

MARIANA BROLEZZI GOMES TEIXEIRA

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS E GENÉTICOS QUE CARACTERIZAM
ENTEROBACTÉRIAS ISOLADAS DE CANA-DE-AÇÚCAR OU DE ORIGEM
CLÍNICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Heloiza Ramos Barbosa

Versão original

São Paulo
2014

RESUMO

Brolezzi M. Aspectos fisiológicos e genéticos que caracterizam Enterobactérias isoladas de cana-de-açúcar ou de origem clínica. [dissertação (Mestrado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

Membros da família Enterobacteriaceae são comumente encontrados em simbiose com plantas, promovendo o crescimento vegetal, principalmente, através da redução do nitrogênio atmosférico a amônia, provavelmente devido a transferência deste nitrogênio combinado à planta. Entretanto, enterobactérias são os principais patógenos na medicina humana e veterinária. Estas infecções podem ser adquiridas através de fontes exógenas, incluindo água, fezes, trato intestinal de animais, frutas e vegetais. O objetivo deste estudo é buscar marcadores genéticos e fisiológicos que caracterizem espécies de enterobactérias isoladas de plantas e origem clínica. Enterobactérias isoladas de cana-de-açúcar ($n=24$) e de origem clínica ($n=15$) foram submetidas a testes fisiológicos, bioquímicos e genéticos, como: i) análise da capacidade de fixar nitrogênio atmosférico; ii) avaliar a presença do gene *nifH*; iii) definir o perfil de susceptibilidade a antibióticos; iv) atividade hemolítica; v) produção de substâncias promotoras de crescimento; e, vi) liberação de enzimas extracelulares que favorecem a entrada na planta. A identificação bacteriana foi realizada por MALDI TOF-MS e sequenciamento dos genes *16S* rRNA, *rpoB* and *gapA*. Árvores filogenéticas foram construídas e a relação clonal foi realizada por ERIC PCR. Para isolados clínicos, a identificação por MALDI TOF-MS mostrou 100% de correlação com o método molecular, mas essa correlação é reduzida a 75% em amostras de origem ambiental. Isolados endofíticos e de rizosfera pertencem aos gêneros: *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Kosakonia* e os isolados clínicos pertencem aos gêneros: *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Pluralibacter*. A atividade da nitrogenase e os perfis de susceptibilidade a antibióticos foram bons marcadores, pois foram os ensaios que mais diferenciaram amostras de origem clínica e ambiental ($p < 0.05$). Amostras ambientais provaram ser melhores fixadores de nitrogênio, enquanto as clínicas exibiram perfil de múltipla resistência a antibióticos. Para o ensaio de redução de acetileno, 87.5 % das amostras ambientais foram positivas, enquanto 20% das amostras clínicas apresentaram a nitrogenase ativa. O gene relacionado à fixação de nitrogênio, *nifH*, foi encontrado em 94 e 40% das amostras ambientais e clínicas, respectivamente. A produção de hemolisina e fitormônios [ácido indol-3-acético (AIA) e etileno] não foram suficientemente distintivas para caracterizar os grupos, uma vez que, AIA foi produzido em 100 e 83% dos isolados clínicos e ambientais, respectivamente. O fitormônio etileno foi produzido por aproximadamente 93% de todas as amostras. Cerca de 80% de todos os isolados foram capazes de solubilizar fosfato; e pectinase foi produzida por 33 e 46% das amostras ambientais e clínicas, respectivamente. Por fim, enterobactérias não possuem uma relação clonal, embora a heterogeneidade entre amostras patogênicas e ambientais seja evidente. Atividades metabólicas e fisiológicas altamente conservadas, sustentadas pelo ponto vista genético, permitem a distribuição destas espécies em diferentes ecossistemas, e, em condições favoráveis, esta adaptação pode contribuir para o estabelecimento de processos patogênicos em animais ou simbióticos em plantas. Então, enterobactérias ambientais podem se tornar patogênicas, enquanto isolados clínicos podem se adaptar a condições ambientais.

Palavras-chave: Enterobacteriaceae. Cana-de-açúcar. Fixação biológica de nitrogênio. Antibióticos. Ambiental. Clínica.

ABSTRACT

Brolezzi M. Physiological and genetic characteristics that distinguish Enterobacteriaceae from sugarcane and clinical sources. [Master's thesis (Biotechnology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

Members of the Enterobacteriaceae family are commonly found in symbiosis with plants, promoting their growth mainly by the reduction of the atmospheric nitrogen to ammonia, probably due the transference of combined nitrogen to the plant. On the other hand, enterobacterias are major pathogens in human and veterinary medicine. In this regard, mostly associated infections can be acquired from exogenous sources, including water, sewage, intestinal tract of animals, fruits and vegetables. The aim of this study was to characterize physiological and genetic markers that distinguish enterobacterias species isolated from plant food and clinical sources. Enterobacterias isolates from sugarcane ($n=24$) and clinical samples ($n=15$) were characterized regarding physiological, biochemical and genetic properties using laboratory assays to: i) verify the ability to fix atmospheric nitrogen; ii) evaluate the presence of the *nifH* gene; iii) determine the antibiotic susceptibility profile; iv) screen for hemolytic activity; v) production of plant-growth promoting compounds; and, vi) study the release of extracellular enzymes favoring the entry into the host plant. Bacterial identification was made by MALDI TOF-MS and sequencing of the 16S rRNA, *rpoB* and *gapA* genes. Phylogenetic trees were constructed and the clonal relatedness was evaluated by ERIC PCR. For clinical isolates, identification by MALDI TOF-MS had 100% correlation with the molecular method and otherwise this correlation was reduced to 75% in environmental strains. While, endophytic and rhizosphere isolates belonged to genus *Klebsiella*, *Enterobacter* and *Kosakonia*, clinical isolates belonged to *Klebsiella*, *Enterobacter* and *Pluralibacter* genus. Nitrogenase activity and the antibiotic susceptibility profiles was specific marker, which distinguished clinical and environmental strains ($p < 0.05$). Indeed, environmental strains proved to be best nitrogen fixers whereas clinic strains exhibited a multidrug-resistant profile. In the acetylene reduction assay 87.5 % of the environmental strains were positive, whereas 20% of the clinic strains had active nitrogenase. In this regard, the *nifH* gene was found in 94 and 40% of environmental and clinical isolates, respectively. The production of hemolysin and phytohormones [i.e., indole-3-acetic acid (IAA) and ethylene] were not sufficiently distinguishable to characterize both groups, since IAA was detected in 100 and 83% of clinical and environmental strains, respectively. Moreover, the ethylene phytohormone was produced by approximately 93% of all isolates. About 80% of all isolates were able to solubilize phosphate and pectinase was produced by 33 and 46% of environmental and clinical strains, respectively. Finally, enterobacterias species were clonally unrelated. Although, heterogeneity of pathogenic and environmental Enterobacteriaceae is evident, highly conserved physiological and metabolic activities are supported on a genetic background that allow a wide distribution along different ecosystems, and in favorable conditions this adaptation could contribute to the establishment of a pathogenic process in animals or symbiosis in plants. So, environmental enterobacterias isolates can become pathogenic, whereas clinical strains can adapt to environmental conditions.

Keywords: Enterobacteriaceae. Sugarcane. Biological nitrogen fixation. Antibiotics. Environmental. Clinical.

1 INTRODUÇÃO

Linhagens bacterianas com potencial valor para a agricultura, promovem o crescimento das plantas e também atuam no controle de fitopatógenos, entretanto, muitas vezes, estas mesmas espécies estão associadas a doenças humanas (Dong et al., 2003).

Por exemplo, *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae* recebe muita atenção devido a associações com doenças em humanos e animais (Wei et al., 2008), mas também é encontrada em associações não patogênicas com espinafre (Lavizzari et al., 2010) e arroz (Zhang et al., 2008) ou em associações patogênicas em abacaxizeiro (Korres et al., 2010). Não está totalmente elucidado como uma espécie poderia ser tão bem sucedida nesses hospedeiros tão diferentes, como frutas e tecido humano, podendo ou não causar sintomas de doença em ambos. A formação de biofilme pode estar relacionada, pois é um dos principais mecanismos de patogenicidade desta espécie (Ohgaki, 1994). Korres et al. (2010) verificaram que isolados clínicos humanos e fitopatogênicos de *K. pneumoniae subsp. pneumoniae* possuem características similares na adesão e formação de biofilmes, apesar da diferença dos substratos originais.

