_{TEM} nas transconjugantes de *E. coli*. M: marcador de peso molecular 100 pb; C+: controle positivo - cepa de *S. Heidelberg* com *bla*_{TEM} de 643 pb; C-: Controle negativo; 1 a 35: colônias de *E. coli* transconjugantes positivas para o gene *bla*_{TEM}.

DISCUSSÃO

O aumento da resistência a antimicrobianos (RAM) tem se tornado cada vez mais um problema de saúde pública global, o que faz urgente a busca por conhecimentos mais aprofundados acerca dos mecanismos que afetam e estimulam esse fenômeno e também a busca por novas alternativas de controle (23). Neste contexto, a conjugação é a forma de recombinação e disseminação de RAM mais frequente nas bactérias e dá-se pela transferência de um gene da bactéria doadora para a

1010 receptora por meio de contato direto (12). Essa transferência inicia-se no citoplasma, onde o
1011 relaxossomo se liga à origem de transferência (*oriT*) presente no DNA e, então, a proteína de
1012 acoplamento (T4CP) guia o complexo relaxossoma-*oriT* para o sistema de secreção do tipo IV
1013 T4SS presente na membrana, por onde a fita de DNA sai da bactéria doadora e passa para a
1014 receptora através do *pili* (24, 25).

1015 A transferência por conjugação pode ocorrer em diferentes momentos, meios e superfícies,
1016 como a microbiota intestinal (12), solo (26), condições aquáticas (27) e biofilmes microbianos
1017 (28). Não há uma metodologia definida para determinar a transferência de gene de resistência por
1018 conjugação, o que estimulou essa investigação sobre as diferenças nas transferências do *bla*_{TEM}
1019 tanto em meio líquido (em diferentes momentos) quanto em sólido.

1020 A conjugação em meio líquido provavelmente favorece a maior exposição e contato
1021 imediato entre as bactérias, o que potencializa o processo, conforme identificamos no método 1,
1022 que foi o mais eficiente. Este método também se diferenciou por utilizar o processo de agitação,
1023 que, além da aeração, pode melhorar o acesso aos nutrientes e aumentar a frequência de colisões
1024 celulares, como demonstraram Headd & Bradford (29), que também observaram que, de modo
1025 geral, houve maior frequência de conjugação em culturas agitadas do que não agitadas, embora
1026 uma agitação vigorosa possa fazer com que haja rompimento do pili conjugativo. No entanto, a
1027 manutenção dessas bactérias de um dia para o outro e, retirando a agitação moderada (conjugação
1028 3), pode reduzir a frequência de conjugação (FC) por oscilações extrínsecas e intrínsecas
1029 decorrentes do meio de manutenção, do metabolismo e da fisiologia bacteriana, como o estresse
1030 causado pelo aumento da osmolaridade, redução da disponibilidade nutricional e alterações de pH
1031 do meio (30, 31, 32).

Constatamos que as frequências médias de conjugação em meio sólido/*overnight* apresentaram taxas inferiores a 1% e, portanto, inferiores aos outros métodos. Ao fixar as bactérias em um espaço/membrana, a conjugação fica restrita às células vizinhas e a motilidade celular fica reduzida quando comparada a meios líquidos, o que pode dificultar a frequência das trocas gênicas. Adicionalmente, em relação ao período de incubação, nossos resultados corroboram trabalhos anteriores que determinaram reduções de FC expressivas em experimentos com tempo de contato entre 16-24 horas em relação àqueles com tempo inferior a quatro horas (16, 33).

Além das diferenças entre momentos e meios utilizados, é importante estabelecer as interferências que a presença de suplementos pode provocar no processo de conjugação. Diante disso, o presente estudo é um dos primeiros a demonstrar a influência da presença de soro de leite e *chicken juice* – subprodutos rotineiramente encontrados em indústrias de beneficiamento de produtos de origem animal – na conjugação bacteriana.

No Brasil, essa questão é ainda mais relevante, considerando que a agropecuária está entre as atividades econômicas mais importantes do país, que ocupa a terceira posição mundial na produção de carnes e segundo maior exportador, além de expressiva produção de leite (34). Este protagonismo ressalta a necessidade de se produzir alimentos inócuos e entender melhor a influência de subprodutos comumente presentes nas indústrias beneficiadoras de carne e queijo na transmissão e consequente disseminação de genes de resistência.

Nesse contexto, SL e CJ se mostraram potencializadores da transferência do gene *bla*_{TEM} por conjugação em meio líquido. Ambos os subprodutos utilizados nesse estudo são ricos em nutrientes, como carboidratos, lipídeos e proteínas (18, 35), muito utilizados pelas bactérias para seu metabolismo (36), o que certamente propicia maior multiplicação, sobrevivência e condições para permitir que esses micro-organismos expressem seu potencial. No entanto, outras

1055 circunstâncias também podem influenciar na atuação das bactérias, como tempo de incubação,
1056 densidade celular, espécies utilizadas, proporção entre doadora e receptora, temperatura e
1057 alterações em pH (16).

1058 Pallares-Vega *et al.* (37) constataram que temperaturas a 25°C, ou menos, e meios pouco
1059 nutritivos podem diminuir o número de eventos conjugativos. Situação semelhante ocorre quando
1060 há aumento da densidade de doadoras em relação a receptoras (38). Já o fato de as bactérias
1061 doadoras e receptoras pertencerem à mesma espécie, quando em proporção 1:1, tanto em meio
1062 líquido quanto em filtro, pode provocar aumento na frequência de transferência de plasmídeos. O
1063 mesmo estudo também observou que, embora a frequência de transferência tenha sido similar tanto
1064 em três quanto em 16 horas, a tendência foi menor no período mais longo (33).

1065 Em relação à influência do pH no processo de conjugação, nosso estudo deixou claro que
1066 a redução para valores entre 5,2 e 6,5 na presença de SL intensificou a transferência do gene
1067 *bla_{TEM}*, enquanto a alcalinização provocou menor produção de transconjugantes. Em caldo
1068 contendo pH 5,0, na temperatura de 37°C, os micro-organismos obtêm resistência parcial ao ácido
1069 em cinco minutos e completa resistência em 10 minutos, o que não ocorre em pH superior a 6,5.
1070 Essa habituação requer a síntese de proteínas e, quando comparado a organismos cultivados em
1071 pH 7,0, aqueles crescidos em pH 5,0 possuem maiores quantidades de proteínas, em especial as
1072 proteínas citoplasmáticas, que podem estar envolvidas na proteção da célula contra danos ácidos
1073 ou no reparo do DNA (39). Por outro lado, pH próximo a 8,0 pode caracterizar uma condição de
1074 estresse alcalino, que em um estudo conduzido por Cortés *et al.* (40) representou um decréscimo
1075 de 36% nas taxas específicas de crescimento de *E. coli* quando comparadas àquelas em pH de 7,2.
1076 Adicionalmente, Van Wonterghem *et al.* (32) destacaram que a diminuição do pH (de 7,6–8,0 para
1077 ~7,4) pode impulsionar a conjugação. E ressaltam que a dependência do pH foi observada na

1078 transferência de alguns plasmídeos, sendo considerados ótimos para a conjugação, pHs em torno
1079 de 6,0-7,5.

