



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA DEPARTAMENTO  
DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E EVOLUÇÃO

ITANA ALMEIDA DOS SANTOS

**DNA AMBIENTAL DE SEDIMENTOS DE ECOSISTEMAS  
COSTEIROS EM VALENÇA, BAHIA, COM FOCO EM GENES DE  
RESISTÊNCIA BACTERIANA**

FEIRA DE ANTANA, BAHIA

2023

ITANA ALMEIDA DOS SANTOS

**DNA AMBIENTAL DE SEDIMENTOS DE ECOSSISTEMAS  
COSTEIROS EM VALENÇA, BAHIA, COM FOCO EM GENES DE  
RESISTÊNCIA BACTERIANA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução da Universidade Estadual de Feira de Santana, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ecologia e Evolução.

Orientador: Dr. Eddy José Francisco de Oliveira

FEIRA DE SANTANA, BAHIA

2023

Ficha Catalográfica - Biblioteca Central Julieta Carteadó – UEFS

S235d Santos, Itana Almeida dos  
DNA ambiental de sedimentos de ecossistemas costeiros em Valença,  
Bahia, com foco em genes de resistência bacteriana – 2023.  
64f.: il.

Orientador: Eddy José Francisco de Oliveira.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Feira de Santana,  
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução, 2023.

1. Contaminação – Meio ambiente. 2. Resistência bacteriana.  
3. Ecossistema Marinho. 4. Vigilância ambiental. I. Título.  
II. Oliveira, Eddy José Francisco de, orient. III. Universidade Estadual de  
Feira de Santana.

CDU 574.5:579.63(814.22)

R enata Aline Souza Silva - Bibliotecária - CRB-5/1702

ITANA ALMEIDA DOS SANTOS

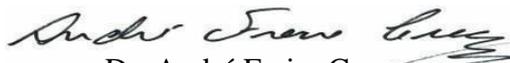
**DNA AMBIENTAL DE SEDIMENTOS DE ECOSISTEMAS COSTEIROS  
EM VALENÇA, BAHIA, COM FOCO EM GENES DE RESISTÊNCIA  
BACTERIANA**

Aprovada em: 11/08/2023

**BANCA EXAMINADORA**



Dr. Eddy José Francisco de Oliveira  
Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS)  
Orientador e Presidente da Banca



Dr. André Freire Cruz  
Kyoto Prefectural University - Japão



Dra. Carolina Oliveira de Santana  
Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS)

Feira de Santana, Bahia

Às bactérias que primeiro irão decompor as  
frias carnes do meu cadáver, dedico com  
respeitosa reverência esta dissertação.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução, que tornou possível a realização desta pesquisa, assim como todos os professores que contribuíram com as discussões e as sugestões apenas incrementaram neste projeto.

Ao meu orientador, professor Eddy José Francisco de Oliveira, com quem eu nunca deixo de aprender que a Ciência é feita com parcerias e, principalmente, muita criatividade, e com quem compartilho muitas ideias ambiciosas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia, cujo apoio financeiro permitiu que eu me dedicasse à pesquisa e ao estudo. Universidade Estadual de Feira de Santana e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A todos do Laboratório de Entomologia, Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada à Saúde Pública, Laboratório de Análises Clínicas e Laboratório de Biologia Molecular.

A todos que contribuíram para a popularização do conhecimento científico. Em tempos sombrios de ascensão do negacionismo, negar o acesso à ciência é contribuir para que essa situação se perpetue.

Um agradecimento especial aos meus amigos e colegas da turma 2021.1, com quem compartilhei todas as comemorações, desesperos e frustrações em relação à carreira acadêmica.

Por fim, mas não menos importante, agradeço aos meus amigos e aos meus familiares, especialmente meus pais, Rose e Roque, que nunca deixaram de me apoiar nessa jornada e que compreenderam minhas ausências.

## RESUMO GERAL

A vigilância ambiental em saúde através da análise de RNA e DNA ambiental tem se revelado uma importante estratégia para o monitoramento de patógenos em ambientes urbanos, especialmente no que se refere à detecção de genes que conferem resistência a antibióticos (ARGs). Adicionalmente, a qualidade de um ecossistema também pode ser observada através do estudo da diversidade microbiana. Partindo da perspectiva integrada da Saúde Única, que considera que a saúde humana, animal e ambiental são complementares, é possível desenvolver estratégias que permitam o intercâmbio de tecnologias entre diferentes setores públicos e privados para investigar e mitigar, concomitantemente, problemas ambientais e de saúde pública. A poluição tem figurado na lista dos problemas ambientais mais preocupantes, expresso através da contaminação de solos, ar e corpos hídricos. Um grave problema tem sido a liberação massiva de medicamentos antimicrobianos usados na saúde humana e animal nos ecossistemas, o que contribui para a seleção de ARGs. Desta forma, o objetivo desta dissertação é investigar, de forma conjunta, questões de Saúde Pública e Conservação Ambiental, a partir da análise da composição de comunidades microbianas em sedimentos de corpos hídricos em regiões costeiras. Para isto, foi investigado o DNA ambiental de quatro regiões estuarinas, em diferentes status de conservação, no município de Valença, Bahia. Os genes *tetA*, *tetB*, *tetE*, *qnrA*, *qnrB*, *catA*, *blaSHV*, *blaTEM* e *sulI* foram quantificados através de qPCR. Adicionalmente, foi feita a metagenômica do amplicon 16S rRNA para o estudo da composição da comunidade microbiana em cada ponto de amostragem. Em todas as amostras, foram detectados ao menos um gene de resistência. Em Guaibim-2, local residencial destituído de sistema de esgotamento sanitário, verificou-se maior quantidade e diversidade de ARGs, seguido pelas amostras coletadas em Una. Ambas apresentaram genes exclusivos e microrganismos prioritários para vigilância genômica devido ao seu histórico de resistência a potentes antibióticos (*Enterococcus faecium*, *Acinetobacter sp*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter cloacae*), além de outros microrganismos associados a infecções graves. Em Guaibim-1 e Taquari, também foram detectados genes de resistência, mas em menor quantidade, e nenhum dos organismos associados à multirresistência foi encontrado. Os filos de bactérias mais abundantes foram Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria, Chloroflexi e Firmicutes, mas a abundância relativa destes filos variou conforme as amostras. Os resultados sugerem que Guaibim-2 e Una são os locais mais impactados por efluentes humanos e Guaibim-1 e Taquari são as regiões mais conservadas.

**Palavras-chave:** Contaminação, Efluente, Metagenômica, Resistência bacteriana, Vigilância Ambiental.

## ABSTRACT

Environmental surveillance through environmental RNA and DNA is an important strategy for pathogen monitoring in urban surroundings, especially regarding detection of genes of resistance to antibiotic (ARGs). Additionally, the quality of ecosystems can be verified through study of microbial diversity. From the perspective of One Health, which considers that human, animal and environmental health are complementary, it is possible to develop strategies and technologies exchange between different public and private sectors to investigate and mitigate environmental and public health problems. Pollution is one of the most concerning environmental problems, and it reflects on contamination of soil, air and water. The massive liberation of antimicrobial drugs used on animal and human health on ecosystems contribute to ARG selection. The objective of this dissertation is to investigate, in an integrated way, Public Health and Environmental Conservation questions, through analysis of composition of microbial communities in sediments of water. For this, environmental DNA of four estuary regions in different status of conservation in Valença, Bahia, Brazil, was investigated. *TetA*, *tetB*, *tetE*, *qnrA*, *qnrB*, *catA*, *blaSHV*, *blaTEM* and *sull* genes was quantified through qPCR and additionally, was performed metagenomics of 16S rRNA amplicon for the study of microbial community composition in each sample point. In Guaibim-1, a residential area, there was greater diversity of ARGs, followed by samples collected on Una. Both of them have exclusive genes. This study detected microorganisms generally associated with multiresistance to antibiotics (*Enterococcus faecium*, *Acinetobacter sp*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter cloacae*), in addition to other microorganisms associated with serious infections. In Guaibim-1 and Taquari, resistance genes were also detected, but in less quantity and no organisms associated to multiresistance were found. The bacterial phyla more abundant was

Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria, Chloroflexi and Firmicutes, but the relative abundance of these phyla varied according to the samples. The results imply that Guaibim-2 and Una are more impacted by human effluents and Guaibim and Taquari are more conserved.

**Key-word:** Bacterial resistance, Contamination, Effluent, Environmental Surveillance, Metagenomics.

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1

Figura 1.....	37
Figura 2.....	40
Figura 3.....	41
Figura 4.....	41
Figura 5.....	42
Figura 6.....	42
Figura 7.....	47
Figura 8.....	48
Figura 9.....	49
Figura 10.....	50

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

### Referencial teórico

Quadro 1.....	18
Quadro 2.....	20

### Capítulo 1

Quadro 1.....	40
Tabela 1.....	43
Tabela 2.....	44
Tabela 3.....	49

## SUMÁRIO

REFERENCIAL TEÓRICO	11
REFERÊNCIAS DO REFERENCIAL TEÓRICO	24
INFORMAÇÕES SOBRE A DISSERTAÇÃO	31
CAPÍTULO 1	32
CONCLUSÃO GERAL	55
REFERÊNCIAS	57
ANEXO 1	64

## REFERENCIAL TEÓRICO

### 01. *A emergência de uma Ecologia Microbiana*

As atividades biológicas exercidas pelos microrganismos que compõem ecossistemas aquáticos e terrestres, como a decomposição da matéria orgânica, a ciclagem de nutrientes, e a formação do solo são essenciais para a manutenção dos mesmos (MA et al., 2021). No entanto, o estudo destes seres microscópicos só avançou com o desenvolvimento de técnicas da biologia molecular, que emergiu a partir da década de 1940 como uma ferramenta para estudar os organismos sob uma nova perspectiva (MORANGE, 1998).