1.1 Membros da família Enterobacteriaceae em hospedeiros vegetais e humanos.

Membros da família Enterobacteriaceae são comumente encontrados no solo, água, plantas e animais. Esta família pertence à subdivisão Gamma, filo Proteobacteria é representada pelo menos 44 gêneros e 176 espécies identificadas. Características fenotípicas, hibridização DNA-DNA, análises das sequências dos genes *16S* rRNA e outros genes *housekeeping* têm sido utilizadas no estudo filogenético e identificação das espécies de enterobactérias (Paradis et al., 2005; Pham et al., 2007; Toth et al., 2006). Recentemente, o método de ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS) tornou-se um método rápido para a identificação de bactérias em nível de gênero e espécie (van Baar, 2000).

1.1.1 Gênero *Klebsiella*

Originalmente, o gênero *Klebsiella*, devido à sua importância médica, foi subdividido em três espécies, correspondentes às doenças que causavam: *K. pneumoniae* (pneumonia), *K.*

ozaenae (rinite atrofica/ozena) e *K. rhinoscleromatis* (rinoscleroma). À medida em que a taxonomia se tornou cada vez mais refinada, devido ao desenvolvimento de novos métodos, a classificação de espécies, neste gênero, foi continuamente revista. Com o tempo, três classificações principais emergiram, os de Cowan, Bascomb e Ørskov. Países como a Grã-Bretanha e os antigos países da “Commonwealth of Nations” aderem à classificação de Cowan, enquanto os EUA preferem a classificação de Ørskov. Conseqüentemente, a mesma bactéria pode ser chamada de *K. pneumoniae* em um país e *K. aerogenes*, em outro. A maioria dos países europeus segue o exemplo americano e reconhece a classificação predominante de Ørskov (Podschun et al., 1996).

No início dos anos 80, isolados ambientais de *Klebsiella*, foram classificados em táxons provisórios (Gavini et al., 1977). Esses grupos deram origem a quatro novas espécies: *K. terrigena* (Izard et al., 1981), *K. ornithinolytica* (Sakazaki et al., 1989), *K. planticola* (Bagley et al., 1981), e *K. trevisanii* (Ferragut et al., 1983). Em 1986, as duas últimas foram combinadas em uma única espécie, *K. planticola*, devido à sua similaridade genética (Gavini et al., 1986).

1.1.2 Gênero *Enterobacter*

O gênero *Enterobacter* foi criado em 1960 para classificar as estirpes previamente identificadas como *Aerobacter aerogenes* (Cloaca B) e *Aerobacter cloacae* (Cloaca A) (Hormaeche et al., 1960). A taxonomia deste gênero tem uma história longa e confusa, com várias transferências de espécies nos últimos 20 anos. No final dos anos 80, *Erwinia cancerogenus*, *Erwinia nimipressuralis* e *Erwinia dissolvens* foram transferidas para o gênero *Enterobacter* (Brenner et al., 1986; Dickey, Zumoff, 1988). Em 1989, *Enterobacter agglomerans* foi transferido para o novo gênero *Pantoea* (Gavini et al., 1989). Em 2005, *Enterobacter dissolvens* foi transferido para subespécie de *Enterobacter cloacae*, como *E. cloacae* ssp. *dissolvens* (Hoffmann et al., 2005). Mais recentemente *Enterobacter sakazakii* foi transferido para um novo gênero, *Cronobacter*, com novas espécies que foram definidas a partir deste grupo (Iversen et al., 2008). A maioria das espécies pertencentes ao "complexo *E. cloacae*" são de importância clínica, em comparação com as outras que estão associadas com as plantas, alimentos, solo e água (Manter et al., 2011).

Atualmente, o gênero *Enterobacter* é um dos maiores grupos da família Enterobacteriaceae, com 20 espécies já descritas e está em rápida expansão, com 50% das descrições de novas espécies ocorridas na última década (Brady et al., 2013).

1.1.3 Gênero *Pluralibacter* e *Kosakonia*

Estes grupos foram recentemente criados, espécies deste gênero pertenciam anteriormente ao gênero *Enterobacter*. Em 2013, foram separados em dois gêneros distintos: *Pluralibacter* (*P. gergoviae* e *P. pyrinus*) e *Kosakonia* (*K. cowanii*, *K. radicincitans*, *K. oryzae* e *K. arachidis*) (Brady et al., 2013).

Espécies destes gêneros, podem ser isoladas a partir de fontes ambientais, incluindo solo e vegetais ou amostras clínicas. Espécies do gênero *Kosakonia* são descritas promovendo o crescimento das plantas, através da fixação biológica de nitrogênio (Brady et al., 2013).

1.2 Características de bactérias associadas às plantas (na rizosfera ou endofíticas).

Determinadas bactérias desta família podem estabelecer interações neutras, patogênicas ou benéficas com vegetais, colonizando a rizosfera ou estabelecendo-se dentro das plantas (Dobbelaere et al., 2003; Marin et al., 1999; Nguyen et al., 1989). No interior de plantas, localizam-se no xilema e espaços intercelulares (Belyavska et al., 1995) sendo a colonização bacteriana da rizosfera altamente influenciada pela espécie da planta devido à diferenças nos exsudados radiculares (Garbeva et al., 2004; Kowalchuk et al., 2002; Smalla et al., 2001). As plantas são frequentemente expostas a uma grande variedade de organismos patogênicos, não-patogênicos e benéficos devido ao seu estilo de vida sésil. As espécies: *Pantoea agglomerans* e *Erwinia chrysanthemi* são os principais fitopatógenos entre eles. Estas espécies são conhecidas por causar perdas significativas em muitas colheitas (Chudasama et al., 2014). Quando a associação é benéfica, a planta desencadeia uma resposta de defesa genérica, que, após um tempo, é suspensa, então bactéria e planta passam a conviver associativamente (Hardoim et al., 2008).

Há relatos de associações benéficas de *Klebsiella* em batata (*Solanum tuberosum*), em milho (*Zea mays*), trigo (*Oriza sativa*), e outras plantas (Berg et al., 2005; Chelius, Triplett

2000; Mehnaz et al., 2001). *Enterobacter cloacae* também foi encontrada no interior de raízes de milho (Hinton et al., 1995), na rizosfera de arroz (Shen et al., 1996) e, em cana de açúcar, associada à parte externa das raízes (Gracioli, 1983). Recentemente foi identificada uma nova espécie do gênero *Enterobacter* isolada do interior de cana-de-açúcar, sendo nomeada como *Enterobacter sacchari* (Zhu et al., 2013).

Quando na rizosfera, os microrganismos se nutrem do exudato das raízes e quando endofíticos, além de nutrientes, também se beneficiam da proteção do interior das plantas. Os microrganismos, por sua vez, liberam substâncias que atuam diretamente como promotoras de crescimento vegetal podendo produzir fitormônios, disponibilizar nutrientes essenciais (como nitrogênio e fósforo) e proteger a planta indiretamente por apresentar ação antagonista contra organismos fitopatogênicos (Van Loon et al., 1998; Whipps, 2001). Por desempenharem estas funções, esses microrganismos apresentam importante papel na rizosfera e equivalem a cerca de 35% de bactérias cultiváveis (Opelt et al., 2004). A maioria das espécies de rizobactérias que emergem como patógenos humanos pertence ao grupo de antagonistas (Fravel, 1988).

São várias as competências que tornam linhagens da família Enterobacteriaceae adaptadas à planta, entre elas, pode-se citar, a **capacidade de fixar nitrogênio** (Ferrara, 2010; Oliveira, 2009; Zhao et al., 2006). O nitrogênio é um elemento essencial para os seres vivos, pois é componente de proteínas e ácidos nucleicos, entre outras moléculas. Em plantas, o nitrogênio participa diretamente na produção de biomassa, pois é um dos componentes da clorofila, além de exercer grande influência no crescimento vegetal por meio de fitormônios nitrogenados (Buchanan et al., 2002). Este elemento é encontrado em abundância na atmosfera (78%), porém em uma forma quimicamente muito estável (N_2); somente organismos procariontes diazotróficos conseguem, com um elevado custo energético, tornar esse nitrogênio disponível, reduzindo-o a amônia (NH_3^+) (Zhao et al., 2006). A redução de N_2 é realizada especificamente por uma enzima complexa, a nitrogenase, composta pela dinitrogenase redutase e pela dinitrogenase. Esta enzima, às custas de ATP, quebra a tripla ligação que une os dois átomos de N_2 transformando-os em amônia. A fixação biológica de nitrogênio é um processo que requer a expressão de um conjunto de genes denominados genes *nif* (*nitrogen fixing*), os quais codificam substâncias envolvidas diretamente no processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) (Dobbelaere et al., 2003).