1080 Ainda nesse sentido, o fato de a transferência do gene *bla*_{TEM} em meios líquidos contendo
1081 soro de leite ser pelo menos três vezes maior do que na sua ausência é ainda mais preocupante,
1082 uma vez que em fazendas leiteiras o uso de tratamentos antimicrobianos é constante, o que pode
1083 fazer com que micro-organismos presentes no leite apresentem altos níveis de resistência. SL está
1084 abundantemente presente em muitos laticínios e, ainda, é possível inferir que o leite cru ou
1085 pasteurizado possa exercer a mesma tendência de aumento nas taxas de conjugação.
1086 Adicionalmente, a utilização de leite cru para a fabricação de queijos é uma prática comum, e a
1087 falta de tratamento térmico permite que um maior número de bactérias, incluindo aquelas
1088 provenientes de animais leiteiros e ambiente de ordenha, permaneça viável, o que
1089 consequentemente amplifica a presença de genes de resistência e aumenta o risco de transferência
1090 horizontal de genes (41, 42).

1091 Paralelamente, o *CJ* também se mostrou um potencializador do processo de trocas gênicas
1092 por conjugação, assim como já havia intensificado outros processos de perpetuação bacteriana,
1093 como a formação de biofilmes. Melo *et al.* (18) constataram que a suplementação com *CJ* permitiu
1094 a manutenção de células viáveis e formação de biofilmes fortes, dando suporte à ideia de que este
1095 subproduto propicia a sobrevivência e permanência de micro-organismos na cadeia produtiva e
1096 pode desempenhar um importante papel na segurança alimentar.

1097 Adicionalmente, é necessário considerar que a influência desses subprodutos na
1098 transferência gênica pode ser considerado um problema de saúde única, uma vez que, caso não
1099 seja feito um tratamento adequado na indústria, a eliminação desses resíduos no ambiente
1100 amplifica ainda mais a disseminação da RAM em um contexto ambiental, já que animais, solo e

1101 organismos aquáticos também contribuem para a origem, manutenção e propagação desse
1102 fenômeno (43).

1103 Diante do exposto, é possível observar que a transferência horizontal de genes e a
1104 resistência antimicrobiana são problemas de saúde pública mundial que podem ser exacerbados
1105 em condições de beneficiamento de produtos de origem animal. A emergência da resistência aos
1106 antimicrobianos tem levado a dificuldades em ministrar terapias eficazes e a deficiência em
1107 medidas de prevenção por higienização industrial bem-sucedidas, o que requer o desenvolvimento
1108 de novas alternativas capazes, também, de prevenir a RAM (23). Desse modo, apresentamos uma
1109 opção de controle no processo de transferência do *bla*_{TEM} utilizando um complexo de cobre.

1110 De maneira geral, o potencial antimicrobiano do cobre pode ocorrer pela geração de
1111 espécies reativas de oxigênio (ROS), que comprometem proteínas e DNA, ou por dano oxidativo
1112 dos fosfolipídios da membrana bacteriana. Adicionalmente, estes metais podem interferir no
1113 funcionamento de enzimas por competição ou deslocamento de outros íons necessários no sítio
1114 ativo ou ligando-se covalentemente a grupos funcionais no sítio ativo, impedindo, assim, sua
1115 função e a manutenção da viabilidade bacteriana (44, 45).

1116 Além disso, a utilização de complexos de cobre pode reduzir ou promover eventos
1117 conjugativos. Constatamos que o uso de Lu54 foi capaz de reduzir no mínimo 4,8 vezes a
1118 transferência do gene *bla*_{TEM} por conjugação, tanto na presença quanto na ausência de
1119 suplementos. Nossos resultados são corroborados por Buberger et al. (46), que investigaram a
1120 influência do cobre sobre a transferência conjugativa de plasmídeo portador do gene *bla*_{CMY-2}
1121 isolado de *E. coli* produtora de betalactamase de espectro estendido (ESBL), proveniente de carne
1122 de frango de varejo, e verificaram que houve ao menos 40% de redução na transferência quando
1123 comparado ao controle. Justificaram a redução, pela presença do cobre, que é capaz de provocar

distúrbios na função da maquinaria conjugativa da doadora pela redução da expressão gênica de *traB* e *nikB*, dois genes importantes, responsáveis pela capacidade de mobilizar e transferir plasmídeos de uma cepa a outra. No entanto, tais resultados contrastam com um estudo que utilizou como doadora *E. coli* K-12 portadora do plasmídeo RP4, que carrega resistência à kanamicina, à ampicilina e à tetraciclina e como receptora *Pseudomonas putida* KT2440. A utilização de Cu²⁺ provocou maior produção de ROS, expressão de proteínas envolvidas no estresse oxidativo e aumento da permeabilidade da membrana da doadora e receptora, o que promoveu maior transferência gênica por conjugação (45). Tais divergências são provavelmente devido a diferentes concentrações e composições do metal, diferenças nas condições experimentais, espécies bacterianas e plasmídeos associados, assim como genes e proteínas envolvidos na conjugação.

A partir dos resultados, concluiu-se que a presença de soro de leite e *chicken juice*, que mimetizam condições industriais, é capaz de estimular a transferência do gene *bla*_{TEM} por conjugação, e a metodologia usando meio líquido, poucas horas de incubação e agitação é a mais eficaz para ocorrência deste evento. Além disso, o emprego do complexo [Cu(Clmp)(mftpy)](PF₆)₂ demonstrou ser uma alternativa promissora para o controle de trocas gênicas e mitigação da resistência antimicrobiana, especialmente em ambientes industriais de beneficiamento de produtos de origem animal.

MATERIAL E MÉTODOS

Chicken juice (CJ) e soro de leite (SL). A obtenção do *chicken juice* ocorreu como descrito por Brown *et al.* (47), com modificações. O exsudato de frango foi coletado a partir de frango comercial congelado e descongelado em temperatura ambiente. Posteriormente, o sumo do frango foi centrifugado por pelo menos três vezes a 14.000 rpm por 10 minutos, a 4°C, para eliminar as

1147 partículas grandes, e o sobrenadante foi esterilizado por filtração em membrana com poro de 0,22
1148 μm (Kasvi®, Paraná, Brasil). De modo semelhante, ocorreu a preparação e a esterilização do soro
1149 de leite coletado a partir de queijo Minas frescal. Ambos os suplementos foram estocados a -20°C .

1150
1151 **Complexo de cobre Lu 54.** O complexo de cobre $[\text{Cu}(\text{Clmp})(\text{mftpy})](\text{PF}_6)_2$ utilizado neste
1152 experimento, denominado Lu54, foi produzido pelo Instituto de Química da Universidade Federal
1153 de Uberlândia e possui os ligantes Clmp (4-cloro-N-(piridina-2-metileno)anilina) e mftpy (4-
1154 metilfenilinterpiridina), que foram sintetizados e caracterizados por análise elementar,
1155 espectrometria de massa de alta resolução, espectroscopia de infravermelho com transformada de
1156 Fourier, ultravioleta-visível e espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica. Nesse
1157 complexo, os íons $\text{Cu}(\text{II})$ adotam uma geometria piramidal quadrada, envolvendo os três átomos
1158 de nitrogênio do ligante mftpy e dois átomos de nitrogênio de Clmp. Em ambos os casos, dois
1159 ânions PF_6^- atuam como contra íons (48).

1160
1161 **Determinação da concentração alvo de Lu54.** A CIM do complexo de cobre Lu 54 foi determinada
1162 utilizando o método de microdiluição em caldo (49). Resumidamente, foram testadas inicialmente
1163 as concentrações de 500, 250, 125, 62,5 e 31,25 $\mu\text{g/mL}$. As suspensões bacterianas foram
1164 preparadas em uma concentração correspondente a 0,5 na escala de MacFarland, inoculadas em
1165 microplacas contendo caldo Muller Hinton (Kasvi®, Paraná, Brasil) com o complexo de cobre nas
1166 diferentes concentrações e, em seguida, foram incubadas a 37°C por 24 horas. Para o controle
1167 negativo, foi utilizado meio de cultura sem adição de bactérias; e para o controle positivo, foi
1168 utilizado meio de cultura com adição das bactérias *S. Heidelberg* e *E. coli* J53 sem adição do
1169 complexo.