Neste sentido, a Ecologia Microbiana surgiu recentemente como uma subárea da Ecologia, campo da ciência que começou com os estudos do biólogo Heinrich Haeckel e que estuda a relação entre os organismos e o ambiente em que eles vivem (MATOS et al., 2016), com o objetivo de entender as comunidades microbianas e suas relações com os fatores bióticos e abióticos de um ecossistema (GRAY; HEAD, 2008). É preciso salientar que há dificuldades em determinar parâmetros ecológicos para microrganismos, de modo que muitos estudos os submetem aos parâmetros conhecidos para macrorganismos (MATOS et al., 2016).

A ampla gama de microrganismos e de suas interações em um ecossistema é um fator que inviabiliza que um estudo robusto seja realizado *in vitro*, uma vez que todos os fatores capazes de influenciar a composição de uma comunidade microbiana não poderiam ser reproduzidos em laboratório. Nesta perspectiva, a popularização da biologia molecular foi um dos maiores propulsores da Ecologia Microbiana, tornando possível a identificação e caracterização funcional de vários grupos de microrganismos que não podem ser cultivados (van den BERG et al., 2022).

Partindo deste pressuposto, é inexequível dissociar o estudo dos microrganismos de um ambiente da Ecologia Molecular (YOCCOZ, 2012), outro campo emergente da Ecologia. A Ecologia Molecular aplica técnicas moleculares para a explicitação da diversidade genética, funcional, evolutiva e adaptativa de genes (FREELAND, 2020), o que incrementa os estudos ecológicos. Esta área surgiu como um braço da biologia evolutiva, da sistemática filogenética e da genética de populações e apenas emergiu como um campo de conhecimento com a diversificação dos marcadores genéticos do

desenvolvimento de tecnologias com melhor custo-benefício (ROWER; SWEET; BEEBEE, 2017).

Nesta perspectiva, o DNA ambiental, ou eDNA (do inglês *environmental DNA*), termo introduzido na década de 1980, tem sido muito utilizado no estudo da Ecologia Molecular. O DNA ambiental, ou RNA ambiental, é o material genético de um ou mais organismos que não estão necessariamente presentes no ambiente no momento da coleta, obtido a partir de amostras de solo, água ou ar (PADILLA-GARCÍA; CAMACHO-SÁNCHEZ; REYES LOPES, 2021).

As perspectivas para a popularização das técnicas de análise do eDNA são promissoras, uma vez que as tecnologias para tais análises têm avançado e sofrido redução de custos. Entretanto, ainda é necessário maior investimento na formação de bioinformatas que estejam integrados nas pesquisas desde a formulação das hipóteses. Além disso, pesquisadores da área defendem que, do mesmo modo que métodos tradicionais em Ecologia não conseguem abarcar toda a complexidade biológica de uma amostragem, restringir as pesquisas à Ecologia Molecular pode resultar em uma problemática semelhante. Assim, o ideal é que a análise do DNA ambiental seja abordada de forma integrada com outras técnicas tradicionais da Ecologia, de modo a incrementar a robustez dos dados (PADILLA-GARCÍA; CAMACHO-SÁNCHEZ; REYES-LOPES, 2021; YOCCOZ, 2012).

Por conseguinte, estudos de eDNA envolvendo microrganismos podem elucidar aspectos relacionados à genética evolutiva, à genômica, transcriptômica, proteômica, epigenoma, filogeografia, ecologia comportamental, biologia da conservação, sistemática e taxonomia de seres, que, como citado anteriormente, são essenciais para a manutenção de ecossistemas aquáticos e de solo e, portanto, fundamentais para a manutenção da vida na Terra. Deste modo, o estudo nesta área do conhecimento é imprescindível para o desenvolvimento de aspectos teóricos da ecologia (MATOS; DURRER; ANDREOTE, 2016), que, tradicionalmente, tem negligenciado o estudo dos microrganismos (PANIKOV, 2010).

## 02. *A microbiota ambiental*

O estudo dos microrganismos de um ambiente não pode ocorrer de forma isolada,

pois as populações microbianas são dependentes das interações estabelecidas com outros organismos, sejam elas positivas, dentre as quais pode-se citar o comensalismo e o mutualismo, ou negativas, destacando-se nesta segunda categoria o antagonismo, a predação, o parasitismo e a competição (MATOS; DURRER; ANDREOTE, 2016).

Via de regra, os microrganismos estão organizados em populações, com diferentes frequências em determinado ambiente. A riqueza de espécies diz respeito ao número de espécies observadas e a diversidade está relacionada à variabilidade e abundância relativa das espécies (MATOS; DURRER; ANDREOTE, 2016). As relações entre duas ou mais populações caracterizam as comunidades biológicas. O conjunto destas comunidades denominado microbiota, e sua distribuição ao longo de um habitat segue uma série de parâmetros físico-químicos, como disponibilidade de nutrientes, umidade disponível, aeração, temperatura, pH, matéria orgânica (MELLONI, 2007; PELCZAR, 1996). A salinidade também é um fator que afeta a atividade microbiana, configurando uma pressão seletiva para a seleção da microbiota (SILVA et al., 2013).

Neste sentido, é imprescindível salientar que os microrganismos estão sujeitos às mesmas leis que regem outros seres vivos, e, portanto, podem sofrer por pressões seletivas em seu habitat. Os parâmetros supracitados são fatores que selecionam as populações que estão mais adaptadas ao ambiente. Para a genética, isso geralmente se traduz em grupos que possuem mecanismos moleculares capazes de metabolizar substâncias presentes no ambiente, convertendo-as para suas próprias necessidades bioquímicas. Ademais, a competição também é uma importante variável para a composição das comunidades microbianas (MATOS; DURRER; ANDREOTE, 2016).

Estima-se que, em uma grama de solo, por exemplo, possam ser encontrados cerca de 1 bilhão de bactérias e mais de 1 km em hifas de fungos. Essas populações, contudo, não estão distribuídas uniformemente nas amostras de solo, podendo diminuir com a profundidade (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Este quantitativo pode variar sazonalmente, de acordo com condições de temperatura e umidade. Já a diversidade microbiana, contanto que não exposta a interferências físico-químicas atípicas, mantém-se inalterada ao longo do ano (ZILLI et al., 2003).

Nota-se que a diversidade microbiana de um ambiente é um componente essencial para a determinação de sua qualidade (ZILLI et al., 2003). Diversos estudos têm sido elaborados no sentido de determinar bioindicadores microbiológicos para o estresse ambiental. No entanto, ainda não há consenso acerca da efetividade desta associação.

(MELLONI, 2007; ZILLI et al., 2003).

Dentre os principais grupos de microrganismos em amostras ambientais, encontram-se as bactérias, que são os organismos mais numerosos, os actinomicetos, que embora pertençam ao mesmo grupo, em geral são classificadas separadamente, e os fungos, que frequentemente encontram-se associados a raízes de plantas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Diferentes grupos destes microrganismos realizam importantes funções nos ecossistemas, tais como decomposição da matéria orgânica, ciclagem de nutrientes e formação do solo (MATOS; DURRER; ANDREOTE, 2016; ZILLI et al., 2003).

A composição da comunidade bacteriana é relativamente similar em diferentes ambientes, considerando-se níveis taxonômicos de filo. Em amostras de solo, por exemplo, destacam-se grupos Proteobacteria, Actinobacteria, Verrucomicrobia, Chloroflexi, Gemmatimonadetes, Bacteroidetes, Planctomicetos, Firmicutes e Cyanobacteria. A abundância relativa destes grupos pode variar de acordo com o ecossistema trabalhado. Conforme se avança nas categorias taxonômicas, torna-se mais difícil normatizar os grupos mais abundantes em cada tipo de ecossistema, uma vez que as taxas de gênero e espécie oscilam muito para cada região (SOUZA et. al, 2013; NELSON et. al, 2016, HAYATSU et. al, 2008).

Diferentes grupos de microrganismos podem executar uma mesma função em um ecossistema, o que é denominado redundância funcional. Este fenômeno garante a manutenção de um sistema heterogêneo e dinâmico, além de maior resiliência, na hipótese de ocorrência de eventos atípicos (MATOS; DURRER; ANDREOTE, 2016).

### *03. Impactos antrópicos na microbiota ambiental*

#### **a. O uso de solos e sedimentos**

O crescimento exponencial da população humana e o avanço da industrialização tem acelerado o êxodo para cidades, promovendo incremento na urbanização e a expansão das grandes metrópoles. Somado a isto, pode-se citar o avanço do agronegócio, do desmatamento, da caça, a poluição e as mudanças climáticas como fatores que resultam em pressões aos ambientes florestais e aos recursos hídricos e geram desequilíbrios ambientais. Uma das consequências destas pressões é a intensificação na interação entre o ser humano e animais silvestres, que podem ser vetores de doenças e,

portanto, configurar risco de saúde pública (ANTUNES, 2020).

Neste contexto, as comunidades microbianas estão entre os grupos mais afetados por estes impactos antrópicos, porém pouco destaque tem sido dado a elas (MELLONI, 2007). Em ambientes de solo, por exemplo, a variabilidade genética é uma característica importante para a manutenção dos serviços ecossistêmicos.

O mau uso dos solos tem sido citado como um dos principais impactos antrópicos. Em áreas submetidas a regimes agrícolas, sobretudo monoculturas, por exemplo, verifica-se uma tendência de homogeneização das comunidades microbianas do solo (RODRIGUES et al., 2013; GOSS-SOUZA et al., 2017). Além disso, a compactação e a redução da espessura do solo, causada especialmente pela atividade agrícola, aumenta os processos erosivos, permitindo a dispersão de sedimentos, fertilizantes e agroquímicos pelos cursos d'água, o que pode acarretar eutrofização e assoreamento que comprometem as características físicas, químicas e biológicas de corpos hídricos. (JOVINO et al., 2022).

Nesta perspectiva, manguezais são ecossistemas costeiros situados em zonas de transição entre rio e mar, os estuários, e são determinados por uma vegetação típica que ocorre exclusivamente nestas áreas. Suas características físico-químicas são variáveis, sobretudo em decorrência da maré (PALIT et al., 2022).

