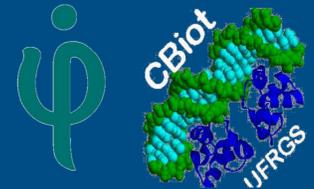


Detecção de bactérias resistentes a fármacos em amostra de água



Roberta Bussamara², Camila Rosa de Moura¹
1: Bolsista IC - Graduando em Química Industrial - Universidade Federal do Rio Grande do Sul
2: Profª Drª - Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Química - UFRGS



INTRODUÇÃO

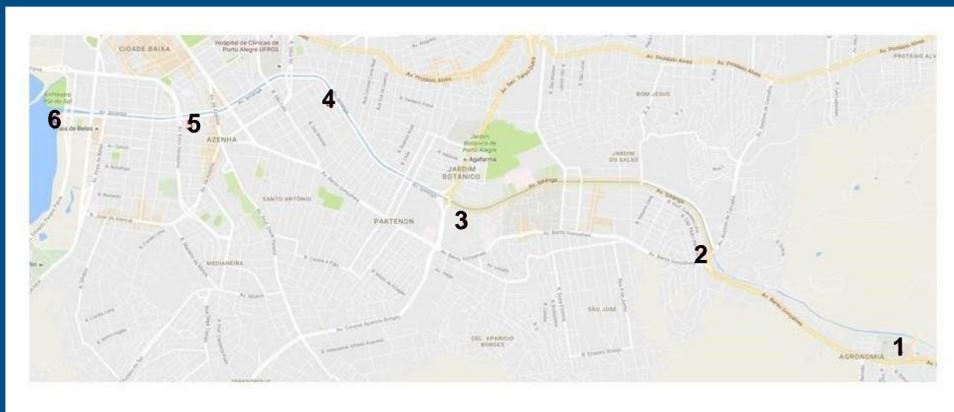
O uso excessivo de antimicrobianos tem aumentado significativamente a presença dessas substâncias nos alimentos e no meio ambiente¹. Devido ao tratamento inadequado dos resíduos gerados a partir dessas substâncias, foi detectado, recentemente, a transferência de genes resistentes a antibióticos de micro-organismos não patogênicos para os patogênicos em sedimentos, solos, efluentes e água potável². Assim sendo de grande importância a avaliação da presença de bactérias resistentes à antimicrobianos em amostras aquosas, estabelecendo estratégias para minimização de seus danos.

OBJETIVO

O principal objetivo desse trabalho é a detecção de genes de resistência à antimicrobianos presentes em bactérias coletadas em amostras ambientais de água.

METODOLOGIA

❖ PONTOS DE COLETA DE AMOSTRAS:



1 - Campus do Vale - UFRGS (próximo à nascente do Arroio Dilúvio); 2 - Av. Ipiranga, próximo à Av. Antônio de Carvalho; 3 - Av. Ipiranga, próximo à Av. Dr. Salvador França; 4 - Av. Ipiranga, próximo à Rua Vicente da Fontoura; 5 - Av. Ipiranga, próximo à Av. da Azenha; 6 - Desembocadura do Arroio Dilúvio no Rio Guaíba

❖ CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS BACTERIANAS EM MEMBRANAS DE 0,22 µm, POR FILTRAÇÃO

- Foi feita a filtração apenas das amostras 1 e 2.
- Como controle para a extração de DNA foi usada a bactéria *Escherichia coli* ATCC® 11775™ cultivada em meio LB.

Amostras 1 e 2:

- 1º membranas de 0,45 µm;
- 2º membranas de 0,22 µm.

Controle:

- membranas de 0,22 µm.



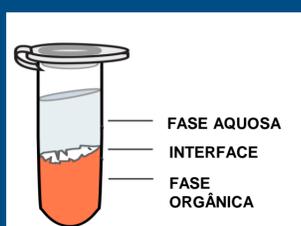
❖ OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO IN HOUSE DE EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL EM PEQUENA ESCALA

(i) LISE CELULAR QUÍMICA:

- Tris-HCl 50 mM, EDTA 100 mM, SDS 10%, pH 8,0 – TES
- Tris-HCl 1 M, EDTA.Na2 0,5 M, Triton X-100 1,2% - TET

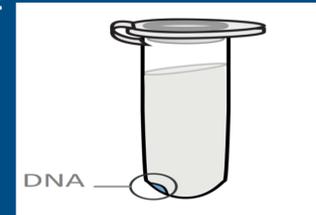
(ii) SEPARAÇÃO ORGÂNICA LÍQUIDO-LÍQUIDO:

- Extração orgânica com fenol:clorofórmio (Sambrook e Russel, 2001)³



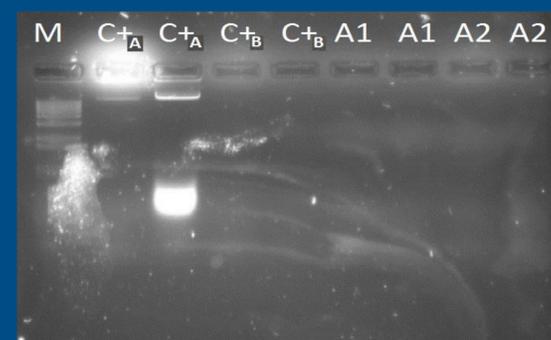
(iii) PRECIPITAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS:

- NaCl 0,2 M
- Isopropanol
- -20 °C overnight
- Centrifugação (14000 rpm, 20 min)



RESULTADOS

Os produtos de extração de DNA total foram submetidos a uma análise por eletroforese em gel de agarose para confirmação da presença e da integridade do DNA.



M - padrão de peso molecular 1Kb Plus (Invitrogen); C_{+A} - *E. coli* ATCC 11775 (DNA_T, TES); C_{+B} - *E. coli* ATCC 11775 (DNA_T, TET); A1 - Membrana amostra 1 (DNA_T, TET); A2 - Membrana amostra 2 (DNA_T, TET).

Podemos observar a presença de bandas características de DNA apenas nos produtos de extração de DNA total de *E. coli* ATCC 11775 - C_{+A} (duplicata), em que se utilizou o tampão de lise TES.

CONCLUSÃO

- ✓ Analisando-se o gel de agarose, pode-se verificar a presença de bandas características de DNA apenas nas canaletas C_{+A}, evidenciando que o tampão de lise TES utilizado foi eficiente no processo de extração DNA bacteriano. Já o tampão relatado na literatura para extração de DNA de amostra aquosas não se mostrou eficiente em nosso processo.

- ✓ Uma possível explicação para o tampão TET não ter obtido resultado é devido à diferença de protocolo de extração de DNA utilizado na literatura em comparação ao desse trabalho.

❖ Etapas futuras:

- Serão realizadas novas extrações de DNA com as amostras aquosas utilizando-se o tampão TES.
- Posteriormente à extração de DNA, será realizada a técnica de PCR para detecção de genes de resistência a antimicrobianos.

REFERÊNCIAS

1. Du, L.; Liu, W. *Agronomy for Sustainable Development* 2012, 32, 309–327.
2. Moreno-Bondi, M. C.; Marazuela, M. D.; Rodriguez, E. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2009, 395, 921–946.
3. Sambrook, J.; Russell D.W. *Molecular cloning: a laboratory manual* 2001.

AGRADECIMENTOS