Os poços contendo concentrações inferiores à CIM foram quantificados por método de contagem em placas objetivando verificar a maior concentração do Lu54 que não exerceu atividade bactericida frente às cepas de *Salmonella* e *E. coli*. Isso, devido à necessidade de selecionar a maior concentração que permitisse a sobrevivência das células e, assim, avaliar seu efeito na conjugação.

Todos os ensaios foram realizados em três réplicas e três repetições.

Conjugação bacteriana. Foram testados três protocolos de conjugação distintos e selecionado para os testes com o complexo de cobre Lu54 aquele que apresentou a maior frequência de conjugação.

Em todos os protocolos, foi utilizado como cepa doadora *Salmonella enterica* Heidelberg (SH), que apresenta *pili* sexual, e o gene *bla*_{TEM} plasmidial, que codifica resistência à classe de antimicrobianos β -lactâmicos, como a ampicilina. *S. Heidelberg* foi previamente isolada de cama de frango de corte em 2018, caracterizada por MELO *et al.* (50), e depositada no banco de cepas do Laboratório de Epidemiologia Molecular da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia. Como receptora, foi utilizada a cepa de *E. coli* J53AzR (J53), que possui resistência à azida sódica e não possui o gene *bla*_{TEM}, sendo sensível à ampicilina.

As cepas de SH e J53 foram reativadas em caldo de pré-enriquecimento infusão de cérebro e coração (BHI, Sigma-Aldrich®, Missouri, EUA) a 37°C por pelo menos seis horas e, em seguida, repicadas individualmente em ágar Tripitic Soy Agar (TSA - Biokar®, Allone, França), com incubação a 37°C por pelo menos 18 horas (51).

Os protocolos de conjugação testados seguiram metodologias propostas por Rodriguez & Fernandez (52), com adaptações. Resumidamente, aproximadamente cinco colônias de cada cepa (doadora e receptora) foram selecionadas e inoculadas separadamente em tubos Falcon estéreis, contendo 3 mL de caldo Luria Bertani (LB-Neogen®, Michigan, EUA) e incubadas a 37°C, em

1194 agitador orbital com rotação de 60 rpm, por aproximadamente três horas. Após a incubação, foi
1195 aferida a absorbância (D.O._{600nm}), em leitora de microplaca (Perlong DNM-9602, Nanjing, China),
1196 para constatar se atingiu a fase exponencial (D.O._{600nm} = 0,4 a 0,5).

1197 Os cultivos das cepas doadora e receptora foram submetidos individualmente à diluição
1198 decimal seriada (10^{-1} a 10^{-8}) em superfície em ágar MacConkey (MC, Biokar®, Allone, França),
1199 enriquecido com 90 µg/mL de ampicilina para o crescimento de SH e 160 µg/mL de azida sódica
1200 para J53, a fim de expressarem fenotipicamente sua resistência. As placas foram incubadas a 37°C,
1201 por 24 horas, quando foi realizada a contagem do número de colônias.

1202 Para o protocolo de conjugação 1, foi realizada a junção, ou seja, a cocultura (proporção
1203 1:4) de SH e J53 em um volume final de 1mL. Paralelamente, o mesmo processo foi realizado,
1204 porém acrescentando 5% do SL ou de CJ (50 µL) em 190 µL da cepa doadora e 760 µL da receptora
1205 previamente cultivadas em LB. Finalmente, os tubos contendo as coculturas, com e sem adição de
1206 SL e CJ, foram submetidos à incubação a 37°C em agitação lenta (20 rpm) por três horas.

1207 O protocolo de conjugação 2 utilizou meio sólido. Resumidamente, membranas em éster
1208 de celulose de 0,22 micrômetros foram dispostas sobre ágar LB distribuído em placas de cultivo
1209 celular de seis poços. Em seguida, 200 µL da cocultura previamente obtida na conjugação 1, com
1210 e sem a adição de 5% SL ou CJ foram adicionados sobre a membrana. As placas foram incubadas
1211 a 37°C *overnight*.

1212 Já para o protocolo de conjugação 3, inicialmente foi realizado procedimento idêntico ao
1213 protocolo de conjugação 1 e após as três horas de conjugação, um volume de 400 µL foi transferido
1214 para 1600 µL de caldo LB em frasco estéril com propósito de renovar o meio de cultura, seguido
1215 de incubação a 37°C *overnight* sem agitação. Esse mesmo procedimento foi realizado com meio
1216 LB suplementado com 5% de SL ou CJ mantendo a proporção 1:4.

1217 Todos os ensaios foram realizados em triplicata e em três repetições.

1218

1219 **Identificação das transconjugantes.** A frequência de transferência da resistência aos β -
1220 lactâmicos foi investigada pela determinação da aquisição do gene *bla*_{TEM} por método fenotípico
1221 e molecular.

1222 Para a confirmação fenotípica, após os ensaios de conjugações, os cultivos foram
1223 submetidos à diluição decimal seriada (10^{-1} a 10^{-8}), semeados na superfície de ágar MacConkey
1224 transconjugante (MCT) e incubados a 37°C por 48 horas. O MCT consiste na suplementação do
1225 ágar MacConkey (Kasvi®, Paraná, Brasil) com 90 µg/mL de ampicilina e 160 µg/mL de azida
1226 sódica.

1227 No caso da conjugação 2, que utilizou meio sólido, a identificação fenotípica ocorreu após
1228 submersão da membrana em 20 mL de solução salina para a ressuspensão da massa celular, além
1229 da diluição seriada e semeadura em placas de MCT, seguido dos procedimentos já descritos
1230 anteriormente.

1231 A seleção das transconjugantes foi determinada pelo crescimento de colônias nas placas de
1232 MCT, já que somente as linhagens de *E. coli* J53 AzR que adquiriram o gene de resistência *bla*_{TEM}
1233 apresentam resistência aos dois antimicrobianos, além de haver inibição do crescimento de *S.*
1234 Heidelberg devido à presença de azida sódica.

1235 Adicionalmente à identificação fenotípica, foi realizada a confirmação, por reação em
1236 cadeia da polimerase (PCR) convencional, da aquisição do gene *bla*_{TEM} plasmidial pelas
1237 transconjugantes. Cinco colônias transconjugantes de cada um dos testes foram selecionadas para
1238 a PCR. Para isso, as colônias foram individualmente repicadas em caldo BHI, seguida da
1239 incubação a 37°C *overnight*. O DNA foi extraído utilizando-se o kit Wizard Genomic DNA

1240 Purification (Promega, Wisconsin, EUA), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. A
 1241 reação de PCR foi preparada em um volume final de 25 µL, utilizando o kit Master Mix Promega,
 1242 nas condições de amplificação e *primers* descritos na TABELA 2. Os produtos amplificados foram
 1243 submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, utilizando o tampão TBE 0,5x (Invitrogen,
 1244 Massachusetts, EUA) e, como padrão de peso molecular, o marcador de 100 bp (Invitrogen,
 1245 Massachusetts, EUA).

1246

1247 **TABELA 2** *Primers* e condições utilizados para identificar a presença do gene *bla_{TEM}*.