O estado avançado de degradação destes ecossistemas foi alertado pela União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN) e de fato no Brasil, estas regiões estuarinas, compostas por vegetação típica, são áreas protegidas pelo Sistema Nacional de Unidades de Conservação (SNUC), instituído pela Lei nº 9.985/00. No entanto, a destruição e fragmentação de habitat, a poluição e as mudanças climáticas têm sido grandes ameaças a estes ecossistemas. A agricultura e a aquicultura são as atividades antrópicas mais impactantes (GONÇALVES et al., 2022; PALIT et al., 2022).

A necessidade de conservação dos ecossistemas de manguezais ultrapassa o valor intrínseco de sua biodiversidade. Diversos serviços ecossistêmicos são fornecidos em regiões de manguezais, tais como ciclagem de nutrientes, suporte alimentar e retenção de compostos tóxicos. Além disso, manguezais são citados como grandes sumidouros de carbono (ANDREOTE et al., 2012).

## **b. Resistência microbiana**

Dentre os problemas emergentes desencadeados pelos impactos antrópicos estão a resistência a agentes microbianos e as mudanças climáticas. Estes problemas podem estar correlacionados, uma vez que as mudanças climáticas podem acelerar a dispersão de vetores de doenças (HARRING; KROCKOW, 2021).

É fato que desde que foi deflagrada a pandemia de COVID-19, cuja origem está relacionada a causas ambientais, tem sido relatado um aumento no número de co-infecções bacterianas e fúngicas em pacientes contaminados pelo SARS-CoV-2 (HENDAUS; JOMHA, 2020). Este aumento deve-se ao enfraquecimento do sistema imunológico destes pacientes e ao tempo prolongado de exposição a ambientes hospitalares contaminados.

O acréscimo na utilização de antimicrobianos para o tratamento destas infecções tem preocupado especialistas (SØGAARD *et al.*, 2021). Isso se deve ao fato de que o uso continuado e irrestrito de antibióticos e antifúngicos gera uma pressão para a seleção de microrganismos resistentes (LOUREIRO *et al.*, 2016).

Adicionalmente, o uso desregulado de antimicrobianos tem sido uma prática recorrente na pecuária, aquicultura (RIVA; PASTOR; SILVA, 2018) e agricultura (BASTOS *et al.*, 2021). Em geral, as drogas utilizadas por humanos e animais apresentam os mesmos princípios ativos, de modo que é possível observar o fenômeno de resistência cruzada, em que microrganismos resistentes a antimicrobianos são selecionados no organismo animal, mas podem contaminar humanos, e vice-versa (RIVA; PASTOR; SILVA, 2018). Partindo deste pressuposto, estima-se que 80% dos antibióticos utilizados nos Estados Unidos sejam destinados à pecuária e à aquicultura, sendo que 70% destes são de classes utilizadas na medicina humana (MARTIN; THOTTATHIL; NEWMAN, 2015). Infelizmente, esta é uma tendência mundial.

A intensificação desta situação levou a Organização Mundial da Saúde (OMS) a emitir um alerta acerca da emergência de uma pandemia de bactérias resistentes a antibióticos. Deste modo, é recomendada a vigilância destes organismos resistentes, sobretudo os mais associados ao fenômeno da multirresistência (resistência a vários antibióticos potentes, o que dificulta o tratamento dos pacientes portadores destas infecções). O acrônimo ESKAPE expressa os organismos prioritários para vigilância: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter*

*baumanni*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp.

Vale ressaltar, além disso, que a liberação de resíduos de antibióticos pode interferir, inclusive, em funções ecossistêmicas dos grupos microbianos de um ambiente. Isto pode acontecer, por exemplo, a partir da inibição da ciclagem de nutrientes, devido à ação dos antibióticos sobre as comunidades bacterianas de um ambiente, ou da interrupção de processos naturais de degradação de compostos poluentes (OHORE et al., 2021).

#### 04. Antimicrobianos

Medicamentos antimicrobianos, dentre os quais estão os antibióticos, atuam no combate a infecções originadas por bactérias ou fungos. Eles podem ser isolados a partir de metabólitos secundários de alguns organismos, como plantas ou fungos, ou desenvolvidos sinteticamente (MACHADO et al., 2020).

Nesta dissertação, serão priorizados os antimicrobianos com ação antibacteriana. Deste modo, a classificação destes medicamentos varia de acordo com sua atuação, que pode envolver a inibição da síntese da parede celular bacteriana ou de sua membrana plasmática, o bloqueio da regulação da expressão gênica ou da síntese de DNA, processos que impedem a sobrevivência bacteriana (CASTRO; CASTRO; LIMA, 2021).

Pode-se dizer que os antibióticos surgiram de fato enquanto classe de medicamentos em 1928, com os estudos do médico escocês Alexander Fleming, através da descoberta da penicilina, metabólito de um fungo capaz de inibir o crescimento bacteriano (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). A penicilina começou a ser produzida em larga escala a partir da década de 1940 e a partir de então, várias outras classes de antibióticos têm sido descobertas e sintetizadas. Seu uso para o tratamento de doenças foi uma das causas para o aumento da expectativa de vida das populações humanas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Com o avanço das pesquisas em antibióticos, várias classes destes medicamentos, com diferentes mecanismos de ação, têm sido desenvolvidas. Atualmente, as penicilinas figuram entre os antibióticos mais utilizados, assim como as cefalosporinas (ambas pertencentes ao grupo dos  $\beta$ -lactâmicos), tetraciclina e macrolídeos (LOUREIRO et al., 2016). As propriedades destes medicamentos estão descritas no Quadro 1.

**Quadro 1** - Classes de antibióticos e seus mecanismos de ação

<b>Antibióticos</b>	<b>Mecanismo de ação</b>
Beta-lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos)	Inibição da síntese da parede celular
Vancomicina e teicoplanina	Inibição da síntese de glicopeptídeos
Quinolonas	Inibição das enzimas DNA-girase e topoisomerase IV
Macrolídeos, cloranfenícois, aminoglicosídeos, tetraciclina	Inibição da síntese de proteínas
Sulfonamidas	Inibição de vias metabólicas
Polimixinas	Rompimento da estrutura da membrana bacteriana

**Fonte:** SANTOS, 2022. Informações extraídas e adaptadas a partir dos trabalhos publicados por Olmedo (2016) e Loureiro (2016).

### 05. *Genética microbiana*

O DNA de um organismo contém toda sua informação genética, que é traduzida em proteínas cujas funções resultam em um fenótipo. Os genes são fragmentos de DNA que codificam propriedades potenciais de um indivíduo, mas nem sempre são expressos na forma de proteínas que modulam as atividades metabólicas e compõem a estrutura desses organismos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Nos organismos eucariotos, os genes estão organizados em um ou mais cromossomos. As bactérias, seres procariontes, no entanto, apresentam um único cromossomo circular e podem também conter plasmídeos, que são fragmentos circulares de DNA que carregam genes não essenciais para o crescimento da célula em condições normais e se replicam de modo independente (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Durante a reprodução de eucariotos e procariontes, no processo de duplicação do material genético, é possível que ocorram erros que poderão resultar em alteração da sequência de bases que compõem os genes. Esta alteração é denominada mutação e, como os genes determinam as proteínas sintetizadas por cada ser vivo, uma ou mais mutações podem resultar na modificação da expressão de um gene. Em termos gerais, uma mutação pode resultar na alteração de determinada(s) característica(s) de um indivíduo (LOUREIRO *et al.*, 2016).

É verdade que algumas mutações não implicam em modificação nas proteínas codificadas por um gene. De todo modo, cabe salientar que elas ocorrem ao acaso ou podem ser induzidas de forma direta ou indireta, através de agentes mutagênicos, como radiação ou produtos químicos (LIMA *et al.* 2017).

Mutações aleatórias podem conferir resistência a diversas pressões ambientais às quais os microrganismos estão submetidos. Deste modo, tanto na microbiota humana, quanto na ambiental, os antibacterianos e antifúngicos naturais ou sintéticos podem contribuir ativamente para a seleção de genes que conferem resistência a estas substâncias, os ARGs (Antibiotic Resistance Genes) e que passarão a prevalecer em uma população (LIMA *et al.*, 2017; LOUREIRO *et al.*, 2016).

Os mecanismos de resistência bacteriana podem variar desde a modificação da composição da membrana celular, até a síntese de enzimas com função ativa em antibióticos ou por meio de bombas de efluxo (LIMA *et al.*, 2017). Algumas bactérias, por exemplo, desenvolveram genes que codificam enzimas capazes de degradar antibióticos beta-lactâmicos. Bactérias resistentes à fluoroquinolona podem possuir mutações na DNA-girase ou na topoisomerase IV, o que impede a ação deste medicamento, que age diretamente nestas enzimas (ANTONIO *et al.*, 2009). Estes e outros mecanismos podem ser intrínsecos à bactéria, quando são adquiridos por mutação ou selecionados, ou obtidos através de diferentes processos de transferência lateral de genes: transformação, transdução, conjugação ou transposição (MAZEL, 2006; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012; LIMA *et al.*, 2017).

Por fim, é necessário salientar que genes de resistência bacteriana podem ser detectados através da análise molecular de amostras ambientais (HUIJBERS; FLACH; LARSSON, 2019). Deste modo, os resíduos de atividades humanas, quando liberados no ambiente sem tratamento adequado, podem contaminar corpos hídricos, como rios, córregos e oceanos. Neste sentido, a água destaca-se como um meio de dispersão destes genes de resistência e como a via pela qual estes genes podem ser incorporados (CASTRO; CASTRO; LIMA; 2021). Nesta perspectiva, uma problemática preocupante é o fenômeno da multirresistência que bactérias podem desenvolver a partir da incorporação de diferentes mecanismos de resistência a antibióticos. Os elementos genéticos móveis (Mobile Genetic Elements, ou MGEs, em inglês) são as maiores fontes destes genes (MCMILLIAN *et al.*, 2019).

Alguns ARGs detectados em estudos ambientais no Brasil, assim como a classe de

antibióticos às quais eles conferem resistência e seu mecanismo de ação, estão listados no Quadro 2.