O estudo da genética de *K. pneumoniae* levou à descoberta de 20 genes envolvidos na FBN. Nestes microrganismos, os genes *nif* encontram-se organizados em 7-9 “operons”, ocupando uma região de aproximadamente 24Kb entre os genes *shiA* e *hisD* (Arnold et al., 1988). Desses 20 genes *nif*, 14 foram encontrados na maioria das bactérias diazotróficas. O gene *nifH* codifica a unidade estrutural da dinitrogenase redutase e os genes *nifD* e *nifK*, as subunidades estruturais da dinitrogenase. Os genes *nif*, principalmente o gene *nifH*, têm sido utilizados como marcadores no estudo de organismos fixadores de nitrogênio (Poly et al., 2001).

A verdadeira contribuição de substâncias nitrogenadas produzidas pelo processo de FBN, por bactérias endofíticas, ainda não está completamente elucidada. Algumas variedades de cana-de-açúcar podem ser supridas em cerca de 60% das necessidades de nitrogênio pela FBN, o que sugere uma transferência de nitrogênio combinado da bactéria diazotrófica para a planta. (Boddey et al., 2003; Döbereiner, 1997).

Outra característica desses microrganismos associados a plantas é a produção de substâncias promotoras do crescimento vegetal. Dentre elas estão o fitormônio **ácido indol-3-acético (AIA)**, uma auxina idêntica à vegetal, que desempenha importante papel na coordenação do desenvolvimento e crescimento de plantas. AIA atua na regulação de extensão, divisão, diferenciação vascular, formação de raízes, dominância apical e tropismos (Napier et al., 1995). Linhagens de *Klebsiella* e *Enterobacter* são capazes de liberar AIA em meio de cultura (Ferrara, 2010; Liba et al., 2006; Ryu, Patten, 2008). Patten e Glick (1996) descreveram o AIA produzido por bactérias como promotor de crescimento vegetal ou como indicador de patogenicidade, ou seja, concentrações ótimas podem estimular o crescimento enquanto altas concentrações podem indicar uma resposta de defesa.

O triptofano é a substância precursora do AIA e os microrganismos podem utilizar-se de várias vias para fazer essa transformação. As vias mais caracterizadas são a do ácido indol-3-pirúvico (IPA), a da triptamina (Tam) e a da indolacetamida (IAAm) (Koga et al., 1991; Patten, Glick, 1996; Spaepen et al., 2007).

O fitormônio **etileno** também é um potente modulador do desenvolvimento e crescimento da planta, desempenhando um papel central no metabolismo celular e seu efeito depende de sua concentração e da sensibilidade da planta (Pierik et al., 2006). Sabe-se que microrganismos capazes de sintetizar etileno a partir de metionina, podem ser patogênicos ou não. O etileno e seu precursor, ácido 1-carboxílico-1-amino ciclopropano (ACC) atuam da mesma forma na planta

(Zhang et al., 2008). Quando as plantas são submetidas a condições de estresse respondem com uma superprodução de etileno que pode retardar o crescimento vegetal, causar danos teciduais ou facilitar a infecção por microrganismos patogênicos (Glick et al., 2007). Este hormônio é também produzido em resposta a patógenos, causando reação de necrose do tecido vegetal, para isolar o foco da doença. O etileno mostrou-se fundamental para a defesa da planta em casos de doenças causadas por fungos do solo, que normalmente não são patogênicos, mas se tornam por razões desconhecidas (Hamond-Kosack, Jones, 2000).

O **Fósforo (P)** é um elemento pouco disponível na natureza porque é geralmente encontrado na forma combinada com outros íons ou com matéria orgânica, o que explica sua baixa solubilidade. Através de ácidos orgânicos, produzidos por bactérias rizosféricas, o fosfato torna-se solúvel e prontamente assimilável pelos vegetais (Kim et al., 1997; Lifshitz et al., 1987).

Várias linhagens de *Klebsiella* e *Enterobacter* isoladas de cana-de-açúcar mostraram-se potencialmente capazes de contribuir com o crescimento vegetal, pois fixaram N₂, excretaram AIA, etileno e aminoácidos (Ferrara, 2010). Experimentos de co-cultura com *Klebsiella* sp. (isolada de cana-de-açúcar) e calos (células indiferenciadas) de *Saccharum* sp., realizados em meio isento de fonte de nitrogênio combinado evidenciaram que a associação foi favorável para a planta pois aumentou o conteúdo protéico dos calos em 75%. Este fato mostra um importante potencial de contribuição das bactérias ao vegetal: a transferência para o vegetal da fonte de nitrogênio fixado pela bactéria (Martins, 2014). *K. oxytoca*, isolada de sementes de arroz, demonstrou ser uma bactéria promotora de crescimento vegetal, aumentando a massa fresca das plantas (23-28%), a produção de clorofila (23%) e o comprimento de raiz e parte aérea (Jha et al., 2007)

Ichiwaki (2012) inoculou uma linhagem de *Enterobacter spp.* (ICB481) em plântulas de cana de açúcar (vegetal induzido de células indiferenciadas) e observou aumento de proteínas totais em todas as plântulas inoculadas quando comparadas com o controle. As plântulas inoculadas com esta cepa, que não receberam nenhum tipo de adubação, apresentaram parâmetros de crescimento equivalentes aos de plântulas tratadas com fertilizantes orgânicos ou convencionais (NPK).

A rizosfera, devido ao alto conteúdo de nutrientes, é um habitat muito favorável ao desenvolvimento de grande quantidade de bactérias incluindo aquelas dotadas de traços

antagonistas, defendendo os hospedeiros por desencadear mecanismos como: **antibiose**: produção de antibióticos, biosurfactantes e toxinas; **competição** por sítios de colonização e por nutrientes; **degradação de substâncias** tóxicas produzidas por outros patógenos; e **degradação de estruturas** dos patógenos (Barbosa et al., 2011). Vários gêneros, incluindo *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* são capazes de estabelecer interações bivalentes, ou seja, manter associações benéficas com plantas e causar patogênese em mamíferos (Berg et al., 2005).

1.3 Características de bactérias associadas a mamíferos, como patógenos oportunistas

Quando associadas a animais, bactérias da família Enterobacteriaceae podem causar moléstia, porém, por serem oportunistas, só o fazem em indivíduos severamente debilitados, imunocomprometidos ou que sofrem de fibrose cística. Como agravante, mais de uma linhagem pode colonizar simultaneamente um mesmo paciente (Parke, Gurian-Sherman, 2001; Steinkamp et al., 2005). Entre os membros desta família, isolados de *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii* e *Morganella morganii* emergiram como as principais causas de infecções hospitalares por bactérias Gram-negativas (Bell et al., 2007; Jones, 2003; Kiffer et al., 2005).

Os passos da patogênese incluem invasão, colonização, crescimento e o estabelecimento da virulência, que é a capacidade relativa do patógeno em causar doença (Köthe et al., 2003). A presença de receptores, o reconhecimento e aderência a células e outros mecanismos facilmente desenvolvidos por essas bactérias, como biofilmes, juntamente com a falta de defesa do hospedeiro, podem desencadear a patogenicidade (Hacker et al., 2003) Por isso, é particularmente difícil a identificação de fatores de virulência nesses microrganismos (Alonso, Martínez, 1999; Rahme et al., 1995).

Dong et al. (2003) verificou que *Klebsiella pneumoniae* endofítica não apresenta os fatores de virulência presentes no isolado clínico da mesma espécie, como por exemplo, a produção de sideróforos e a presença de pili. A produção de sideróforos e enzimas extracelulares, por exemplo, caracterizam a mesma bactéria tanto como benéfica ou como patogêna, dependendo do hospedeiro. Os sideróforos são substâncias que apresentam alta afinidade pelo ferro, elemento muito importante para o crescimento e metabolismo bacteriano. Quando em humanos, os

sideróforos bacterianos são capazes de retirar o ferro das proteínas carreadoras (hemoglobina, transferrina e lactoferrina) e transportar para o citoplasma bacteriano (Tan et al., 1999). No solo, os sideróforos disponibilizam este elemento para o ambiente externo ou para o hospedeiro, auxiliando no crescimento da planta e além disso, descontaminando o solo de metais pesados, pois liga-se a estes, tornando-os assimiláveis para as plantas (Rajkumar et al., 2010). Algumas estruturas como fímbrias garantem a adesão bacteriana tanto em humanos como em fungos fitopatógenos; mutantes com modificações nessas estruturas foram incapazes de reconhecer hospedeiros humanos ou fúngicos (Dörr et al., 1998).