Gene	Sequência 5'→ 3'	Peso Molecular	Condições PCR	DNA	Referência
<i>bla_{TEM}</i>	CAGCGGTAAGATCCTTGAGA	643 pb	95°C – 5 min; 50°C – 45	10	(53)
	ACTCCCCGTCGTGTAGATAA		seg; 72°C 90seg; 72°C 10min	ng	

1248

1249 **Complexo Lu54 na frequência de conjugação.** Após a realização dos três diferentes protocolos
 1250 de conjugação foi selecionado o que apresentou as maiores frequências de conjugação para o
 1251 tratamento com 100 µL do complexo Lu54. A concentração utilizada foi a pré-estabelecida, inferior
 1252 à CIM, em que não obtivemos diferença estatística com os controles, de modo a não exercer
 1253 atividade bactericida.

1254

1255 **Frequência de conjugação.** A eficiência da conjugação foi mensurada pelo cálculo da frequência
 1256 de conjugação pela receptora (FCR), que é razão do número de colônias transconjugantes no fim
 1257 do processo de conjugação em relação ao número de receptores no início do processo,
 1258 contabilizadas pelo valor médio de repetições de cada tratamento. Foram selecionadas placas

referentes às diluições com crescimento entre 25 e 250 colônias (54). Os cálculos foram realizados separadamente para as conjugações com e sem adição de SL e *CJ* e também para aquelas com o tratamento com o complexo de cobre Lu54.

$$FCR: \frac{\text{Média do número de colônias de transconjugantes}}{\text{Média do número de colônias de receptoras}}$$

Avaliação de pH. A avaliação do pH foi realizada utilizando pHmetro MS mPA210 (Tecnopon, São Paulo, Brasil) previamente calibrado e ocorreu nos meios de conjugação líquidos (protocolos 1 e 3), sendo a primeira mensuração (0 hora) realizada imediatamente após a junção de doadora e receptora; a segunda (3 horas), após o fim da conjugação 1; e a terceira no dia seguinte (*overnight*), após o fim da conjugação 3. Todos os procedimentos foram realizados com e sem adição de SL e *CJ*.

Os testes foram realizados em triplicata e duas repetições.

Análise estatística dos resultados. Os dados foram tabulados, transformados em *log* e submetidos à análise de normalidade. A análise de variância, ANOVA, foi utilizada para comparar os ensaios das repetições e possíveis diferenças nos valores obtidos. Para comparação de duas variáveis foi utilizado o teste de T. Todas as análises foram realizadas com o programa *GraphPad Prism* 8.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. Agradecemos também ao CNPq – Código de Financiamento 405296/2021-5, pelo apoio financeiro para a execução deste estudo.

REFERÊNCIAS

1. Elhariri M, Elhelw R, Selim S, Ibrahim M, Hamza D, and Hamza E. 2020. Virulence and antibiotic resistance patterns of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Salmonella enterica* serovar Heidelberg isolated from broiler chickens and poultry workers: a potential hazard. *Foodborne Pathogens and Disease*, 17(6):373-381. DOI: 10.1089/fpd.2019.2719.
2. CDC – Center for Disease Control and Prevention. Atlanta, Estados Unidos, 2022. Portal. Disponível em: <https://www.cdc.gov/ecoli/index.html>. Acesso em: 22 nov. 2022.
3. EFSA – European Food Safety Authority. *Salmonella*. 2020. Disponível em: <https://www.efsa.europa.eu/es/topics/topic/salmonella>. Acesso em: 18 out. 2022.
4. Abu Daher G, Aoun B, Jaafar F, Khafaja S, and Sanjad S. Jul. 2019. Norovirus: a novel etiologic agent in hemolytic uremic syndrome in an infant. *BMC Nephrol*, London, 20(247):1-4. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12882-019-1427-6>.
5. Reygaert WC. 2018. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS microbiology*, 4 (3):482. DOI: 10.3934/microbiol.2018.3.482.
6. Murray CJL and Antimicrobial Resistance Collaborators. 2022. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399:629-655. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)02724-0.

- 1305 7. MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2022. Resistência aos
1306 antimicrobianos. Disponível em: [https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-](https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/resistencia-aos-antimicrobianos/antimicrobianos)
1307 [agropecuarios/insumos-pecuarios/resistencia-aos-antimicrobianos/antimicrobianos](https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/resistencia-aos-antimicrobianos/antimicrobianos). Acesso
1308 em: 1.º dez. 2022.
- 1309
- 1310 8. CDC – Centers for Disease Control and Prevention. 2019. Antibiotic Resistance Threats in the
1311 United States. *U.S. Department of Health and Human Services*, CDC, Atlanta, GA, USA.
- 1312
- 1313 9. NCBI – National Center for Biotechnology Information. 2022. *PubChem* Compound Summary
1314 for CID 6249, Ampicillin. Disponível em:
1315 <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ampicillin>. Acesso em: 28 dez. 2022.
- 1316
- 1317 10. Srichumporn W, Chaisowwong W, Intanon M, and Na-Lampang K. 2022. Extended-spectrum
1318 beta-lactamase-producing *Escherichia coli* from pork in Muang district, Chiang Mai Province,
1319 Thailand, *Veterinary World*, 15(12):2.903–2.909. DOI:
1320 www.doi.org/10.14202/vetworld.2022.2903-2909.
- 1321
- 1322 11. Delmani FA, Jaran AS, Tarazi YA, Masaadeh H, and Zaki O. 2021. Characterization of
1323 ampicillin resistant gene (blaTEM-1) isolated from *E. coli* in Northern Jordan. *Asian J Biomed*
1324 *Pharm Sci*, 7:11-5.
- 1325

12. Neil K, Allard N, and Rodrigue S. 2021. Molecular mechanisms influencing bacterial conjugation in the intestinal Microbiota. *Frontiers in microbiology*, 12:673260. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.673260>.
13. Von Wintersdorff CJH, Penders J, Julius JMN, Mills ND, Majumder S, Alphen LBA, Savelkoul PHM, and Wolffs PFG. 2016. Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. *Frontiers in microbiology*, 7: 173. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00173.
14. Huddleston JR. 2014. Horizontal gene transfer in the human gastrointestinal tract: potential spread of antibiotic resistance genes. *Infection and drug resistance*, 7:167. DOI: 10.2147/IDR.S48820.
15. Sultan I, Rahman S, Jan AT, Siddiqui MT, Mondal AH, and Haq QMR. 2018. Antibiotics, resistome and resistance mechanisms: a bacterial perspective. *Frontiers in microbiology*, 9:2.066. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02066.
16. Alderliesten JB, Duxbury SJN, Zwart MP, Visser JAGM, Stegeman A, and Fischer EAJ. 2020. Effect of donor-recipient relatedness on the plasmid conjugation frequency: a meta-analysis. *BMC microbiology*, 20 (1):1-10. DOI: 10.1186/s12866-020-01825-4.

17. Shintani M, Ohkuma M, and Kimbara K. 2019. High-resolution comparison of bacterial conjugation frequencies. *JoVE – Journal of Visualized Experiments*, 143: e57812. DOI: 10.3791/57812.
18. Melo RT, Mendonça EP, Monteiro GP, Siqueira MC, Pereira CB, Peres PABM, Fernandez H, and Rossi DA. 2017. Intrinsic and extrinsic aspects on *Campylobacter jejuni* biofilms. *Frontiers in Microbiology*, 8:1.332. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01332.
19. Krasnovskaya O, Naumov A, Guk D, Gorelkin P, Erofeev A, Beloglazkina E, and Majouga A. 2020. Copper coordination compounds as biologically active agents. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(11):3.965. DOI: 10.3390/ijms21113965.
20. Zalevskaya OA, and Gur'eva YA. 2021. Recent Studies on the Antimicrobial Activity of Copper Complexes. *Russian Journal of Coordination Chemistry*, 47(12):861-880. DOI: 10.1134/s1070328421120046.
21. Stern BR. 2010. Essentiality and toxicity in copper health risk assessment: overview, update and regulatory considerations. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 74:114-127. DOI: 10.1080/15287390903337100.
22. Monteiro GP, Melo RT, Guidotti-Takeuchi M, Dumont CF, Ribeiro RAC, Guerra W, Ramos LMS, Paixão DA, Santos FAL, Rodrigues DP, Boleij P, Hoepers PG, and Rossi DA. 2022. A Ternary Copper (II) Complex with 4-Fluorophenoxyacetic Acid Hydrazide in Combination

with Antibiotics Exhibits Positive Synergistic Effect against Salmonella Typhimurium.
Antibiotics, 11(3):388. DOI: 10.3390/antibiotics11030388.