**Quadro 2** - Genes de resistência antimicrobiana frequentemente encontrados

Genes	Antibióticos aos quais conferem resistência	Mecanismo de ação
<i>tetA, tetB, tetC</i>	Tetraciclina	Ativação de bombas de efluxo
<i>sul1, sul2, sul3</i>	Sulfonamidas	Síntese de enzimas insensíveis ao antimicrobiano
<i>blaSHV, blaTEM, blaCTX-M-2, bla CTX-M, bla CTX M-I</i>	b-lactâmicos	Hidrólise do anel $\beta$ -lactâmicos de antibióticos de espectro estendido
<i>qnrA, qnrB, qnrS</i>	Quinolonas	Proteção da região alvo das quinolonas na DNA-girase

**Fonte** - SANTOS, 2022. Informações extraídas e adaptadas a partir dos trabalhos de Almeida (2011), Sousa (2014), Sant'Anna et al. (2021), Olmedo (2016) e Kampouris (2021).

Em *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* e *Escherichia coli* frequentemente são detectados ARGs (LIMA; BENJAMIM; SANTOS, 2017; CHAGAS, 2011; BALLABEN, 2019), o que indica associação destas bactérias patogênicas com o fenômeno da multirresistência a antibióticos, conseqüentemente levando à dificuldade de tratamento clínico e acarretando em problemas de saúde pública.

#### 06. Uma abordagem integrada: A Saúde Única

O avanço da biologia molecular permitiu o incremento das investigações ecológicas através da análise do RNA ou DNA dos organismos que compõem um ecossistema. Embora ainda ascendente, este novo campo de estudos permite uma visão abrangente dos sistemas ecológicos, possibilitando análises de organismos até então negligenciados pela Ecologia, como bactérias, fungos e vírus.

Com os recentes surtos de várias doenças, desencadeados, principalmente, por ações humanas, tais como desmatamento, caça e mudanças climáticas, torna-se mais do que necessária uma abordagem ecológica dos microrganismos patogênicos. Neste sentido, pode-se considerar esta problemática sob a perspectiva de Saúde Única, ou One Health, que considera que a saúde humana está ligada à saúde animal e ambiental

(LIMONGI e OLIVEIRA, 2020).

A pandemia de COVID-19 impulsionou o termo Saúde Única, que tem sido cada vez mais disseminado nos meios acadêmicos, e abarca várias áreas do conhecimento, incluindo políticas públicas de promoção de saúde e políticas ambientais (LIMONGI e OLIVEIRA, 2020). Assim, através desta abordagem, pode-se obter uma melhor compreensão dos mecanismos que originaram surtos de doenças e de seus caminhos futuros, assim como tem sido feito com o vírus SARS-CoV-2, causador da covid-19 (EL ZOWALATY; JÄRHULT, 2020).

Avaliações do material genético extraído a partir de amostras ambientais, o eDNA, têm sido amplamente aplicadas em estudos ecológicos (YOCCOZ, 2012). Através deste arcabouço de métodos, é possível identificar uma ampla gama de organismos que atuam em um ecossistema, inclusive os patogênicos (BASS *et al.*, 2015). Deste modo, a vigilância ambiental em saúde pode ser empregada para identificar qualquer mudança no ambiente que possa interferir na saúde humana. Através desta estratégia, é possível subsidiar o desenvolvimento de políticas públicas capazes de mitigar os efeitos antrópicos sobre a diversidade, o que contribuirá para a manutenção da saúde humana, animal e do ambiente (BEZERRA, 2017).

Análises de eDNA têm como vantagens o fato de não requererem a atuação de comitês de ética, o custo relativamente baixo e os resultados rápidos (MAINARDI; BIDOIA, 2021), o que são fatores essenciais para a adição desta estratégia às políticas de saúde pública até então vigentes. Salienta-se que iniciativas de vigilância ambiental têm sido empregadas em algumas regiões do país, mas ainda é necessário estimular sua expansão, para que sejam testadas e definidas novas metodologias que forneçam dados auxiliares para a orientação de medidas que previnam o contágio por patógenos e adoecimento da população (SOUZA *et al.*, 2020).

#### 07. *Análises moleculares da microbiota ambiental*

Convencionalmente, a estimativa de bactérias em amostras de solo, água ou sedimentos é geralmente feita através da contagem em placas em meios de cultura, mas este número pode ser subestimado (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Porém, outras técnicas têm sido aplicadas para verificar a composição das comunidades microbianas

nos ecossistemas através da vigilância ambiental. Estes métodos incluem o sequenciamento genético, a metagenômica, a metatranscriptômica, a cultura de células, técnicas de PCR e qPCR, entre outras (BASS *et al.*, 2015).

A análise do material genético seriam extremamente dificultadas sem o advento da técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction). Através desta técnica, é possível amplificar regiões alvo do DNA, de modo que se possa identificar genes que determinam uma função ou um grupo de organismos. Adicionalmente, a qPCR (quantitative PCR), é uma técnica que permite estimar a quantidade de DNA presente em uma amostra. Uma alternativa muito utilizada tem sido a extração do RNA ambiental para quantificação via qPCR, através da geração de uma fita de DNA complementar (cDNA) (FREELAND, 2020).

Os marcadores moleculares, que são sequências de DNA específicas, permitem o estudo de um organismo-alvo. O DNA mitocondrial é um dos marcadores mais disseminados e é frequentemente utilizado em análises filogenéticas e estudos evolutivos, devido ao seu caráter conservado e pequeno compacto, em relação ao DNA nuclear (BEVILAQUA, 2018).

Outro marcador muito utilizado é o DNA barcode, ou DNA código de barras, que é caracterizado pela aplicação de primers universais, de tamanho pequeno e padronizado, e é geralmente utilizado em estudos morfológicos (BEVILAQUA, 2018).

O sequenciamento do DNA também é uma técnica bastante utilizada para estudos moleculares. Desenvolvido por Frederick Sanger, esta técnica envolve a utilização da enzima DNA polimerase, uma sequência iniciadora (primer) e nucleotídeos simples para a síntese de fitas complementares. Os fragmentos de DNA sintetizados são separados por eletroforese e analisados para a verificação da sequência (FREELAND, 2020).

No contexto da vigilância em saúde, o sequenciamento de DNA em amostras ambientais pode propiciar a detecção de patógenos importantes para a medicina e seus mecanismos de resistência, rastrear a origem destes genes e assim entender sua epidemiologia, de modo a fornecer dados capazes de subsidiar medidas para o controle das infecções causadas por estes organismos (EYRE, 2022; MITCHELL *et al.*, 2022).

Com o avanço das técnicas de biologia molecular, os estudos mais recentes têm utilizado sequenciamento de nova geração (NGS) para o estudo do genoma de um organismo, gerando, de forma mais rápida, uma ampla quantidade de dados (COSTA,

2019). A partir desta técnica de sequenciamento, é possível realizar a metagenômica, uma estratégia de pesquisa que permite analisar um aglomerado de genes e suas relações em determinada amostra, transcendendo o estudo de um único organismo (Nacional Research Council, 2007). Tal característica torna esta estratégia ideal para o estudo das comunidades microbianas nos ecossistemas, uma vez que estas estão intrinsecamente relacionadas e, como já citado, são interdependentes.

Dentre os filos mais abundantemente detectados nestes ecossistemas estão Proteobacteria, Firmicutes, Chloroflexi, Planctomycetes, Actinobacteria e Acidobacteria. No entanto, a frequência relativa destes grupos é distinta, e mesmo fatores pontuais como contaminação e o fato do ambiente ser pristino não permitem uma inferência exata acerca da frequência relativa de cada grupo observado, como indica um estudo comparativo realizado por Palit (2022). Deste modo, a composição da microbiota associada a sedimentos de mangues então depende, além de fatores antropogênicos, de fatores biogeográficos e ecológicos, incluindo a presença de compostos orgânicos e inorgânicos nos sedimentos e a vegetação (ANDREOTE, 2012; PALIT et al., 2022; NIZAM, 2022).

Por fim, a resistência a antimicrobianos é tradicionalmente voltada à pesquisa clínica. Entretanto, a análise sistemática de bactérias ambientais permite o monitoramento de genes de resistência antes mesmo de estes representarem riscos efetivos à saúde da população humana. Assim, o reconhecimento de reservatórios naturais de genes de resistência é importante para a elaboração de estratégias de prevenção de infecções resistentes. A escolha do eDNA é dependente do objetivo da pesquisa. Dados moleculares têm sido aplicados para estudos da biodiversidade, informações de saúde pública, monitorar a saúde do ecossistema, investigar a segurança alimentar, entre outras funções, inclusive para monitorar a pandemia de covid-19 (LIGGINS et al., 2022). Adicionalmente, é preciso ter em mente que o padrão de distribuição destes organismos pode variar de acordo com várias condições ambientais, como salinidade, pH e concentração de nutrientes (SILVA, 2013). Desta maneira, as perspectivas para estudos envolvendo a Ecologia Molecular são cada vez mais promissoras.

## REFERÊNCIAS (DO REFERENCIAL TEÓRICO)

ANDREOTE, F et al. The Microbiome of Brazilian Mangrove Sediments as Revealed by Metagenomics. *PLOS ONE*, 2012.

ALMEIDA, Nyanne. **Detecção de genes bla em bactérias produtoras de ESBL isoladas de pacientes com doenças hematológicas**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação Multidisciplinar em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, 103 p, 2011.

ANTONIO, Nayara; OLIVEIRA, Amanda; CANESINI, Renato; ROCHA, Jessé; PEREIRA, Rose. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n. 12, 2009.

ANTUNES, Paulo de Bessa. Ecologia e pandemia. **Cadernos de Direito e Políticas Públicas**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 2–18, 2020.

BALLABEN, Anelise. **Estudo genético da resistência aos antibióticos beta-lactâmicos, quinolonas e aminoglicosídeos em bactérias isoladas de pacientes com suspeita de meningite no Estado de São Paulo**. Tese (Doutorado em Ciências) - Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia, Ribeirão Preto, 2019.

BASS, David *et al.* Diverse Applications of Environmental DNA Methods in Parasitology. **Trends in Parasitology**, [s. l.], v. 31, n. 10, p. 499–513, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.06.013>.