O aparecimento de estirpes resistentes a múltiplos agentes quimioterápicos criou sérios problemas no tratamento dessas infecções, enfatizando a importância de controlar a propagação de microorganismos dentro de hospitais (Hirsch, Tam, 2010; Lincopan et al., 2006; Salzman, Klemm, 1967).

1.4 Antibióticos (Mecanismos de ação e mecanismos de resistência)

Os antibióticos abaixo citados são os mais indicados na terapia às infecções por Enterobactérias (Coelho et al., 2007). O quadro 1 indica os mecanismos de ação e de resistência destes antimicrobianos.

β-lactâmicos - Pertencem a esse grupo as penicilinas, cefalosporinas, amoxilinas, cefamixinas, oxicefamixinas, ampicilinas, amidinopenicilinas, carbapênicos, ácido clavulânico, sulbactam e os antibióticos monobactâmicos. Elas provocam a lise osmótica celular ao se ligarem e inibirem as transpeptidases de membrana, responsáveis pela síntese do peptidoglicano (Andrade, 2002).

Aminoglicosídeos- são antimicrobianos bactericidas que compreendem o grupo da estreptomicina, neomicina, canamicina, tobramicina e a gentamicina (Spinosa et al., 2002). São extraídos de actinomicetos do grupo *Streptomyces*. Possuem estruturas químicas complexas, porém pequenas, derivadas de açúcares e um grupo amino. Funcionam como chave falsa, se ligando ao ribossomo bacteriano, e causando a produção de proteínas defeituosas (Andrade, 2002).

Tetraciclinas são antimicrobianos bacteriostáticos, podendo ser naturais ou semi-sintéticos. Fazem parte desse grupo a doxiciclina, oxitetraciclina, clortetraciclina, metaciclina e a

minociclina (Spinosa et al., 2002). Apresentam amplo espectro, atuando em bactérias Gram-negativas aeróbias e anaeróbias, Clamídias, Riquetsias, Espiroquetas e Micoplasmas, inibindo sua síntese protéica (Andrade, 2002).

Quinolonas - São um grupo de antimicrobianos bactericidas de amplo espectro (Mitchell, 2006). Existem atualmente quatro gerações de quinolonas: primeira geração (ácido nalidíxico, ácido oxonílico), segunda geração que são as fluorquinonas (norfloxacino, ciprofloxacino, ofloxacino, pefloxacino, enrofloxacino, danofloxacino, orbifloxacino, marbofloxacino), terceira geração (levofloxacino, esparfloxacino) e de quarta geração (trovafloxacino, clinafloxacino, sitafloxacino) (Spinosa et al., 2002).

Sulfonamidas - São bacteriostáticas para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas entéricas, clamídias, *Nocardia* sp. e protozoários. São derivados da sulfanilamida, que se caracterizam por conter moléculas de enxofre e grupamentos amina na molécula (Andrade 2002; Brooks et al., 2000).

Nitrofuranos - O componente estrutural dos nitrofuranos é um anel de furano associado a um grupo nitro. Pertencem a este grupo Furazolidona, Nitrofurantoína, Nitrofurazona, Nifurquinazol, Nifurtoinol e Nifuroxazida. Atuam sobre Gram-negativos, Gram-positivos, *Trypanossoma*, *Giardia*, *Trichomonas* e *Candida*. Os derivados do nitrofurano são substâncias bacteriostáticas que inibem a acetilcoenzima A do ciclo de Krebs, causando bloqueio no metabolismo bacteriano (Andrade, 2002).

1.4.1 Resistência a antimicrobianos

A utilização indiscriminada de agentes antimicrobianos passou a atuar como mecanismo seletivo, suprimindo os microrganismos susceptíveis e permitindo o crescimento de mutantes resistentes (Brooks et al., 2000) Seu uso frequente tem contribuído para a elevada incidência da resistência a antimicrobianos (Hyle et al., 2007).

A resistência antimicrobiana de linhagens da família Enterobacteriaceae aos maiores grupos de agentes antimicrobianos varia grandemente entre as linhagens estudadas, dependendo da procedência (origem clínica ou ambiental). A maioria destes organismos é inatamente resistente a agentes antimicrobianos mais antigos e tem a capacidade de rapidamente desenvolver resistência a novos antibióticos. Houve um aumento na incidência de casos hospitalares

causados por bactérias desse gênero e cepas resistentes surgem principalmente nos hospitais (Sanders Jr et al., 1997). Por esse motivo, infecções causadas por linhagens da família Enterobacteriaceae resistentes a carbapenem são responsáveis por taxas de mortalidade de 47% a 70%. Estes valores podem ser atribuídos à resistência múltipla e à perda de efetividade na terapia com antibióticos (Ben-David et al., 2010; Bratu et al., 2005; Borer et al., 2009).

Infecções nosocomiais estão geralmente relacionadas com linhagens de *Klebsiella pneumoniae*, causando infecções no trato urinário, sistema respiratório e no fluxo sanguíneo (Poirel et al., 2003; Struve, Krogfelt, 2004). Varon e Alangaden (2004) verificaram que, cepas desta espécie abrigam os plasmídios responsáveis pela resistência a β -lactâmicos especialmente cefalosporinas de amplo espectro e também carbapenêmicos.

A resistência a antimicrobianos pode ser de dois tipos: **Natural**: pela ausência da estrutura, ou da via metabólica alvo ou; **Adquirida**: através de mutações espontâneas e seleção ou por recombinação após transferência de genes. De um modo geral, os principais mecanismos de resistência podem ser descritos como:

-Impermeabilidade à droga: Muitas bactérias Gram-negativas são resistentes à penicilina G por serem impermeáveis à droga ou por apresentarem alterações em proteínas de ligação à penicilina. No caso das sulfonamidas, o microrganismo pode também apresentar menor permeabilidade à droga.

-Inativação: muitas drogas são inativadas por enzimas codificadas pelos microrganismos. Por exemplo, a penicilinase (β -lactamase) é uma enzima que cliva o anel β -lactâmico inativando a droga; ou por modificações, como por exemplo, a adição de grupamentos químicos ao antibiótico, promovendo sua fosforilação ou acetilação.

-Modificação de enzima ou estrutura alvo: Por exemplo, alterações na molécula do rRNA 23S (no caso de resistência à eritromicina e cloranfenicol), alteração da enzima, no caso de drogas que atuam no metabolismo, ou uso de vias metabólicas alternativas.

1.4.2 Mecanismos de transferência de material genético entre bactérias

Os Principais mecanismos de transferência de material genético incluem:

Conjugação - Processo de transferência de genes que requer contato célula a célula, mediado por um Pili sexual; **Transformação**: Captação de DNA no meio, por células receptoras

competentes. **Transdução:** Transferência genética com auxílio de bacteriófagos; **Transposição:** Transferência de genes dentro de uma mesma célula por intermédio de transposons.

Quadro 1- Classe de antibióticos, mecanismos de ação, mecanismos de resistência e seus respectivos genes