23. Frieri M, Kumar K, and Boutin A. 2017. *Antibiotic resistance*. 10(4):369-378. DOI:
10.1016/j.jiph.2016.08.007.

24. Ilangovan A, Connery S, and Waksman G. 2015. Structural biology of the Gram-negative
bacterial conjugation systems. *Trends Microbiol*, 23(5):301-310. DOI:
10.1016/j.tim.2015.02.012.

25. Lee CCA, and Grossman AAD. 2007. Identification of the origin of transfer (oriT) and DNA
relaxase required for conjugation of the integrative and conjugative element ICE Bs1 of
Bacillus subtilis. *Journal of bacteriology*, 189 (20):7.254-7.261. DOI: 10.1128/JB.00932-07.

26. Tecon R, Ebrahimi A, Kleyer H, and Or D. 2018. Cell-to-cell bacterial interactions promoted
by drier conditions on soil surfaces. *Proceedings of the National Academy of Sciences*,
115(39):9.791-9.796. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1808274115>.

27. Arias-Andres M, Klümper U, Rojas-Jimenez K, and Grossart HP. 2018. Microplastic
pollution increases gene exchange in aquatic ecosystems. *Environmental pollution*, 237:253-
261. DOI: 10.1016/j.envpol.2018.02.058.

28. Águila-Arcos S, Álvarez-Rodríguez I, Garaiyurrebaso O, Garbisu C, Grohmann E, and Alkorta I. 2017. Biofilm-forming clinical *Staphylococcus* isolates harbor horizontal transfer and antibiotic resistance genes. *Frontiers in microbiology*, 8:2018. DOI: 10.3389/fmicb.2017.02018.
29. Headd B, and Bradford SA. 2018. Physicochemical factors that favor conjugation of an antibiotic resistant plasmid in non-growing bacterial cultures in the absence and presence of antibiotics. *Frontiers in Microbiology*, 9:2.122. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02122.
30. Saliu EM, Eitinger M, Zentek J, and Vahjen W. 2019. Nutrition related stress factors reduce the transfer of extended-spectrum beta-lactamase resistance genes between an *Escherichia coli* donor and a *Salmonella* Typhimurium recipient in vitro. *Biomolecules*, 9(8):324. DOI: 10.3390/biom9080324.
31. Kohyama Y, and Suzuki S. 2019. Conjugative gene transfer between nourished and starved cells of *Photobacterium damsela* ssp. *damsela* and *Escherichia coli*. *Microbes and environments*, p. ME19099. DOI: 10.1264/jsme2.ME19099.
32. Van Wonterghem L, Chiara M, Liti G, Warringer J, Farewell A, Verstraeten N, and Michiels J. 2022. Genome-Wide Association Study Reveals Host Factors Affecting Conjugation in *Escherichia coli*. *Microorganisms*, 10(3):608. DOI: 10.3390/microorganisms10030608.

- 1414 33. Sakuda A, Suzuki-Minakuchi C, Okada K, and Nojiri H. 2018. Conjugative selectivity of
1415 plasmids is affected by coexisting recipient candidates. *Msphere*, 3(6):e00490-18. DOI:
1416 10.1128/mSphere.00490-18.
- 1417
- 1418 34. Aragão A, and Contini E. 2021. O agro no Brasil e no Mundo: uma síntese do período de 2000
1419 a 2020. *Embrapa Sire*. Disponível em:
1420 <https://www.embrapa.br/documents/10180/62618376/O+AGRO+NO+BRASIL+E+NO+MU>
1421 [NDO.pdf/41e20155-5cd9-f4ad-7119-945e147396cb](https://www.embrapa.br/documents/10180/62618376/O+AGRO+NO+BRASIL+E+NO+MUNDO.pdf/41e20155-5cd9-f4ad-7119-945e147396cb). Acesso em: 15 nov. 2022.
- 1422
- 1423 35. Prazeres AAR, Carvalho FF, and Rivas J. 2012. Cheese whey management: A review. *Journal*
1424 *of environmental management*, 110:48-68. DOI:
1425 <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.05.018>.
- 1426
- 1427 36. Kim B, and Gadd G. 2008. Bacterial Physiology and Metabolism. *Cambridge University Press*,
1428 Cambridge. DOI: 10.1017/CBO9780511790461.
- 1429
- 1430 37. Pallares-Vega R, Macedo G, Brouwer MSM, Leal LH, Van der Maas P, Loosdrecht MCM,
1431 Weissbrodt DG, Heederik D, Mevius D, and Schmitt H. 2021. Temperature and nutrient
1432 limitations decrease transfer of conjugative IncP-1 plasmid pKJK5 to wild Escherichia coli
1433 strains. *Frontiers in microbiology*, 12:656250. DOI: 10.3389/fmicb.2021.656250.
- 1434
- 1435 38. Chatterjee A, Cook LCC, Shu CC, Chen Y, Manias DA, Ramkrishna D, Dunne GM, and Hu
1436 WS. 2013. Antagonistic self-sensing and mate-sensing signaling controls antibiotic-resistance

1437 transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(17):7.086-7.090. DOI:
1438 10.1073/pnas.1212256110.

1439

1440 39. Raja N, Goodson M, Chui WC, Smith DG, and Rowbury RJ. 1991. Habituation to acid in
1441 *Escherichia coli*: conditions for habituation and its effects on plasmid transfer. *Journal of*
1442 *Applied Bacteriology*, 70(1):59-65. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1991.tb03787.x.

1443

1444 40. Cortés JT, Flores N, Bolívar F, Lara AR, and Ramírez OT. 2016. Physiological effects of pH
1445 gradients on *Escherichia coli* during plasmid DNA production. *Biotechnology and*
1446 *bioengineering*, 113(3):598-611. DOI: 10.1002/bit.25817.

1447

1448 41. Tóth AG, Csabai I, Krikó E, Tőzsér D, Maróti G, Patai ÁV, Makrai L, Szita G, and
1449 Solymosi N. 2020. Antimicrobial resistance genes in raw milk for human consumption.
1450 *Scientific reports*, 10(1):1-7. DOI: 10.1038/s41598-020-63675-4.

1451

1452 42. Marques KHSR, Carvalho JB, Mesquita AA, Gonçalves JA, Ferreira SV, Sousa TL, Egea MB,
1453 and Silva MAP. 2020. Influência do tratamento térmico no rendimento e composição físico-
1454 química de queijos frescais. *Brazilian Journal of Development*, 6(4):19.446-19.460. DOI:
1455 10.34117/bjdv6n4-203.