BASTOS, Rafael; ROSSATO, Luana; GOLDMAN, Gustavo; SANTOS, Daniel. Fungicid effects on human fungal pathogens: cross-resistance to medical drugs and beyond. **PLOS Pathogens**, v. 17, n. 12, 2021.

BEVILAQUA, Dannel. **Detecção e distribuição temporal de espécies de peixes utilizando dna ambiental (DNAa) em lagos de várzea na Amazônia central**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 154 p, 2018.

BEZERRA, Anselmo. Vigilância em Saúde no Brasil: heranças e desafios. **Saúde e Sociedade**, v. 26, n. 4, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0104-12902017170093>.

CASTRO, Ícaro; CASTRO, Lucas; LIMA, Alyne. Bactérias resistentes a antibióticos e o meio aquático: efeito na produção animal. **Ciência Animal**, v. 31, n. 3, 2021.

CHAGAS, Tiago. **Detecção de bactérias multirresistentes aos antimicrobianos em esgoto hospitalar no Rio de Janeiro**. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 147 p, 2011.

COSTA, Mahysa. **Quando o petróleo empobrece**. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Evolução) - Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 103 p, 2019.

EL ZOWALATY, Mohamed E.; JÄRHULT, Josef D. From SARS to COVID-19: A previously unknown SARS- related coronavirus (SARS-CoV-2) of pandemic potential infecting humans

– Call for a One Health approach. **One Health**, [s. l.], v. 9, n. February, p. 100124, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2020.100124>

EYRE, D. Infection prevention and control insights from a decade of pathogen whole-genome sequencing. **Journal of Hospital Infection**, v. 122, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2022.01.024>.

FREELAND, Joanna. **Molecular Ecology**. 3 ed. John Wiley & Sons Ltd, 2020.

GILLINGS, Michael. Integrons: Pest, Present and Future. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 78, n. 2, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1128/MMBR.00056-13>.

GONÇALVES, M. V. P et al. Biogeoquímica e conservação dos bosques de mangue da APA Tinharé-Boipeba, Baixo Sul da Bahia (Brasil): metais-traços em sedimentos e folhas da *Laguncularia racemosa* (L.) C. F. Gaertn (Combretaceae). **Concilium**, v. 22, n. 5, 214–239. 2022, DOI: <https://doi.org/10.53660/CLM-419-522>

GOSS-SOUZA, D; MENDES, L; BORGES, C; BARETTA, D; TSAI, S; RODRIGUES, J. Soil microbial community dynamics and assembly under long-term land use change. **FEMS Microbiology Ecology**, 93, 2017.

GRAY, N; HEAD, I. Microbial Ecology. In: JØRGENSEN, FATH, Brian. **Encyclopedia of Ecology**. Academic Press, 2002, p. 2357-2368.

HAYATSU, M; TAGO, K; SAITO, M. Various players in the nitrogen cycle: Diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification. **Soil Science Plant Nutrition**, 2008.

HARRING, Niklas; KROCKOW, Eva. The social dilemmas of climate change and antibiotic resistance: an analytic comparison and discussion of policy implications. **Humanities and Social Sciences Communications**, v. 8, n. 125, 2021. HENDAUS, Mohamed A.; JOMHA, Fatima A. Covid-19 induced superimposed bacterial infection. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, [s. l.], v. 0, n. 0, p. 1–7, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1772110>

HOLLIS, A; AHMED, Z. Preserving antibiotics, rationally. **N Engl J Med**, v. 369, n. 26; p. 2474-2476, 2013. DOI: 10.1056/NEJMp1311479.

HUIJBERS, Patricia M.C.; FLACH, Carl Fredrik; LARSSON, D. G. Joakim. A conceptual framework for the environmental surveillance of antibiotics and antibiotic resistance. **Environment International**, v. 130, p. 104880, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.05.074>

JOVINO, E et al. Impactos do uso e cobertura do solo na produção de sedimentos em área de manancial peri-urbano tropical. **Sociedade & Natureza**, v. 34, 2022. DOI: <https://doi.org/10.14393/SN-v34-2022-64640>

KAMPOURIS, I; AGRAWAL, S; ORSCHLER, L; CACACE, D; KUNZE, S; BERENDONK, T; KLÜMPER, U. Antibiotic resistance gene load and irrigation intensity determine the impact of wastewater irrigation on antimicrobial resistance in the soil microbiome. **Water Research**, v. 193, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.116818>.

LIGGINS, Libby et al. The future of molecular ecology in Aotearoa New Zealand: an early career perspective. **Journal of the Royal Society of New Zealand**, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1080/03036758.2022.2097709>

LIMA, C; BENJAMIM, S; SANTOS, R. Mecanismos de resistência bacteriana frente a fármacos: uma revisão. **CuidArt Enfermagem**, v. 11, n. 1, p. 105-116, 2017.

LIMONGI, Jean; OLIVEIRA, Stefan. COVID-19 e a abordagem One Health (Saúde Única): uma revisão sistemática. **Vigilância Sanitária em Debate**, v. 8, n. 3, 139-149, 2020.

LOUREIRO, João; ROQUE, Fátima; RODRIGUES, António; HERDEIRO, Maria; RAMALHEIRA, Elmano. O uso de antibióticos e a resistência bacteriana: breves notas sobre sua evolução. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, [s. l.], v. 34, n. 1, p. 77–84, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rpsp.2015.11.003>

MA, Ziwen; BAI, Junhong; XIAO, Rong; WANG, Chen, CUI, Yuan; WU, Jiang, XU, Jin. Incorporating soil aggregate-associated indicators into evaluating ecological responses of degraded estuarine wetlands to freshwater replenishment at different intensity: A case study from Yellow River Delta, China. **Ecological Indicators**, v. 121, 2021.

MACHADO, Elayne et al., Detecção e quantificação de bactérias resistentes aos antibióticos ampicilina e cloranfenicol em estações de tratamento de esgoto doméstico. **Eng. Sanit. Ambient.** v. 25, n. 6, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1413-4152202020180001>

MAINARDI, Pedro Henrique; BIDOIA, Ederio Dino. A importância do monitoramento do SARS-CoV-2 em redes de esgoto e estações de tratamento de águas residuárias. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 4, n. 2, p. 5051–5066, 2021. DOI:

<https://doi.org/10.34119/bjhrv4n2-083>MARTIN, Michael; THOTTATHIL, Sapna;

NEWMAN, Thomas. Antibiotics Overuse in Animal Agriculture: A Call to Action for Health Care Providers. **American Journal of Public Health**, v. 105, 2015. DOI: <https://doi.org/10.2105/AJPH.2015.302870>

MATOS, Eliza; DURRER, Ademir; ANDREOTE, Fernando. Ecologia Microbiana. In: CARDOSO, Elke; ANDREOTE, Fernando. **Microbiologia do Solo**. 2 ed. Piracicaba: ESALQ, 2016, 221 p.

MAZEL, Didier. Integrins: agents of bacterial evolution. **Nature Reviews Microbiology**, n. 4, p. 608-620, 2006.

MCMILLAN, Elizabeth et al. Antimicrobial Resistance Genes, Cassettes, and Plasmids Present in *Salmonella enterica* Associated With United States Food Animals. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00832>

MELLONI, Rogério. Quantificação Microbiana da Qualidade do Solo. In: SILVEIRA, Adriana; FREITAS, Sueli. **Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2007, 312 p.

MITCHELL, P et al. Multi-laboratory evaluation of the Illumina iSeq platform for whole genome sequencing of *Salmonella*, *Escherichia coli* and *Listeria*. **Microb Genom**, v. 8, n. 2, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000717>

MORANGE, Michel. **A History of Molecular Biology**. Cambridge, Massachusetts e Londres: Harvard University Press, 1998.

National Research Council. 2007. **The New Science of Metagenomics: Revealing the**

**Secrets of Our Microbial Planet.** Washington, DC: The National Academies Press. DOI: <https://doi.org/10.17226/11902>.

NELSON, M; MARTINY, A; MARTINY, J. Global biogeography of microbial nitrogen-cycling traits in soil. **PNAS**, 113, 8033-8040, 2016.

NIZAM, A; MEERA, S; KUMAR, A. Genetic and molecular mechanisms underlying mangrove adaptations to intertidal environments. **iScience**, v. 25, 2022.

OHORE, Okugbe et al. Ecological impact of antibiotics on bioremediation performance of constructed wetlands: Microbial and plant dynamics, and potential antibiotic resistance genes hotspots. **Journal of Hazardous Materials**, v. 424, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127495>.

OLMEDO, Lara. **Caracterização dos mecanismos de resistência aos antimicrobianos em cepas de Escherichia coli recuperadas de mariscos** (Dissertação - Mestrado em Microbiologia) - Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

PADILLA-GARCÍA, Cinthia; CAMACHO-SÁNCHEZ, Fátima; REYES-LÓPEZ, Miguel. *Metabarcoding* de DNA ambiental: un enfoque para el seguimiento de la biodiversidad. **CienciaUAT**, v. 16, n. 1, 2021.

PALIT, K., RATH, S., CHATTERJEE, S. et al. Microbial diversity and ecological interactions of microorganisms in the mangrove ecosystem: Threats, vulnerability, and adaptations. **Environ Sci Pollut Res**, v. 29, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-022-19048-7>

PANIKOV, Nikolai. **Handbook of Environmental Engineering**. Totowa: The Humana Press, Inc, 2010.

PELCZAR, Michael. **Microbiologia Conceitos e Aplicações**. 2 ed. São Paulo: Makron Books, 524 p, 1996.

RIVA, Mayara; PASTOR, Felipe; SILVA, Maria. Uso indiscriminado de medicamentos veterinários na pecuária. In: TRIVILIN, Leonardo; CARDOSO, Leonardo; SILVA, Maria; MENDONÇA, Pedro. **Tópicos Especiais em Ciência Animal VII**. 1 ed. Alegre: CAUFES, 2018, 125-142 p.