| Classe | Antibiótico | Mecanismo de Ação | Mecanismos de resistência | Genes de resistência |
|---------------------------------------------------|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Aminoglicosídeo (Amplio Espectro) | Gentamicina | Liga-se à subunidade ribossomal 30S bacteriana, promovendo erros na leitura do mRNA e interferindo com a formação do complexo de iniciação (Ding, He, 2010) | *Bactérias produzem enzimas que inativam o antibiótico. Existem mais de nove tipos não relacionados, que acetilam, fosforilam ou adelinam os aminoglicosídeos. | <i>aadA e aadB</i> |
| Aminoglicosídeo (Espectro Estrito) | Estreptomicina | | | |
| β -Lactâmico Cefalosporinas (1ª geração) | Cefalotina | Durante a síntese da parede bacteriana, o anel β -lactâmico do antibiótico inativa as enzimas envolvidas na transpeptidação, as PBPs (Penicillin Binding Protein), responsáveis pela ligação entre as cadeias peptídicas do peptidoglicano. Com isso, não há a formação de ligações cruzadas, desestruturando a parede celular, causando uma perda na rigidez. Acredita-se também que tais drogas podem atuar promovendo a ativação de enzimas autolíticas, resultando na degradação da parede. | *Ocorre devido à produção de enzimas β -Lactamases *Alteração na permeabilidade da membrana externa ocasionando diminuição da expressão ou perda de porinas. *Mecanismos de efluxo. | <i>bla_{SHV}-like</i> <i>bla_{TEM}-like</i> <i>bla_{CTX-M}-like</i> <i>bla_{KPC-2}</i> |
| β -Lactâmico Cefalosporinas (3ª geração) | Cefotaxima | | | |
| | Ceftiofur | | | |
| Carbapênicos | Ertapenem | | | |
| Nitrofurano | Nitrofurantoína | Causam inibição da acetilcoenzima A do ciclo de Krebs, causando bloqueio no metabolismo bacteriano (Andrade, 2002). | *Mecanismos ainda não definidos | |
| Quinolona | Ácido Nalidíxico | Inibem a DNA girase, afetando a replicação, transcrição e reparo do DNA (Ding et al., 2010). | * mutações nos genes que codificam a DNA girase e Topoisomerase IV e levam à <i>Quinolone-Resistant Determining Region</i> (QRDR) * mudanças na permeabilidade da membrana externa que diminuem a penetração intracelular da droga * mecanismos de efluxo. | <i>qnrA</i> <i>qnrB</i> <i>qnrS</i> <i>gyrA</i> <i>parC</i> |
| | Ciprofloxacina | | | |
| | Enrofloxacina | | | |
| Sulfa | Cotrimoxazol | Inibidoras competitivas da enzima bacteriana dihidroperato sintetase [são análogos do substrato, o ácido para-aminobenzóico (PABA)]. A enzima catalisa uma reação envolvida com a síntese de ácido fólico, necessário para a síntese de precursores de DNA e RNA nas bactérias. | *Modificação de estruturas alvo e/ou; *redução na permeabilidade da membrana | <i>sul1 e sul2</i> |
| Tetraciclina | Tetraciclina | Liga-se à subunidade ribossomal 30S (sítio A), impedindo a ligação do aminoacil-tRNA, impossibilitando a síntese protéica. | *mecanismo de efluxo | <i>tetA</i> <i>tetB</i> <i>tetG</i> |

7 CONCLUSÕES

- ✓ O sequenciamento dos genes “housekeeping” *16S* e *rpoB* confirmou a identificação obtida através do MALDI TOF-MS somente para as linhagens de origem clínica;
- ✓ análise de perfis alélicos e ST’s por MLST em *Klebsiella* demonstraram a formação de dois grupos distintos. E além disso, mostrou a similaridade de um isolado clínico (C44K) com os ambientais, assim como a similaridade de um isolado ambiental (ICBR199) com os clínicos;
- ✓ o teste de clonalidade por ERIC-PCR também formou grupos distintos e confirmou a similaridade obtida através do MLST nos dois isolados citados acima;
- ✓ os isolados ambientais são mais sensíveis aos antibióticos testados em relação aos isolados clínicos, exceto para o antibiótico Nitrofurantoína;
- ✓ isolados ambientais apresentaram maiores valores de fixação de N₂ em relação aos isolados clínicos;
- ✓ ensaios de produção de etileno, AIA, solubilização de fosfato inorgânico, produção de pectinase, celulase e hemolisina não foram distintivos para isolados de origem ambiental ou clínica.

REFERÊNCIAS*

- Albessa I, Barberis LI, Pajaro MC, Farnochi MC, Eraso AJ. A thiol-activated hemolysin in Gram-negative bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*. 1985;31:297-300.
- Alonso A, Martinez JL. Environmental and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* show pathogenic and biodegradative properties irrespective their origin. *Environmental Microbiology*. 1999;31:421-30.
- Andrade SP. Manual de terapêutica veterinária. 2ª ed. São Paulo: Rocca; 2002.
- Aranes V, Saddler JN. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. *Biotechnology for Biofuels*. 2010;3:4
- Arnold W, Rump A, Klipp W, Priefer UB, Pühler A. Nucleotide sequence of a 24,206 base pair fragment carrying the entire nitrogen fixation gene cluster of *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Molecular Biology*. 1988; 203:715-38.
- Babu-Khan S, Yeo TC, Martin WL, Duron MR, Rogers RD, Goldstein AH. Cloning of a mineral phosphate-solubilizing gene from *Pseudomonas cepacia*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1995;61:972-8.
- Bagley S, Seidler RJ, Brenner DJ. *Klebsiella planticola* sp. nov.: a new species of Enterobacteriaceae found primarily in nonclinical environments. *Current Microbiology*. 1981;6:105-9.
- Barbosa FHF, Barbosa LPJL, Bambirra LHS, Aburjaile FF. Produção de substâncias envolvidas no fenômeno de antagonismo bacteriano. *Biologia e Ciências da Terra*. 2011;11:1.
- Barbosa HR, et al. Counting of viable cluster-forming and non-cluster-forming bacteria: a comparison between the drop and the spread methods. *Journal of Microbiology Methods*. 1995; 22:39-50.
- Bell JM, Chitsaz C, Turnidge JD, Barton M, Walters LJ, Jones RN. Prevalence and Significance of a Negative Extended-Spectrum β -Lactamase Confirmation Test Result after a Positive ESBL Screening Test Result for isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: Results from the SENTRY Asia-Pacific Surveillan Program. *Journal of Clinical Microbiology*. 2007;45:1478-82.
- Belyavska NA, Kozyrovska NO, Kucherenko LA, Kordyum VA. Interrelations of *Klebsiella* with the plant. Electron-microscopy analysis of interaction of the endophytic microorganisms with rice seedling roots. *Biopolymery i Klityna*. 1995;11:55-61.
- Ben-David D, Maor Y, Keller N, Regev-Yochay G, Tal I, Shachar D. Potential role of active surveillance in the control of a hospital-wide outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. 2010;31:620-6.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

Berg G, Eberl L, Hartmann A. The Rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. *Environmental Microbiology*. 2005;7:1673–85.

Beutin L. The different hemolysins of *Escherichia coli*. *Medical Microbiology and Immunology* 1991; 180:167-82.

Boddey RM. Methods for the quantification of nitrogen fixation associated with gramineae. *CRC Critical Reviews in Plant Sciences*. 1987;6:209-66.

Boddey RM, Resende CP, Pereira JM, Cantarutti RB, Alves BJR, Ferreira E, Richter M, Cadisch G, Urquiaga S. The nitrogen cycle in pure grass and grass/legume pastures: Evaluation of pasture sustainability. In *Nuclear Techniques in Soil-Plant Studies for Sustainable Agriculture and Environmental Preservation*. 1995;319:307-19.

Boddey RM, Urquiaga S, Alves BJR, Reis V. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. *Plant and Soil*. 2003; 252:139-49.

Bolmström A. Susceptibility testing of anaerobes with Etest. *Clinical Infectious Diseases*. 1993; 16:S367–70.

Borer A, Saidel-Odes L, Riesenberk K, Eskira S, Peled N, Nativ R. Attributable mortality rate for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. 2009; 30:972–6.

Brady C, Cleenwerck I, Venter S, Coutinho T, De Vos P. Taxonomic evaluation of the genus *Enterobacter* based on multilocus sequence analysis MLSA. *Systematic and Applied Microbiology*. 2013;39:309-19.

Bratu S, Landman D, Haag R, Recco R, Eramo A, Alam M. Rapid spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City: a new threat to our antibiotic armamentarium. *Archives of Internal Medicine*. 2005; 165:1430–5.

Brenner DJ, McWhorter AC, Kai A, Steigerwalt AG, Farmer JJ. *Enterobacter asburiae* sp. nov., a new species found in clinical specimens, and reassignment of *Erwinia dissolvens* and *Erwinia nimipressuralis* to the genus *Enterobacter* as *Enterobacter dissolvens* comb. nov. and *Enterobacter nimipressuralis*. *Journal of Clinical Microbiology*. 1986; 23:1114–20.

Brooks GF, Butel JS, Morse SA. *Microbiologia médica*. 21^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.

Buchanan B, Guissem W, Jones R. *Biochemistry & Molecular Biology of plants*. American Society of Plant Biologists. 2002:1408.

Cavaliere SJ, Bohach GA, Snyder IS. *Escherichia coli* alpha-hemolysin: Characteristics and Probable Role in Pathogenicity. *Microbiological reviews*. 1984: 326-343.

Chelius MK, Triplett EW. Immunolocalization of dinitrogenase reductase produced by *Klebsiella pneumoniae* in association with *Zea mays*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000; 66:783–787.

Chimetto LA, Brocchi M, Thompson CC, Martins RCR, Barbosa HR, Thompson FL. Vibrios dominate as culturable nitrogen-fixing bacteria of the Brazilian coral *Mussismilia hispida*. *Systematic and Applied Microbiology*. 2008; 31:312-319.