1456

1457 43. Berendonk TU, Manaia CM, Merlin C, Fatta-Kassinos D, Cytryn E, Walsh F, Bürgmann H,
1458 Sørum H, Norström M, Pons MN, Kreuzinger N, Huovinen P, Stefani S, Schwartz T, Kisand

V, Baquero F, Martinez JL. 2015. Tackling antibiotic resistance: The environmental framework. *Nature Reviews Microbiology*, 13:310–317. DOI: 10.1038/nrmicro3439

44. Palm M, Fransson A, Hultén J, Stenman KB, Allouche A, Chiang OE, Constandse ML, Dijk KJ, Icli S, Klimesova B, Korhonen E, Martínez-Crespo G, Meggers D, Naydenova M, Polychronopoulou MA, Schuntermann DB, Unal H, Wasylkowska A, and Farewell A. 2022. The Effect of Heavy Metals on Conjugation Efficiency of an F-Plasmid in *Escherichia coli*. *Antibiotics*, 11(8):1.123. DOI: 10.3390/antibiotics11081123.

45. Zhang S, Wang Y, Song H, Lu J, Yuan Z, and Guo J. 2019. Copper nanoparticles and copper ions promote horizontal transfer of plasmid-mediated multi-antibiotic resistance genes across bacterial genera. *Environment International*, 129:478-487. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.05.054>.

46. Buberger ML, Witsø IL, L'Abée-Lund TM, Wasteson Y. 2020. Zinc and Copper Reduce Conjugative Transfer of Resistance Plasmids from Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli*. *Microbial Drug Resistance*, 26:842–849. DOI: 10.1089/mdr.2019.0388

47. Brown HL, Reuter M, Salt LJ, Cross KL, Betts RP, and Vliet AHM. 2014. Chicken juice enhances surface attachment and biofilm formation of *Campylobacter jejuni*. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(22):7.053-7.060. DOI: 10.1128/AEM.02614-14.

48. Takeuchi MG, Rossi DA, Ramos LMS, Guerra W, Peixoto J, Chueiri M, Dumont CF, Rayane G, Melo RT, Portes MC, Bogado AL, Pereira GM, Corbid PP, and Ferreira AMC. Synthesis, design and in vitro activity of new copper compounds against *Campylobacter* spp. *Unpublished data*.
49. EUCAST – European Society of Clinical Microbiology and Infectious Disease. *EUCAST reading guide for broth microdilution*. 2022. Disponível em: https://prezi.com/cmqiqurvg2t/referencias-treinamento-virtual-normalizacao/?utm_campaign=share&utm_medium=copy. Acesso em: 26 out. 2022.
50. Melo RT, Galvão NN, Guidotti-Takeuchi M, Peres PABM, Fonseca BB, Profeta R, Azevedo VAC, Monteiro GP, Brenig B, and Rossi DA. 2021. Molecular characterization and survive abilities of *Salmonella* Heidelberg strains of poultry origin in Brazil. *Frontiers in microbiology*, p. 1.461. DOI: 10.3389/fmicb.2021.674147.
51. Mo SS, Sunde M, Ilag HK, Langsrud S, and Heir E. 2017. Transfer Potential of Plasmids Conferring Extended-Spectrum-Cephalosporin Resistance in *Escherichia coli* from Poultry. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(12):e00654-17. DOI: 10.1128/AEM.00654-17.
52. Rodriguez-Grande J, and Fernandez-Lopez R. 2020. Measuring Plasmid Conjugation Using Antibiotic Selection, New York. In: De la Cruz F. (Ed.) Horizontal Gene Transfer. *Methods in Molecular Biology*, v. 2.075. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9877-7_6.

53. Ahmed AM, Motoi Y, Sato M, Maruyama A, Watanabe H, Fukumoto Y, and Shimamoto T.
2007. Zoo animals as reservoirs of gram-negative bacteria harboring integrons and
antimicrobial resistance genes. *Appl Environ Microbiol*, 73(20):6.686–6.690. DOI:
10.1128/AEM.01054-07.

54. Silva N, Junqueira VCA, Arruda Silveira NF, Taniwaki MH, Gomes RAR, and Okazaki MM.
2017. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água. Editora Blucher.

ANEXO I

Normas do periódico Microbiology Spectrum – Capítulo 2

Research Articles

Research Articles are limited to 5,000 words and should advance our understanding of any area of microbial research or allied fields. These articles should include the elements described in this section. **Title, running title, byline, affiliation line(s), and corresponding author.** Each manuscript should present the results of an independent, cohesive study; thus, numbered series titles are not allowed. Avoid the main title/subtitle arrangement, complete sentences, and unnecessary articles. Indicate the specific organisms under study in the title or abstract as appropriate. On the title page, include the title, the running title (not to exceed 54 characters and spaces), the name of each author, all authors' affiliations at the time the work was performed, the name(s) and e-mail address(es) of the corresponding author(s), and a footnote indicating the present address of any author no longer at the institution where the work was performed. Place a number sign (#) in the byline after the affiliation letter(s) of the author to whom inquiries regarding the paper should be addressed (see "Correspondent footnote").

Indicate each author's affiliation with a superscript lowercase letter placed after the author's surname in the byline (separate multiple affiliation letters with commas but no space). Each affiliation should have its own line and its own superscript affiliation letter preceding it. Do not consolidate different departments at one institution into one address with a single affiliation letter, even if all affected authors belong to all of those departments. If more than one co-first author is designated, authors are required to state how the order of names was decided as an additional footnote on the title page. Please review this sample title page for guidance. Also include on the title page the word count for the abstract and the word count for the text (excluding the references, table footnotes, and figure legends).

Correspondent footnote. A single e-mail address for the corresponding author should be included on the title page of the manuscript. This information will be published with the article to facilitate communication, and the e-mail address will be used to notify the corresponding author of the availability of proofs and, later, of the PDF file of the published article.

Two-part abstract. Research Articles have structured abstracts consisting of two sections with their own headings: "Abstract" and "Importance." Because the structured abstract will be published separately by abstracting services, it must be complete and understandable without reference to the text. Please refer to a sample structured abstract for guidance. For a discussion of how to evaluate the importance of a piece of research, see the essay by A. Casadevall and F. C. Fang (Important Science—It's All About the SPIN, Infect Immun 77:4177–4180, 2009). The Abstract section should be no more than 250 words and should concisely summarize the basic content of the paper without presenting extensive experimental details. The Importance section should be no more than 150 words and should provide a nontechnical explanation of the significance of the study to the field. Avoid abbreviations and references, and indicate the specific organism under study. When it is essential to include a reference, use the format shown under "References" below (see the "Citations in abstracts" section).

Introduction. The introduction should supply sufficient background information to allow the reader to understand and evaluate the results of the present study without referring to previous publications on the topic. The introduction should also provide the hypothesis that was addressed or the rationale for the present study. Choose references carefully to provide the most salient background rather than an exhaustive review of the topic.

Results. In the Results section, include the rationale or design of the experiments as well as the results; reserve extensive interpretation of the results for the Discussion section. Present the results as concisely as possible in one or more of the following: text, table(s), or figure(s). Data in tables (e.g., cpm of radioactivity) should not contain more significant figures than the precision of the measurement allows. Illustrations (particularly photomicrographs and electron micrographs) should be limited to those that are absolutely necessary to show the experimental findings. Number figures and tables in the order in which they are cited in the text, and be sure to cite all figures and tables.

Discussion. The Discussion section should provide an interpretation of the results in relation to previously published work and to the experimental system at hand and should not contain extensive repetition of the Results section or reiteration of the introduction. In short papers, the Results and Discussion sections may be combined.