RODRIGUES, J; PELLIZARI, V; MUELLER, R; BAEK, K; JESUS, E; PAULA, F; MIRZA,

B; HAMAOU, J; TSAI, S; FEIGL, B; TIEDJE, J; BOHANNAN, B; NÜSSLEIN, K. Conversion of the Amazon rainforest to agriculture results in biotic homogenization of soil bacterial communities. **PNAS**, 110, p. 988-992, 2013.

ROWE, G; SWEET, M; B, Trevor. **An introduction to Molecular Ecology**. 3 ed. Oxford University Press, 2017.

SANT'ANNA, G; CUNHA, J. M. F.; NUNES, J. F.; AVILA, I. A. F.; GONÇALVES, J. V. S.; FERREIRA, P. F. A.; SOUZA, M. M. S.; COELHO, S. M. O.; COELHO, I. S.. Antimicrobial resistance genes and bacterial diversity in sediments of Guandu River, Brazil. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v.12, n.4, p.116-123, 2021. DOI: <http://doi.org/10.6008/CBPC2179-6858.2021.004.0012>

SILVA, Uaska. **Análise metagenômica da microbiota de ambientes aquáticos do estado do Rio Grande do Norte - Brasil**. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Programa Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, 113 p. 2013.

SØGAARD, K. *et al.* Community-acquired and hospital-acquired respiratory tract infection and bloodstream infection in patients hospitalized with COVID-19 pneumonia. **Journal of Intensive Care**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 1–10, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40560-021-00526-y>

SOUSA, Rafaela. **Pesquisa de genes de resistência a quinolonas em bacilos Gram negativos de origem clínica e ambiental**. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 102 p. 2014.

SOUZA, R; CANTÃO, M; VASCONCELOS, A; NOGUEIRA, M; HUNGRIA, M. Soil metagenomics reveals differences under conventional and no-tillage with crop rotation or succession. **Applied Soil Ecology**, v. 72, p.49-61, 2013.

SOUZA, Luís Paulo Souza *et al.* Presença do novo coronavírus (SARS-CoV-2) nos esgotos sanitários: apontamentos para ações complementares de vigilância à saúde em tempos de pandemia. **Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 132–138, 2020. DOI: <https://doi.org/10.22239/2317-269x.01624>

TORTORA, G.; FUNKE, Berdell; CASE, C. **Microbiologia**. 10 Ed. Artmed, 2012.

Van den BERG, N.I., MACHADO, D., SANTOS, S. *et al.* Ecological modelling approaches

for predicting emergent properties in microbial communities. **Nat Ecol Evol**, v. 6, p. 855–865 (2022). DOI: <https://doi.org/10.1038/s41559-022-01746-7>

YOCOOZ, N. The future of environmental DNA in ecology. **Molecular Ecology**, v. 21, p. 2031-2038, 2012.

ZILLI, J; RUMJANEK, N; XAVIER, G; COUTINHO, H; NEVES, M. Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 20, n. 3, p. 391-411, 2003.

## **INFORMAÇÕES SOBRE A DISSERTAÇÃO**

Esta dissertação organiza-se conforme determinado pelo Regimento do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução da Universidade Estadual de Feira de Santana e é constituída pelo Referencial Teórico, contendo as principais exposições relacionadas ao tema discutido, e pelo Capítulo 1 - Diversidade bacteriana como indicadora de qualidade ambiental em solos estuarinos no nordeste brasileiro: um enfoque em resistência bacteriana, que será traduzido e submetido para publicação na revista *Environmental Health Perspectives*.

## CAPÍTULO 1

### COMUNIDADES BACTERIANAS EM SEDIMENTOS ESTUARINOS NO NORDESTE BRASILEIRO: UM ENFOQUE EM RESISTÊNCIA BACTERIANA

Ba. Itana Almeida dos Santos<sup>1</sup>; Dra. Carolina Oliveira Santana<sup>2</sup>; Dr. André Freire Cruz<sup>4</sup>; Dr. Eddy José Francisco de Oliveira<sup>4</sup>

#### RESUMO

Estuários podem conferir uma dimensão generalizada acerca dos efluentes humanos despejados ao longo corpos hídricos. Com o desenvolvimento do estudo do DNA ambiental, pode-se ter uma real dimensão acerca do funcionamento das comunidades microbianas destes ambientes e dos impactos que as atividades antrópicas causam sobre elas. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi comparar a estrutura das comunidades bacterianas em sedimentos de rios em diferentes status de impacto antrópico no município de Valença, Bahia. Para isto, quantificamos os ARGs (genes de resistência antimicrobiana) através da técnica de qPCR e adicionalmente, realizamos o sequenciamento da região 16S rRNA para entender a composição da comunidade bacteriana em cada ambiente. Dentre as amostras analisadas, Guaibim-2 apresentou maior diversidade de ARGs. Guaibim obteve menor diversidade de ARGs. Os filos predominantes em todas as amostras foram Proteobacteria, Actinobacteria e Firmicutes. *Acinetobacter sp*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecium* e *Enterobacter cloacae*, bactérias listadas para vigilância prioritária pela Organização Mundial da Saúde devido a sua associação com multirresistência a antibióticos, foram detectadas em Una e Guaibim-2.

**Palavras-chave:** Conservação, DNA Ambiental, Metagenômica, Resistência Antimicrobiana, Rios Urbanos.

<sup>1</sup> Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução, Universidade Estadual de Feira de Santana

<sup>2</sup> Pós-doutoranda Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução, Universidade Estadual de Feira de Santana

<sup>3</sup> Professor, Kyoto Prefectural University

<sup>4</sup> Professor, Universidade Estadual de Feira de Santana

## ABSTRACT

Estuaries give a generalized dimension about the presence of contaminants for human effluents. The development of molecular techniques allowed the study of environmental DNA, which made possible to know the real dimension about the functioning of the microbial communities and the impacts of human activities on those environments. In this context, the objective of this study is to compare the bacterial communities in river sediments in different anthropic impact status in Valença, Bahia, Brazil. We sequenced the 16S rRNA region to identify the main phyla of bacteria in each environment and qPCR to detect the presence of antibiotic resistance genes (ARGs). Guaibim-2 had a bigger diversity of ARGs. Guaibim has less ARGs diversity. The predominant phyla in all of the samples was Proteobacteria, Actinobacteria and Firmicutes. *Enterococcus faecium*, *Acinetobacter sp*, *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae*, listed bacteria for priority surveillance for World Health Organization, was detected on Una and Guaibim-2.

**Key-words:** Antimicrobial Resistance, Conservation, Environmental DNA, Metagenomics, Urban Rivers.

## INTRODUÇÃO

Manguezais são formações vegetais tolerantes a águas salobras ou salgadas situadas ao longo da costa de regiões tropicais, subtropicais e temperada quente, em áreas de transição entre rio e mar, os estuários (BRYAN-BROWN et al., 2020; SANTOS, 2018). Estes ecossistemas oferecem uma série de serviços ambientais, como a pesca, mariscagem, proteção costeira, proteção contra sedimentação, produção de madeira, indicador de risco ambiental, ecoturismo, acúmulo de carbono, biorremediação através da água, proteção contra intrusão salina no lençol d'água, entre outros (SANTOS, 2018).

No entanto, apesar da importância dos ecossistemas estuarinos, pressões antrópicas exercidas sobre ambientes estuarinos têm sido constantes e afetam o estado de conservação de manguezais de todo o mundo. Estas pressões incluem a poluição, extração da madeira, conversão para agricultura e aquacultura não sustentáveis (OTTONI et al., 2020). Recentemente, as mudanças climáticas têm sido referidas como um fator indissociável ao estudo dos manguezais. Isto porque florestas deste ecossistema são eficientes sequestradoras de carbono e sua conservação pode contribuir para mitigar as mudanças climáticas. Da mesma forma, manguezais são comumente afetados por consequências destas mudanças, como aumento das temperaturas e avanço do nível do mar (ALONGI, 2015).

Formados a partir da deposição de sedimentos que são carregados ao longo do curso do rio, os solos destas regiões estuarinas têm um alto teor de nutrientes, portanto, têm sido descritos como ambientes altamente produtivos (MCLUSKY, ELLIOT, 2010). Estas características ambientais tornam este tipo de formação costeira hotspots de diversidade microbiana (LIU et al., 2019), que possuem alto potencial biotecnológico (DIAS et al., 2017).

A microbiota, isto é, o conjunto de microrganismos de um ecossistema, desempenha importante função na manutenção dos mesmos. Entre estas funções, pode-se citar a decomposição da matéria orgânica, a ciclagem de nutrientes e a formação dos solos (MA et al., 2021). Neste sentido, a diversidade microbiana de solos de manguezais é influenciada por fatores biogeográficos, humanos e pelas relações que os microrganismos estabelecem com outros organismos que compõem este ecossistema (LIU et al., 2019).

Análises da diversidade microbiana ambiental podem constituir importantes bioindicadoras para o estresse ambiental (MELLONI, 2007; ZILLI et al., 2003). Deste modo, diversos estudos têm relacionado maior heterogeneidade da microbiota, ou maior diversidade

de grupos funcionais, à maior qualidade do ambiente (GARRIDO et al., 2014; KARIMI et al., 2017), uma vez que isto confere um dinamismo e maior resiliência, na hipótese de ocorrência de eventos atípicos (MATOS; DURRER; ANDREOTE, 2016).

O estudo do DNA ambiental (eDNA) pode elucidar diversos aspectos estruturais e funcionais acerca das comunidades microbianas de um ecossistema. Através desta abordagem, é possível recolher o material genético de microrganismos diretamente de amostras ambientais, sem necessidade do cultivo dos mesmos, o que forneceria uma amplitude da real dimensão da situação da diversidade microbiana (PADILLA-GARCÍA; CAMACHO-SÁNCHEZ; REYES-LOPES, 2021; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Adicionalmente, a detecção de genes de resistência antimicrobiana (ARGs) por análises moleculares do eDNA têm revelado impactos antrópicos sobre a diversidade bacteriana nos solos (MARANO et al., 2021; BERENDONK et al., 2015). É fato que os ARGs podem ser de ocorrência natural, entretanto, efluentes de sistemas industriais, domésticos ou agropecuários podem configurar uma pressão para a seleção destes genes (MARANO et al., 2021). Isso ocorre porque muitos destes efluentes humanos contém resíduos de antibióticos e/ou os genes de resistência, que podem ser incorporados por bactérias de um ambiente através de processos de transferência lateral de genes como transformação, transdução ou por meio de elementos genéticos móveis, como transposons, integrons ou plasmídeos (GILLINGS; STOKES, 2012).