Chudasama KS, Thaker VS. Biological control of phytopathogenic bacteria *Pantoea agglomerans* and *Erwinia chrysanthemi* using 100 essential oils. *Archives of Phytopathology And Plant Protection*. 2014.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals. CLSI Document M31-A3: Approved Standard-Third Edition, 2009.

CLSI. Normas de desempenho para testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para crescimento de bactérias aeróbias. Vols. M100-S15. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005.

Coelho JU, Baretta GAP, Okawa L. Seleção e uso de antibióticos em infecções intra-abdominais. *Arquivos de Gastroenterologia*. 2007;44:85-90.

Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PA, Brisse S. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005; 43:4178–4182.

Dickey RS, Zumoff CH. Emended description of *Enterobacter cancerogenus* comb. nov. formerly *Erwinia cancerogenus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 1988; 38:371–374.

Dilworth MJ. Assay methods for products of nitrogenase action on substrates. In: Smith BE, Richard LR, Newton WE (Eds) *Catalysts for nitrogen fixation: Nitrogenases, relevant chemical models and commercial processes*. Netherlands: Springer. 2004;55-76.

Ding C, He J. Effect of antibiotics in the environment on microbial populations. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010; 87:925-941.

Dobbelaere S, Vanderleyden J, Okona Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 2003; 22:107-149.

Döbereiner J. Biological Nitrogen Fixation in the tropics: social and economic contributions. *Soil Biology & Biochemistry*. 1997;29:771-4.

Döbereiner J, Baldani VL, Baldani JI. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Brasília: Embrapa; 1995.

Dong Y, et al. Comparisons between two *Klebsiella*: The plant endophyte *K. pneumoniae* 342 and a clinical isolate *K. pneumoniae* MGH78578. *Symbiosis*. 2003;35:247–59.

Dörr J, Hurek T, Reinhold-Hurek B. Type IV pili are involved in plant–microbe and fungus–microbe interactions. *Molecular Microbiology*. 1998; 30:7–17.

Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*. 1985; 39:783-91.

Ferragut C, Izard D, Gavini F, Kersters F, De Ley J, Leclerc H. *Klebsiella trevisanii*: a new species from water and soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 1983;33:133–42.

Ferrara FIS. Influência do tipo de adubação na produção de aminoácidos e de ácido indol-3-acético, etileno e poliaminas por bactérias fixadoras de nitrogênio isoladas de cana-de-açúcar *Saccharum sp.* [tese (Doutorado em Microbiologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2010.

Fogarty WM, Kelly CT. *Microbial enzymes and biotechnology*. London: Elsevier Applied Science; 1990. 92 p.

Foss DL, Baarsch MJ, Murtaugh MP. Regulation of hypoxanthine phosphoribosyltransferase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin mRNA expression in porcine immune cells and tissues. *Animal Biotechnology*. 1998;9:67–78.

Fravel DR. Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. *Annual Review of Phytopathology*. 1988; 26:75-91.

Fukuda H, Ogawa T, Tanase B. Ethylene production by micro-organisms. *Advances in Microbial Physiology*. 1993;35:275–306.

Garbeva P, Van Veen JA, Van Elsas JD. Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annual Review of Phytopathology*. 2004;42:243-70.

Gadkari D. Superoxide-dependent nitrogenase. In: Smith BE, Richard LR, Newton WE (Eds) *Catalysts for nitrogen fixation: Nitrogenases, relevant chemical models and commercial processes*. Netherlands: Springer. 2004;309-32.

Gavini F, Izard D, Grimont PAD, Beji A, Ageron E, Leclerc H. Priority of *Klebsiella planticola* Bagley, Seidler, and Brenner 1982 over *Klebsiella trevisanii* Ferragut, Izard, Gavini, Kersters, DeLey, and Leclerc 1983. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 1986;36:486–8.

Gavini F, et al. Transfer of *Enterobacter agglomerans* Beijerinck 1888 Ewing and Fife 1972 to *Pantoea* gen. nov. as *Pantoea agglomerans* comb. nov. and Description of *Pantoea dispersa* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 1989;39:337–45.

Gavini F, Leclerc H, Lefèbvre B, Ferragut C, Izard D. Etude taxonomique d'entérobactéries appartenant ou apparentées au genre *Klebsiella*. *Annales de l'Institut Pasteur Microbiology*. 1977;128b:45–9.

Glick BR, Cheng Z, Czamy J, Duan J. Promotion of plant growth by ACC deaminase-containing soil bacteria. *European Journal of Plant Pathology*. 2007;119:329-39.

Graciolli LA. Bactérias fixadoras de nitrogênio nas raízes, caules e folhas de cana-de-açúcar *Saccharum sp.*. *Annual Review of Microbiology*. 1983;14:191-6.

Hacker J, Hentschel U, Dobrindt U. Prokaryotic chromosomes and diseases. *Science*. 2003; 301:790-3.

Hales BJ. Vanadium nitrogenase. In: Smith BE, Richard LR, Newton WE (Eds) Catalysts for nitrogen fixation: Nitrogenases, relevant chemical models and commercial processes. Netherlands: Springer. 2004;255-79.

Hammond-Kosack, Jones JDG. Responses to plant pathogens. In: Buchanan B, Gruissem W, Jones R, editors. Biochemistry and molecular biology of plants, American Society of Plant Physiologists; 2000. 1408 p.

Hankin L, Zucher M, Sands DC. Improved solid medium for detection and enumeration of pectolytic bacteria. Applied Microbiology. 1971;22:205-9.

Hardoim PR, Van Overbeek LS, Van Elsas JD. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. Trends in Microbiology. 2008;16:463-71.

Hinton DM, Bacon CW. *Enterobacter cloacae* is an endophytic symbiont of corn Mycopathologia. Dordrecht. 1995; 129:117-25.

Hirsch EB, Tam VH. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases KPCs: an emerging cause of multidrug-resistant infections. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2010; 65:1119-25.

Hoffmann H, et al. Reassignment of *Enterobacter dissolvens* to *Enterobacter cloacae* as *E. cloacae subspecies dissolvens* comb. nov. and emended description of *Enterobacter asburiae* and *Enterobacter kobei*. Systematic and Applied Microbiology. 2005;28:196–205.

Holben WE, Feris KP, Kettunen A, Apajalahti JH. GC fractionation enhances microbial community diversity assessment and detection of minority populations of bacteria by denaturing gradient gel electrophoresis. Applied and Environmental Microbiology. 2004; 70:2263-70.

Hormaeche PR, Edwards A. A proposed genus *Enterobacter*. Int Bull Bacteriol Nomencl Taxon. 1960; 10:71-4.

Hyle EP, Bilker WB, Gasink LB, Lautenbach E. Impact of different methods for describing the extent of prior antibiotic exposure on the association between antibiotic use and antibiotic-resistant infection. Infection Control and Hospital Epidemiology. 2007;28:647-54.

Ichiwaki S. Efeitos da inoculação de *Enterobacter* sp. ICB 481 sobre o crescimento e acúmulo protéico em plântulas de cana-de-açúcar *Saccharum* sp. submetidas a fertilização orgânica e convencional Dissertação de mestrado. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Iversen C, et al. *Cronobacter* gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii*, and proposal of *Cronobacter sakazakii* gen. nov., comb. nov., *Cronobacter malonicus* sp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov.,... International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2008;58:1442–7.

Izard D, Ferragut C, Gavini F, Kersters K, De Ley J, Leclerc H. *Klebsiella terrigena*, a new species from soil and water. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 1981;31:116–27.