Materials and Methods. The Materials and Methods section should include sufficient technical information to allow the experiments to be repeated. When centrifugation conditions are critical, give enough information to enable another investigator to repeat the procedure: make of centrifuge, model of rotor, temperature, time at maximum speed, and centrifugal force ($\times g$ rather than revolutions per minute). For commonly used materials and methods (e.g., media and protein concentration determinations), a simple reference is sufficient. If several alternative methods are commonly used, it is helpful to identify the method briefly as well as to cite the reference. For example, it is preferable to state “cells were broken by ultrasonic treatment as previously described (9)” rather than to state “cells were broken as previously described (9).” This allows the reader to assess the method without constant reference to previous publications. Describe new methods completely and give sources of unusual chemicals, equipment, or microbial strains. When large numbers of microbial strains or mutants are used in a study, include tables identifying the immediate sources (i.e., sources from whom the strains were obtained) and properties of the strains, mutants, bacteriophages, and plasmids, etc.

A method or strain, etc., used in only one of several experiments reported in the paper may be described in the Results section or very briefly (one or two sentences) in a table footnote or figure legend. It is expected that the sources from whom the strains were obtained will be identified. As noted on ASM Journals' Data Policy page, a paragraph dedicated to new accession numbers for nucleotide and amino acid sequences, microarray data, protein structures, gene expression data, and MycoBank data should appear at the end of Materials and Methods with the paragraph lead-in "Data availability." Please also provide references (with URLs) for the accession numbers.

Acknowledgments. Statements regarding sources of direct financial support (e.g., grants, fellowships, and scholarships, etc.) should appear in the Acknowledgments. A funding statement

indicating what role, if any, the funding agency had in your study (for example, “The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.”) may be included. Funding agencies may have specific wording requirements, and compliance with such requirements is the responsibility of the author. In cases in which research is not funded by any specific project grant, funders need not be listed, and the following statement may be used: “This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sectors.” Statements regarding indirect financial support (e.g., commercial affiliations, consultancies, stock or equity interests, and patent-licensing arrangements) are also allowed. It is the responsibility of authors to provide a general statement disclosing financial or other relationships that are relevant to the study. Recognition of personal assistance should be given as a separate paragraph, as should any statements disclaiming endorsement or approval of the views reflected in the paper or of a product mentioned therein.

In addition to acknowledging sources of financial support in the manuscript, authors should list any sources of funding in response to the Funding Sources question on the online submission form, providing relevant grant numbers where possible, and the authors associated with the specific funding sources. In the event that your submission is accepted, the funding source information provided in the submission form may be published, so please ensure that all information is entered accurately and completely. (It will be assumed that the absence of any information in the Funding Sources fields is a statement by the authors that no support was received.) Authors may include a statement that specifies contributor roles as a separate paragraph in the Acknowledgments section. ASM encourages transparency in authorship by publishing author contribution statements using the CRediT taxonomy as recommended by NISO. For some manuscript types, authors have the option of assigning CRediT roles during the online submission process.

References. In the reference list, references are numbered in the order in which they are cited in the article (citation-sequence reference system). In the text, references are cited parenthetically by number in sequential order. Data that are not published or not peer reviewed are simply cited parenthetically in the text (see section ii below).

(i) References listed in the References section. The following types of references must be listed in the References section:

- Journal articles (both print and online)
- Books (both print and online)
- Book chapters (publication title is required)
- Patents and patent applications
- Theses and dissertations
- Published conference proceedings
- Meeting abstracts, posters, and presentations
- Letters (to the editor)
- Company publications
- In-press journal articles, books, and book chapters
- Data sets
- Code

Provide the names of all the authors and/or editors for each reference; long bylines should not be abbreviated with “et al.” All listed references must be cited in the text. Abbreviate journal names according to the PubMed Journals Database (National Library of Medicine, National Institutes of Health), the primary source for ASM style. Do not use periods with abbreviated words. The EndNote output style for ASM Journals’ current reference style can be found at https://endnote.com/style_download/american-society-for-microbiology-asm-journals-2/; save it to your EndNote Styles folder (it should replace any earlier output styles for ASM journals [all ASM journals use the same reference style]). Note that DOIs are not needed for most references. ASM copy editors will automatically insert DOIs on all references in the CrossRef and PubMed databases during copyediting. URLs for government reports and other references not indexed in these databases should be provided if desired; URLs for citations of database accession numbers and code/software should be provided by you.

Follow the styles shown in the examples below.

1. Caserta E, Haemig HAH, Manias DA, Tomsic J, Grundy FJ, Henkin TM, Dunny GM. 2012. *In vivo* and *in vitro* analyses of regulation of the pheromone-responsive *prgQ* promoter by the PrgX pheromone receptor protein. *J Bacteriol* 194:3386–3394.
2. Bina XR, Taylor DL, Vikram A, Ante VM, Bina JE. 2013. *Vibrio cholerae* ToxR downregulates virulence factor production in response to cyclo(Phe-Pro). *mBio* 4:e00366-13.
3. Winnick S, Lucas DO, Hartman AL, Toll D. 2005. How do you improve compliance? *Pediatrics* 115:e718–e724.
4. Falagas ME, Kasiakou SK. 2006. Use of international units when dosing colistin will help decrease confusion related to various formulations of the drug around the world. *Antimicrob Agents Chemother* 50:2274–2275. (Letter.) {“Letter” or “Letter to the editor” is allowed but not required at the end of such an entry.}
5. Cox CS, Brown BR, Smith JC. *J Gen Genet*, in press.* {Article title is optional; journal title is mandatory.}
6. Forman MS, Valsamakis A. 2011. Specimen collection, transport, and processing: virology, p 1276–1288. *In* Versalovic J, Carroll KC, Jorgensen JH, Funke G, Landry ML, Warnock DW (ed), *Manual of clinical microbiology*, 10th ed, vol 2. ASM Press, Washington, DC.
7. da Costa MS, Nobre MF, Rainey FA. 2001. Genus I. *Thermus* Brock and Freeze 1969, 295, ^{AL} emend. Nobre, Trüper and da Costa 1996b, 605, p 404–414. *In* Boone DR, Castenholz RW, Garrity GM (ed), *Bergey’s manual of systematic bacteriology*, 2nd ed, vol 1. Springer, New York, NY.
8. Fitzgerald G, Shaw D. *In* Waters AE (ed), *Clinical microbiology*, in press. EFH Publishing Co, Boston, MA.* {Chapter title is optional.}
9. Green PN, Hood D, Dow CS. 1984. Taxonomic status of some methylotrophic bacteria, p 251–254. *In* Crawford RL, Hanson RS (ed), *Microbial growth on C₁ compounds*. Proceedings of the 4th International Symposium. American Society for Microbiology, Washington, DC.
10. Rotimi VO, Salako NO, Mohaddas EM, Philip LP. 2005. Abstr 45th Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother, abstr D-1658. {Abstract title is optional.}