Nesta perspectiva, a vigilância ambiental emerge como uma estratégia integrada que permite detectar fatores de alteração no ambiente que podem pôr em risco a saúde humana (BEZERRA, 2017). Sua integração às políticas públicas permite a verificação da saúde de um ambiente, o que pode subsidiar a elaboração de estratégias para evitar ou mitigar um possível impacto na saúde humana.

Deste modo, técnicas moleculares têm se mostrado efetivas para o estudo de diversos patógenos. Sua disseminação durante a pandemia de covid-19 foi imprescindível para o rastreio da origem do vírus Sars-Cov-2, para o entendimento de sua virulência e formulação de planos de combate à pandemia (ROBISHAW et al., 2021). Adicionalmente, a aplicação destas técnicas em estudos relacionados à resistência bacteriana tem fornecido dados importantes para compreender os mecanismos de resistência dos patógenos que causam uma série de prejuízos aos sistemas de saúde e à vida humana. Dentre estas técnicas, destacam-se o sequenciamento completo do genoma, a metagenômica (MCARTHUR; TSANG, 2017) e a

qPCR.

No contexto da resistência microbiana e da detecção de impactos ambientais, a vigilância ambiental através da análise do eDNA tem se revelado uma estratégia eficaz para a detecção de genes de resistência a antimicrobianos, metais pesados e outras substâncias tóxicas (MCMILLIAN et al., 2019; LIMA et al., 2017; HUIJIBERS; FLACH; LARSSON, 2019). É

importante salientar que a água é uma das principais vias para a transferência de mecanismos de resistência (CASTRO; CASTRO; LIMA; 2021). Visto isso, genes de resistência microbiana podem ser identificados tanto em sistemas aquáticos, quanto em seus sedimentos.

Deste modo, partindo da problemática “há diferenças na composição das comunidades microbianas em sedimentos estuarinos submetidos a diferentes níveis de impacto antrópico?”, o objetivo geral deste estudo é avaliar a estrutura das comunidades bacterianas em sedimentos estuarinos submetidos a diferentes níveis de impactos antrópicos, através da técnica de sequenciamento de nova geração (NGS) e de qPCR. Os objetivos específicos são: investigar a diversidade microbiana em diferentes ambientes e detectar a presença de ARGs e bactérias patogênicas associadas através de qPCR.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Procedimentos éticos legais

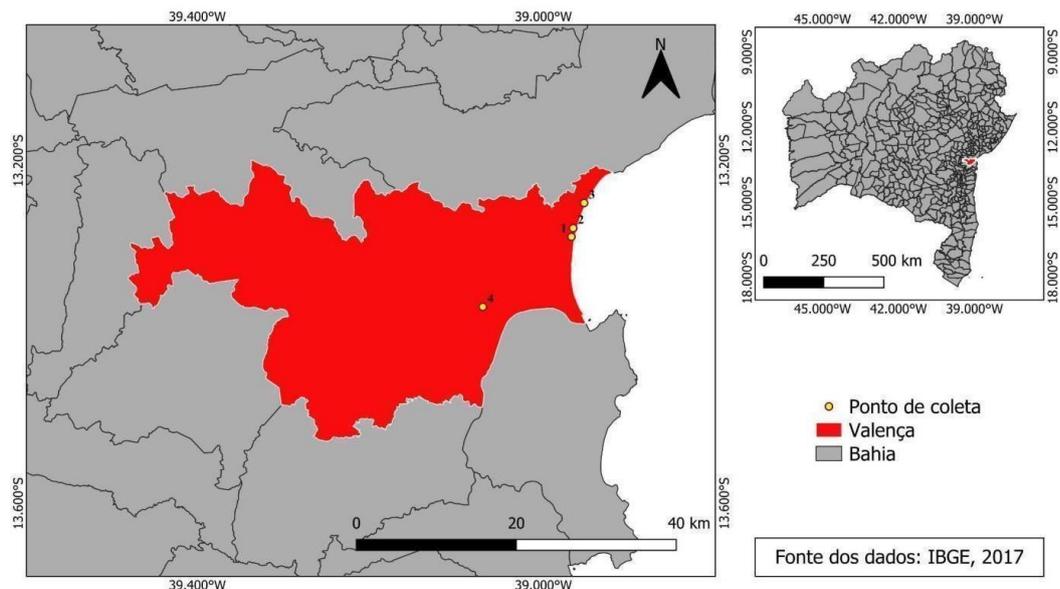
Uma vez que as amostras foram coletadas a partir de locais públicos para fins de estudo da biodiversidade microbiana, não foram necessárias permissões legais ou éticas para a realização deste estudo. O projeto será registrado no SISGEN - Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético em nome do Prof. Dr. Eddy José Francisco de Oliveira.

### Área de amostragem

O município de Valença está situado no baixo-sul da Bahia (Figura 1), em área de Mata Atlântica e pertence ao sistema costeiro marinho (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, 2023). Ainda segundo o IBGE, a população valenciana é de 85.655 pessoas e o município possuía, em 2010, 59,5% de seu território coberto com sistema de esgotamento sanitário adequado.

**Figura 1** - Localização do município de Valença no estado da Bahia

### Localização de Valença, Bahia, Brasil



**Fonte:** SANTOS, 2023.

O município possui altitude média de 50 m que, combinado ao clima tropical quente e úmido, favorece a atuação de processos pedogênicos. Desenvolveu-se ao redor do rio Una, que compõe o sistema estuarino local, e apresenta atividade econômica voltada ao turismo, que se concentra no distrito de Guaibim, a cerca de 14 km do centro da cidade, à pesca, aquicultura e mariscagem e ao transporte fluvial, além de criação de gado e cultura agrícola voltada ao cultivo do dendê (SOUSA, 2015).

O distrito de Guaibim está localizado em uma Área de Proteção Ambiental (APA), que pertence ao grupo de Unidades de Conservação de Manejo Sustentável, que é determinada pela formação dos ecossistemas manguezal, brejo e restinga (SOUSA, 2015; Centro de Recursos Ambientais, 1993). Ele situa-se entre a foz do rio Jequiriçá e o canal de Taperoá, na região costeira de Valença. As características do solo de Guaibim, em relevo levemente inclinado para o mar, permitem uma alta taxa de infiltração, o que resulta em migração das águas subterrâneas no sentido do mar (Centro de Recursos Ambientais, 1993).

Alguns dos principais impactos antrópicos no Rio Una estão relacionados ao transporte de passageiros para as ilhas do Arquipélago de Tinharé (Morro de São Paulo, Gamboa, Boipeba e Garapuá), a aquicultura, desenvolvida nas proximidades, e ao despejo de efluentes de esgoto, como verificado durante as coletas.

O maior fator que contribui para o impacto sobre a APA do Guaibim é a ocupação humana desordenada, que resulta no aterramento de lagoas e impacto na fauna e flora. Além disso, destaca-se a contaminação das águas mananciais, uma vez que o sistema de esgotamento sanitário predominante é o de fossa negra (Centro de Recursos Ambientais, 1993).

### **Amostragem**

Foram feitas duas coletas com intervalo de cinco meses, ambas realizadas no período da manhã, com a temperatura amena, oscilando entre 22 e 24°C. As amostras da primeira coleta foram categorizadas como Tempo 1 e as da segunda coleta foram categorizadas como Tempo 2.

Com o auxílio de uma espátula, foi feita uma amostragem aleatória de até 10cm de profundidade do substrato dos rios nos pontos Guaibim-1 (13°17'27"S, 38°57'54"W), Guaibim-2 (13°16'42"S, 38°57'52"W), Taquari (13°14'59"S, 38°57'13"W), sendo estes três

pontos localizados no distrito de Guaibim e Una (13°22'14''S, 39°04'12''W), na área urbana de Valença (-13°37'19''S, 39°06'57''W). Para as áreas no distrito de Guaibim, foram coletados 7 pontos ao longo de um transecto, com distância média de 3 m entre eles. Para a área de Valença, foram feitas coletas em quatro pontos distintos do rio, em diferentes estados de conservação. O Quadro 1, a seguir, apresenta as características dos locais de coleta.

**Quadro 1** - Características dos locais de amostragem

Ponto de amostragem	Local	Figura	Descrição
Ponto 1	Guaibim-1	Figura 2	Trecho de manguezal situado em zona turística, muito frequentada, que conta com diversos restaurantes e habitações nas proximidades. Como não há sistema de esgotamento sanitário no local, os fluidos gerados nestes estabelecimentos são despejados em fossas escavadas na região. Apresenta grande influência da maré.
Ponto 2	Guaibim-2	Figura 3	Região mais afastada do sistema estuarino, composta por um pequeno rio que se estende por alguns quilômetros até desaguar no mar. Na região, há diversos condomínios residenciais e como o sistema de esgotamento sanitário não abrange este local, os resíduos gerados nestas habitações são descartados em fossas sépticas. A água do rio e a vegetação da região são utilizadas esporadicamente para animais criados nas proximidades, como cavalos e bois. Recentemente, tem sido feito o aterramento e canalização de trechos do rio nesta região para a construção de uma estrada. Não sofre influência da maré.
Ponto 3	Taquari	Figura 4	Manguezal afastado da região turística, em que se observa maior grau de preservação da vegetação natural. A região é afetada primordialmente pelo fluxo de marisqueiros que dependem do extrativismo de recursos locais para a sobrevivência. Sofre influência da maré.
Ponto 4	Una	Figura 5	Rio antropizado que atravessa a cidade de Valença, componente do sistema estuarino. Nos pontos de coleta, a vegetação de mangue foi degradada para a ativação do porto, que apresenta grande fluxo de embarcações, especialmente para o arquipélago de Tinharé, região turística muito frequentada. No local ocorre despejo do esgoto tratado na cidade e há atividade pesqueira na região. Sofre influência da maré.