- Jha PN, Kumar A. Endophytic colonization of *Typha australis* by a plant growth-promoting bacterium *Klebsiella oxytoca* strain GR-3. *Journal of Applied Microbiology*. 2007;103:1311–20.
- Jones RN. Global epidemiology of antimicrobial resistance among community-acquired and nosocomial pathogens: a five-year summary from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program 1997-2001. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*. 2003;51:121–34.
- Jung JS, Popp C, Sparbier K, Lange C, Kostrzewa M, Schubert S. Evaluation of MALDI-TOF MS for rapid detection of β -lactam resistance in Enterobacteriaceae derived from blood cultures. *Journal of Clinical Microbiology*. 2014;52:924-30.
- Kämpfer P, et al. Molecular identification of coliform bacteria isolated from drinking water reservoirs with traditional methods and the Colilert-18 system. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 2008;211:374–84.
- Kämpfer P, Ruppel S, Remus R. *Enterobacter radicincitans* sp. nov., a plant growth promoting species of the family Enterobacteriaceae. *Systematic and Applied Microbiology*. 2005;28:213–21.
- Kiffer C, et al. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative bacteria in Brazilian hospitals: the MYSTIC Program Brazil 2003. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2005;9:216–24.
- Kim J, Rees DC. Nitrogenase and biological nitrogen fixation. *Biochemistry*. 1994;33:379–97.
- Kim KY, McDonald GA, Jordan D. Solubilization of hydroxyapatite by *Enterobacter agglomerans* and cloned *Escherichia coli* in culture medium. *Biology and Fertility of Soils*. 1997;24:446-55.
- Koga J, Adachi T, Hidaka H. IAA biosynthesis pathway from tryptophan via indole-3-pyruvic acid in *Enterobacter cloacae*. *Agricultural Biology and Chemistry*. 1991;55:701-6.
- Korres AMN, Ventura JA, Fernandes PMB. First report of bacteria and yeasts associated with pineapple fruit collapse in espírito santo state, Brazil. *Plant Disease* 2010;54:1509.
- Köthe M, et al. Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Burkholderia cepacia* is controlled by the cep quorum-sensing system. *Cellular Microbiology*. 2003;5:343-51.
- Kowalchuk GA, Buma DS, Boer W, Klinkhamer PGL, van Veen JA. Effects of above-ground plant species composition and diversity on the diversity of soil-borne microorganisms. *Antonie van Leeuwenhoek J Microbiol Serol*. 2002;81:509-20.
- Kuss AV, Kuss VV; Lovato T; Flôres ML. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 2007;42:1459-65.
- Lartigue MF, et al. Identification of *Streptococcus agalactiae* isolates from various phylogenetic lineages by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*. 2009;47:2284–7.
- Lavizzari T, Breccia M, Bover-Cid S, Vidal-Carou MC, Veciana-Nogués MT. Histamine, cadaverine, and putrescine produced in vitro by enterobacteriaceae and pseudomonadaceae isolated from spinach. *Journal of Food Protection*. 2010;73:385–9.

- Li Y, Solomon S. Ethephon: A versatile growth regulator for sugarcane industry. *Sugar Tech.* 2003;5:213-23.
- Liba CM, et al. Nitrogen-fixing chemo-organotrophic bacteria isolated from cyanobacteria-deprived lichens and their ability to solubilize phosphate and to release amino acids and phytohormones. *Journal of Applied Microbiology.* 2006;101:1076-86.
- Lifshitz R, et al. Growth promoting of canola rapessed sedlig by strian of *Pseudomonas putida* under gnotobiotic conditions. *Canadian Journal of Microbiology.* 1987;33:390-5.
- Lincopan N, Leis R, Vianello MA, Araújo MRE, Ruiz AS, Mamizuka EM. Enterobacteria producing extended-spectrum beta-lactamases and IMP-1 metallo-beta-lactamases isolated from Brazilian hospitals. *Journal of Medical Microbiology.* 2006;55:1611-3.
- Lynd LR, Weimer WH, Van ZYL, Pretorius IS. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 66, p. 506-577, 2002.
- Manter DK, Hunter WJ, Vivanco JM. *Enterobacter soli* sp. nov.: A Lignin-Degrading γ -Proteobacteria Isolated from Soil. *Current Microbiology.* 2011;62:1044-9.
- Manulis S, Valinski L, Gafni Y, Hershenhorn J. Indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in *Erwinia herbicola* in relation to pathogenicity on *Gypsophila paniculata*. *Physiological and Molecular Plant Pathology.* 1991;39:161-71.
- Marin VA, Baldani VLD, Teixeira KRS, Baldani JI. Fixação biológica de nitrogênio: bactérias fixadoras de nitrogênio de importância para a agricultura tropical. Abril de 1999. <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/598661/1/doc091.pdf>. Acesso em: 21 fev. 2014.
- Martins RCR. Resposta de calos de cana-de-açúcar na interação com bactérias endofíticas diazotróficas Tese de Doutorado. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2014.
- Matsen JM, Spindler JA, Blosser RO. Characterization of *Klebsiella* isolates from natural receiving waters and comparison with human isolates. *Journal of Applied Microbiology.* 1974;28:672-8.
- Mehnaz C, et al. Isolation and 16S rRNA sequence analysis of the beneficial bacteria from the rhizosphere of rice. *Canadian Journal of Microbiology.* 2001;47:110-7.
- Mitchell MA. Enrofloxacin. *Journal of Exotic Pet Medicine.* 2006;15:66-9.
- Mollet C, Drancourt M, Raoult D. *rpoB* sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. *Molecular Microbiology.* 1997;26:1005-11.
- Muller JH, Hinton J. A protein free medicine for primary isolation of onococcus and meningococcus. *Proceedings of society of experiments. Biology and Medicine.* 1941;48:330-3.
- Murray PR, Drew WL, Kobayashi GS, Thompson Jr JH. *Microbiologia médica.* 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999.
- Napier RM, et al. Purification, sequencing and functions of calreticulin from maize. *Journal of Experimental Botany.* 1995;46:1603-13.

- Narloch C. Interação microrganismos solubilizadores de fosfatos-fungos ectomicorrízicos e o crescimento de *Pinus taeda* L. Dissertação de Mestrado. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina; 2002.
- Nautiyal CS. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. FEMS Microbiology Letters. 1999;170:265-70.
- Nguyen T, Ton T, Tarasenko V, Kozyrovska N. Nitrogen-Fixing bacteria colonize the rice root xylem. Biopolymery i Kletka. 1989;5:97-9.
- Ohgaki N. Bacterial biofilm in chronic airway infection. Kansenshogaku Zasshi. 1994;68:138–51.
- Oliveira ZM. Rizobactérias promotoras de crescimento vegetal isoladas de cana-de-açúcar sob fertilização orgânica e/ou convencional. [tese (Doutorado)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2009.
- Opelt K, Berg G. Diversity and antagonistic potential of bacteria associated with bryophytes from nutrient poor habitats of the Baltic Sea Coast. Applied and Environmental Microbiology. 2004; 70:6569 – 6579.
- Paradis S, et al. Phylogeny of the Enterobacteriaceae based on genes. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2005; 55:2013–2025.
- Pariona-Llanos R, Ferrara FIS, Gonzales HS, Barbosa HR. Influence of organic fertilization on the number of culturable diazotrophic endophytic bacteria isolated from sugarcane. European Journal of Soil Biology. 2010;46:387-93.
- Parke JL, Gurian-Sherman D. Diversity of the Burkholderia cepacia complex and implications for risk assessment of biological control strains. Annual Reviews Phytopathology. 2001;39:225-58.
- Patten CL, Glick BR. Bacterial Biosynthesis of indole-3-acetic acid. Canadian Journal of Microbiology. 1996; 42:207-20.
- Pham HN., et al. Phylogeny and species identification of the family Enterobacteriaceae based on dnaJ sequences. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 2007;58:153-61.
- Pierik R, Tholen D, Poorter H, Visser EJW, Voeselek LACJ. The Janus face of ethylene: growth inhibition and stimulation. Trends in Plant Sciences. 2006;11:176-83.
- Pitout JD, Moland ES, Sanders CC, Thomson KS, Fitzsimmons SR. Beta-lactamases and detection of beta-lactam resistance in *Enterobacter* spp. Antimicrob Agents Chemother. 1997;35–9.
- Podschun R. Phenotypic properties of *Klebsiella pneumoniae* and *K. oxytoca* isolated from different sources. Zentralbl Hyg Umweltmed. 1990;189:527–35.
- Podschun R, Sahly H. Hemagglutinins of *Klebsiella pneumoniae* and *K. oxytoca* isolated from different sources. Zentralbl Hyg Umweltmed. 1991;191:46–52.
- Podschun R, Ullmann U. Bacteriocin typing of *Klebsiella* spp. isolated from different sources. Zentralbl Hyg Umweltmed. 1996;198:258–64.