11. Smith D, Johnson C, Maier M, Maurer JJ. 2005. Distribution of fimbrial, phage and plasmid associated virulence genes among poultry *Salmonella enterica* serovars, abstr P-038, p 445. Abstr 105th Gen Meet Am Soc Microbiol. American Society for Microbiology, Washington, DC. *{Abstract title is optional.}*
12. García CO, Paira S, Burgos R, Molina J, Molina JF, Calvo C, Vega L, Jara LJ, García-Kutzbach A, Cuellar ML, Espinoza LR. 1996. Detection of *Salmonella* DNA in synovial membrane and synovial fluid from Latin American patients using the polymerase chain reaction. Arthritis Rheum 39(Suppl 9):S185. *{Meeting abstract published in journal supplement.}*
13. O'Malley DR. 1998. PhD thesis. University of California, Los Angeles, CA. *{Title is optional.}*
14. Stratagene. 2006. Yeast DNA isolation system: instruction manual. Stratagene, La Jolla, CA. *{Use the company name as the author if none is provided for a company publication.}*
15. Odell JC. April 1970. Process for batch culturing. US patent 484,363,770. *{Include the name of the patented item/process if possible; the patent number is mandatory.}*
16. Harrison F, Roberts AEL, Gabriliska R, Rumbaugh KP, Lee C, Diggle SP. 2015. A 1,000-year-old antimicrobial remedy with antistaphylococcal activity. mBio 6:e01129-15. *{Original article that describes how data submitted to a database were generated.}*
17. Harrison F, Roberts AEL, Gabriliska R, Rumbaugh KP, Lee C, Diggle SP. 2015. Data from "A 1,000-year-old antimicrobial remedy with antistaphylococcal activity." Dryad Digital Repository <https://doi.org/10.5061/dryad.mn17p>. *{Citation for the database where the data in the previous reference were deposited; the URL is necessary.}*
18. Wang Y, Rozen D. 2016. Colonization and transmission of the gut microbiota of the burying beetle, *Nicrophorus vespilloides*, through development. bioRxiv <https://doi.org/10.1101/091702>.

*A reference to an in-press ASM publication should state the control number (e.g., Microbiology Spectrum00001-21) if it is a journal article or the name of the publication if it is a book.

In some online journal articles, posting or revision dates may serve as the year of publication; a DOI (preferred) or URL is required for articles with nontraditional page numbers or electronic article identifiers.

Magalon A, Mendel RR. June 2015, posting date. Biosynthesis and insertion of the molybdenum cofactor. EcoSal Plus 2015 <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0006-2023>.

Note: a posting or accession date is required for any online reference that is periodically updated or changed.

Citations of accepted ASM manuscripts (articles from other, issue-based ASM journals that are published ahead of the issue) should look like the following example.*

Wang GG, Pasillas MP, Kamps MP. 15 May 2006. Persistent transactivation by Meis1 replaces Hox function in myeloid leukemogenesis models: evidence for cooccupancy of Meis1-Pbx and

1735 Hox-Pbx complexes on promoters of leukemia-associated genes. Mol Cell Biol
 1736 <https://doi.org/10.1128/MCB.00586-06>.

1737 ***ASM journals stopped publishing accepted manuscripts in the spring of 2022.**

1738 Other journals may use different styles for their publish-ahead-of-print manuscripts, but citation
 1739 entries must include the following information: author name(s), posting date, title, journal title,
 1740 and volume and page numbers and/or DOI. The following is an example:

1741 Zhou FX, Merianos HJ, Brunger AT, Engelman DM. 13 February 2001, posting date. Polar
 1742 residues drive association of polyleucine transmembrane helices. Proc Natl Acad Sci U S A
 1743 <https://doi.org/10.1073/pnas.041593698>.

1744 To encourage data sharing and reuse, ASM recommends reporting data sets and/or code both in a
 1745 dedicated “Data availability” paragraph and in References. The components of a complete data
 1746 citation include the following:

- 1747 • Responsible party (senior author, collector, agency),
- 1748 • Publication year,
- 1749 • Complete name of a data set, including the name of the database or repository and its
- 1750 URL, **or** the name of the analysis software (if appropriate), including the version and
- 1751 project,
- 1752 • Publisher (if appropriate), and
- 1753 • Persistent unique identifier(s) (e.g., URL[s] or accession number[s]).

1754 The following templates may be helpful.

1755 Author. Year. Description of study topic. Retrieved from Database URL (accession no. •••••).
 1756 {*Unpublished raw data.*}

1757 Author. Year. Description or title of software (version). Repository URL. Retrieved day month
 1758 year. {*Software or code.*}

1759 Examples follow.

1760 Christian SL, McDonough J, Liu C-Y, Shaikh S, Vlamakis V, Badner JA, Chakravarti A,
 1761 Gershon ES. 2002. Data from “An evaluation of the assembly of an approximately 15-Mb region
 1762 on human chromosome 13q32-q33 linked to bipolar disorder and schizophrenia.”
 1763 GenBank <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AF339794> (accession no. AF339794).
 1764 {*Accession number.*}

1765 Sun Z. 2013. Reprocessed: in-depth membrane proteomic study of breast cancer tissues.
 1766 ProteomeXchange [http://proteomecentral.proteomexchange.org/cgi/GetDataset?ID=RPXD00066](http://proteomecentral.proteomexchange.org/cgi/GetDataset?ID=RPXD000665)
 1767 [5](http://proteomecentral.proteomexchange.org/cgi/GetDataset?ID=RPXD000665) (accession number requested). {*Unassigned accession number.*}

1768 Hogle S. 2015. Supplemental material for Hogle et al. 2015 mBio.
 1769 figshare <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.1533034.v1>. Retrieved 16 March 2017. {*Code*
 1770 *and/or software.*}

1771 Nesbitt HK, Moore JW. 2016. Data from “Species and population diversity in Pacific salmon
1772 fisheries underpin indigenous food security.” Dryad Digital
1773 Repository <https://doi.org/10.5061/dryad.ng8pf>. {*Data set in repository.*}

1774 **(ii) References cited in the text.** References that should be cited in the text include the
1775 following:

- 1776 • Unpublished data
- 1777 • Manuscripts submitted for publication
- 1778 • Personal communications
- 1779 • Websites

1780 These references should be made parenthetically in the text as follows:

1781 . . . similar results (R. B. Layton and C. C. Weathers, unpublished data).
1782 . . . system was used (J. L. McInerney, A. F. Holden, and P. N. Brighton, submitted for
1783 publication).
1784 . . . as described previously (M. G. Gordon and F. L. Rattner, presented at the Fourth Symposium
1785 on Food Microbiology, Overton, IL, 13 to 15 June 1989). {*For nonpublished abstracts and*
1786 *posters, etc.*}
1787 . . . this new process (V. R. Smoll, 20 June 1999, Australian Patent Office). {*For non-U.S. patent*
1788 *applications, give the date of publication of the application.*}
1789 . . . as suggested by the World Health Organization
1790 (<https://www.who.int/campaigns/immunization-week/2017/en/>).

1791 URLs for companies that produce any of the products mentioned in your study or for products
1792 being sold may not be included in the article. However, company URLs that permit access to
1793 scientific data related to the study or to shareware used in the study are permitted.

1794 **(iii) Citations in abstracts.** Because the abstract must be able to stand apart from the article,
1795 references cited in it should be clear without recourse to the References section. Use an
1796 abbreviated form of citation, omitting the article title, as follows.

1797 (P. S. Satheshkumar, A. S. Weisberg, and B. Moss, J Virol 87:10700–10709, 2013,
1798 <https://doi.org/10.1128/JVI.01258-13>)

1799 (J. H. Coggin, Jr., p. 93–114, in D. O. Fleming and D. L. Hunt, ed., *Biological Safety. Principles*
1800 *and Practices*, 4th ed., 2006)

1801 “... in a recent report by D. A. Hopwood (mBio 4:e00612-13, 2013,
1802 <https://doi.org/10.1128/mBio.00612-13>) . . .”

1803 **(iv) References related to supplemental material.** If references must be cited in the
1804 supplemental material, list them in a separate References section within the supplemental
1805 material and cite them by those numbers; do not simply include citations of numbers from the
1806 reference list of the associated article. If the same reference(s) is to be cited in both the article

1807 itself and the supplemental material, then that reference would be listed in both References
1808 sections.

1809

1810

1811

1812

1813

1814

1815

1816

1817

1818

1819