- Poirel L, Héritier C, Podglajen I, Sougakoff W, Gutmann L, Nordmann P. Emergence in *Klebsiella pneumoniae* of a chromosome-encoded SHV beta-lactamase that compromises the efficacy of imipenem. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2003;47:755–8.
- Poly F, Monrozier LJ, Bally R. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. *Microbiological research*. 2001;152:95–103.
- Prada J, Beutin L. Detection of *Escherichia coli* alpha-hemolysin genes and their expression in a human faecal strain of *Enterobacter cloacae*. *FEMS Microbiology Letters*. 1991;63:111-4.
- Rahme LG, Stevens EJ, Wolfort SB, Shoa J, Tompkins RG, Ausubel FM. Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science*. 1995;268:1899-902.
- Rajkumar M, Ae N, Prasad MNV, Freitas H. Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends in Biotechnology*. 2010;28:142-9.
- Recouvreux DOS, Carminatti CA, Pitlovanciv DGA, Miqueleto AP, Oliveira IL, Antonio RV, Porto LM. Evidências da presença de celulose no Biofilme formado por *Chromobacterium violaceum*. 2005. Disponível em: < <http://repositorio.ufsc.br/xmlui/handle/123456789/87780> > Acesso em: março 2014.
- Rodriguez H, Fraga R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*. 1999;17:319-39.
- Ryu JR, Patten CL. Aromatic Amino Acid-Dependent Expression of Indole-3-Pyruvate Decarboxylase Is Regulated by TyrR in *Enterobacter cloacae* UW5. *Journal of Bacteriology*. 2008; 190:7200-8.
- Sakazaki R, Tamura K, Kosako Y, Yoshizaki E. *Klebsiella ornithinolytica* sp. nov., formerly known as ornithine-positive *Klebsiella oxytoca*. *Current Microbiology*. 1989; 18:201–6.
- Salzman TC, Klemm L. Transferable drug resistance R factors in Enterobacteriaceae: relationship to nosocomial infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1967:212-20.
- Sanders Jr WE, Sanders CC. *Enterobacter* spp.: Pathogens Poised To Flourish at the Turn of the Century. *Clinical Microbiology Reviews*. 1997;10:220–41.
- Schmittgen TD, Zakrajsek BA. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 2000; 46:69–81.
- Seidler RJ, Knittel MD, Brown C. Potential pathogens in the environment: cultural reactions and nucleic acid studies on *Klebsiella pneumoniae* from clinical and environmental sources. *Journal of Applied Microbiology*. 1975; 29:819–25.
- Setubal JC, dos Santos P, Goldman BS, Ertesvåg H, Espin G. Genome Sequence of *Azotobacter vinelandii*, an obligate aerobe specialized to support diverse anaerobic metabolic processes. *Journal of Bacteriology*. 2009;191:4534–45.
- Shen BF, Zhu HR, Li J. Response of rice to inoculation with genetic engineered strains of associative diazotrophs. *Chinese Rice Research Newsletter*. 1996;4:4-5.

- Short EC, Kurtz HJ. Properties of the hemolytic activities of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*. 1971;3:678.
- Smalla K, Wieland G, Buchner A, Zock A, Parzy J, Roskot N. Bacterial bulk and rhizosphere communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified fragments of 16S rRNA genes – plant dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001;67:4742-51.
- Smith HW. The haemolysins of *Escherichia coli*. *Journal of Pathology & Bacteriology*. 1963;85:197.
- Sneath PHA, Sokal RR. *Numerical taxonomy*. San Francisco: Freeman; 1973.
- Spaepen S, Vanderleyden J, Remans R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*. 2007;31:425–48.
- Spinosa HS, Górnica SL, Bernardi MM. Considerações gerais sobre os antimicrobianos. In: *Farmacologia aplicada à medicina veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002. p. 379-85.
- Steinkamp G, et al. Prospective evaluation of emerging bacteria in cystitis fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2005;4:41-8.
- Stock I, Wiedemann B. Natural antibiotic susceptibility of *Enterobacter amnigenus*, *Enterobacter cancerogenus*, *Enterobacter gergoviae* and *Enterobacter sakazakii* strains. *Clinical Microbiology and Infection*. 2002;8:564–78.
- Struve C, Krogfelt KA. Pathogenic potential of environmental *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Environmental Microbiology*. 2004;6:584–90.
- Su L, Chen S, Wu J. Advance on *Escherichia coli* alpha-hemolysin secretion pathway-a review. *Wei Sheng Wu Xue Bao*. 2013;53:1011-7.
- Taiz L, Zeiger E. *Plant Physiology*. 3rd ed. Sunderland: Sinauer Associates. 2002.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 2013;30:2725-9.
- Tamura K, Nei M, Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004;101:11030-5.
- Tan MW, Rahme LG, Sternberg JA, Tompkins RG, Ausubel FM. *Pseudomonas aeruginosa* killing of *Caenorhabditis elegans* used to identify *P. aeruginosa* virulence factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999; 96:2408–13.
- Tang YW, Ellis NM, Hopkins MK, Smith DH, Dodge DE, Persing DH. Comparison of Phenotypic and Genotypic Techniques for Identification of Unusual Aerobic Pathogenic Gram-Negative Bacilli. *Journal of Clinical Microbiology*. 1998; 36:3674-3679.
- Tavares W. *Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos*. 2^a ed. São Paulo: Atheneu; 1996.

Teather RM, Wood PJ. Use of congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulotic bacteria from the bovine rumen. *Applied and Environmental Microbiology*. 1982; 43:777-80.

Teixeira KR. Bases moleculares e genética da fixação biológica de nitrogênio. Embrapa-CNPAB. Documentos. 1997;32:26.

Thuler DS, Floh EI, Handro W, Barbosa HR. *Beijerinckia dextrii* releases plant growth regulators and amino acids in synthetic media independent of nitrogenase activity. *Journal of Applied Microbiology*. 2003; 95:799-806.

Thuler DS, Floh EI, Handro W, Barbosa HR. Plant growth regulators and amino acids released by *Azospirillum* sp in chemically defined media. *Letters in Applied Microbiology*. 2003;37:174-8.

Toth IK, Pritchard L, Birch PR. Comparative genomics reveals what makes an enterobacterial plant pathogen. *Annual Review of Phytopathology*. 2006; 44:305–36.

Toyoda et al. Expression of the *gapA* gene encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Corynebacterium glutamicum* is regulated by the global regulator SugR. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2008;81:291-301.

Trabulsi LR, Alterthum F, Martinez MB, Campos LC, Gompertz OF, Rácz ML. *Microbiologia*. 4^a ed. São Paulo: Atheneu; 2005.

van Baar BL. Characterisation of bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionisation and electrospray mass spectrometry. *FEMS Microbiology Reviews*. 2000;24:193–219.

Van Loon LC, Bakker PA, Pieterse CM. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*. 1998; 36:453–83.

Varon NF, Alangaden GJ. Emerging trends in infections among renal transplant recipients. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 2004;2:95–109.

Vass M, Hruska K, Franek M. Nitrofurantoin antibiotics: a review on the application, prohibition and residual analysis. *Veterinarni Medicina*. 2008;53:469–500.

Verma SC, Lahda JK, Tripathi AK. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *Journal of Bacteriology*. 2001; 91:127-41.

Versalovic J, Koeth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*. 1991;91:6823-31.

Vimont S, Mnif B, Fevre C, Brisse S. Comparison of PFGE and multilocus sequence typing for analysis of *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Journal of Medical Microbiology*. 2008;57:1308-10.

Wang JR, Zhang LY. Simultaneous Determination and Identification of Furazolidone, Furaldone, Nitrofurazone, and Nitrovin in Feeds by HPLC and LC-MS. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2006; 29:377–90.

Wang L, et al. A Minimal Nitrogen Fixation Gene Cluster from *Paenibacillus* sp. WLY78 Enables Expression of Active Nitrogenase in *Escherichia coli*. *PLoS Genetics*. 2013;9.

Wei, H, et al. Fatal infection in human flora-associated piglets caused by the opportunistic pathogen *Klebsiella pneumoniae* from an apparently healthy human donor. The Journal of Veterinary Medical Science. 2008;70:715-7.

Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. Journal of Bacteriology. 1991; 173:697–703.

Whipps J. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. Journal of experimental Botany. 2001;52:487–511.

Wood WA, Kellogg ST. Biomass Part A. Cellulose and Hemicellulose. Methods in Enzymology. 1988;160.

Yuan P, et al. A novel low-temperature active alkaline pectate lyase from *Klebsiella* sp. Y1 with potential in textile industry. Process Biochemistry. 2011;46:1921–6.

Zhang GX, et al. Diverse endophytic nitrogen-fixing bacteria isolated from wild rice *Oryza rufipogon* and description of *Phytobacter diazotrophicus* gen. nov. sp. nov. Archives of Microbiology. 2008;189:431-9.

Zhao Y, Bian S, Zhou H, Huang J. Diversity of Nitrogenase Systems in Diazotrophs. Journal of Integrative Plant Biology. 2006;48:745–55.

Zhu B, et al. *Enterobacter sacchari* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane *Saccharum officinarum* L.. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2013; 63:2577-82.