Fonte: SANTOS, 2023

**Figura 2:** Guaibim-1. Área de ocupação humana nas proximidades de um manguezal, com areia como sedimento predominante, sob o qual pôde-se observar lama.



**Figura 3:** Guaibim-2. Área permeando região de ocupação humana, com presença de vegetação rasteira e argila como sedimento predominante.



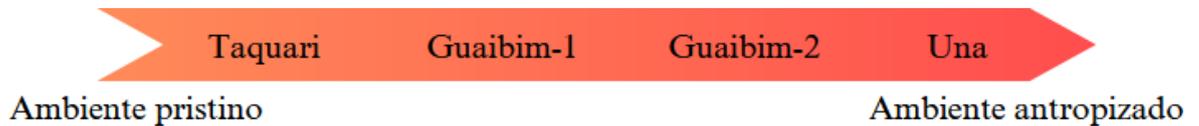
**Figura 4:** Taquari. Manguezal com menor interferência humana. Sedimentos predominantes nos locais de amostragem: silte e matéria orgânica.



**Figura 5:** Una. Zona urbana de transporte fluvial. Sedimento predominante: silte e matéria orgânica.



A Figura 6 melhor indica o gradiente de antropização dos locais de amostragem, construído a partir de dados observacionais.

**Figura 6:** Gradiente de antropização dos locais de amostragem

O material coletado foi homogeneizado em tubos Falcon de 25 ml, identificado, envolvido em papel alumínio para evitar a degradação do DNA e devidamente acondicionado em isopor com gelo durante o transporte, seguindo as recomendações da NeoProspecta. Este material foi congelado à temperatura de  $-4^{\circ}\text{C}$  para posterior análise molecular.

### **Extração de DNA**

A extração do DNA foi realizada com o kit Quick-DNA/RNA<sup>TM</sup> MagBead (Zymo Research), conforme protocolo descrito em anexo. O DNA extraído foi quantificado usando NanoDrop<sup>®</sup> spectrophotometer (ThermoScientific, USA) e foi selecionada para qPCR uma amostra de boa qualidade de cada local (razão A260/280 igual ou superior a 1.6).

### **Seleção de genes e qPCR**

A seleção dos genes de resistência foi realizada conforme a listagem de antibióticos mais utilizados no sistema de saúde brasileiro disponível em literatura (LOUREIRO et al., 2016; OLMEDO, 2016; ALMEIDA, 2011; SOUSA, 2014 e SANT'ANNA et al., 2021) e na informada pela secretaria de saúde da Bahia. Deste modo, foram escolhidos genes que conferem resistência a tetraciclina (*tetA*, *tetB* e *tetE*), sulfonamidas (*sulI*), cloranfenicol (*catA*), quinolonas (*qnrA* e *qnrB*) e antibióticos beta-lactâmicos de amplo espectro (*blaSHV* e *blaTEM*). Na Tabela 1 estão descritos os genes que foram amplificados neste estudo, bem como as sequências dos primers, tamanho em pares de base e sua temperatura de anelamento ( $T_a$ ) em graus celsius.

**Tabela 1** - Genes amplificados, seus respectivos primers e amplicons (pb).

GENE	PRIMER FORWARD	PRIMER REVERSE	pb	Ta	Referência
tetA	GCTACATCCTGCTTGCCTTC	CATAGATCGCCGTGAAGAGG	210	56	Ng et al. (2001)
tetB	TACGTGAATTTATTGCTTCGG	ATACAGCATCCAAAGCGCAC	206	56	Aminov et al (2002)
tetE	AAACCACATCCTCCATACGC	ATACAGCATCCAAAGCGCAC	278	56	Ishida (2010)
sulI	CGGCGTGGGCTACCTGAACG	GCCGATCGCGTGAAGTTCCG	433	60	Kern (2002)
catA	AGTTGCTCAATGTACCTATAACC	TTTCAAGGCATCTGATAAAGAC	293	56	Kern (2002)
tetA	GCTACATCCTGCTTGCCTTC	CATAGATCGCCGTGAAGAGG	210	56	Ng et al. (2001)
blaSHV	GGGTTATTCTTATTTGTCGC	AGCGCGAGAAGCATCCTG	650	56	Ramazanadeh (2010)
blaTEM	ATAAAATTCTTGAAGACGAAA	GACAGTTACCAATGCTTAATC	1080	56	Mabilat (1993)
qnrA	AGAGGATTTCTCACGCCAGG	TGCCAGGCACAGATCTTGAC	580	60	Cattoir (2007)
qnrB	GGMATHGAAATTCGCCACTG	TTTGCYGYCYGCCAGTCGAA	264	56	Cattoir (2007)

Fonte: Santos, 2022. Genes mais utilizados no sistema de saúde, sequências dos primers, tamanho do gene em pares de bases (pb) e temperatura de anelamento (Ta).

Embora não seja frequentemente realizada, a qPCR de genes considerados grandes, com mais de 600 pares de base é sustentada por vários autores, como Bassitta et al. (2022) e Tolosi et al (2021).

Prosseguiu-se com a PCR em tempo real (qPCR) para a detecção dos genes de resistência. Os reagentes utilizados e a concentração utilizada para o mix, com concentração final de 10µl estão dispostos na Tabela 2.

**Tabela 2** - Mix da reação de qPCR

Reagente	µl por reação
PowerUp™ SYBR® Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific, USA)	5
Primer forward (100pmol)	0,5
Primer reverse (100pmol)	0,5
DNA (10ng)	4

Os mixes de qPCR, incluindo dois controles, compostos por 6µl de reagentes da qPCR e 4µl de água livre de nucleases, quatro amostras padrão quantificadas em triplicatas e as amostras de DNA ambiental coletadas no tempo 1 e no tempo 2, também em triplicatas, foram distribuídas em microtubos de 20 µl para a amplificação. Para a construção da curva padrão, foi utilizada uma diluição seriada de um DNA de fita dupla sintético (gBlocks®, IDT) do amplicon 16S rRNA alvo, com a concentração de 1ng/µl. O uso deste tipo de fragmento como padrão pode aumentar a sensibilidade, confiabilidade e o desempenho da quantificação (CONTE et al., 2018). A qPCR foi performada em um termociclador de tempo real BIORAD CFX96 Touch System, de acordo com a seguinte programação: 1 ciclo de 50°C por 2min, 95°C por 2 min, seguido de 45 ciclos de 95°C por 10s e Ta (temperatura de anelamento disposta na Tabela 1) por 40s.

### **Identificação molecular e metagenômica**

Adicionalmente, foi realizado pela Neopropecta Microbiome Technologies (Florianópolis, Santa Catarina, Brasil) o sequenciamento de alto desempenho das regiões V3/V4 do gene 16S rRNA, utilizando-se o primer 341F (CCTACGGGGRSGCAGCAG, WANG; QIAN, 2009) e 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT, CAPORASO et al., 2012).

O DNA foi extraído com o kit Quick-DNA/RNA™ MagBead (Zymo Research, EUA), e quantificado utilizando-se fluorímetro Qubit, com o kit dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen, EUA). Após quantificação, o DNA foi diluído a 0,5 ng/µL. As bibliotecas genômicas foram feitas com kit V2 e sequenciadas com o equipamento MiSeq Sequencing System (Illumina Inc., USA), com 300 ciclos e sequenciamento single-end. As sequências foram analisadas por meio de um pipeline utilizado pela Neopropecta Microbiome Technologies. Sequências com 100% de identidade foram agrupadas em clusters e utilizadas para identificação taxonômica por comparação com bancos de dados de sequências acuradas 16S rRNA (NeoRef, Neopropecta Microbiome Technologies). Sequências com menos de 99% de similaridade com o gene 16S rRNA foram descartadas para análises posteriores. Os resultados serão depositados na base de dados pública GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) como bioprojeto.

## **Bioinformática e análise dos dados**

Os resultados de quantificação dos ARGs foram transformados em uma ordem de  $10+8$ , logaritmizados, e então submetidos ao software R v. 4.2.1 para a construção de gráficos de caixa de barras com o pacote ggplot. Os valores de quantificação foram comparados por meio do teste Kruskal-Wallis One way-analysis of variance (ANOVA).

Os reads contendo as sequências de DNA obtidos em arquivos FASTQ foram carregados na plataforma Galaxy Genome (<https://usegalaxy.org/>) por meio do pipeline Mothur. Através da ferramenta FASTQC, foi feita a avaliação da qualidade das sequências geradas. Posteriormente, foi feita a trimagem para a remoção dos reads de baixa qualidade. As amostras foram adicionadas como repetições e foi feita a plotagem do gráfico de abundância relativa e o diagrama de Venn para o estudo da riqueza de espécies e co-ocorrência de espécies nas amostragens realizadas.

## RESULTADOS

### Limites de quantificação e eficiência da qPCR

Os limites de quantificação foram definidos com base no controle negativo. Uma vez que os valores de corte para a análise de DNA ambiental por qPCR não estão bem definidos na literatura (LANGLOIS et al., 2020), foram adotados métodos próprios para o estabelecimento destes valores. Nas reações realizadas, o valor de C<sub>q</sub> (ciclo de quantificação) variou entre 22,19 e 42,01, com apenas três amostras excedendo o valor 40. Valores de C<sub>q</sub>, inclusive para a investigação de ARGs, acima de 31 são considerados altos, sobretudo na área clínicas e podem influenciar na ocorrência de falso-positivos (KLOMPMAKER et al., 2021; WASEEM et al., 2019). No entanto, estudos ambientais têm otimizado protocolos que mantêm estes valores mais altos para suas análises (TOLOSI et al., 2021). Portanto, foram consideradas apenas as reações amplificadas até o 40º ciclo de quantificação. A presença dos genes de resistência foi detectada em diferentes localidades, nos dois tempos de coleta. A eficiência das reações variou entre 93.1% e 100%.

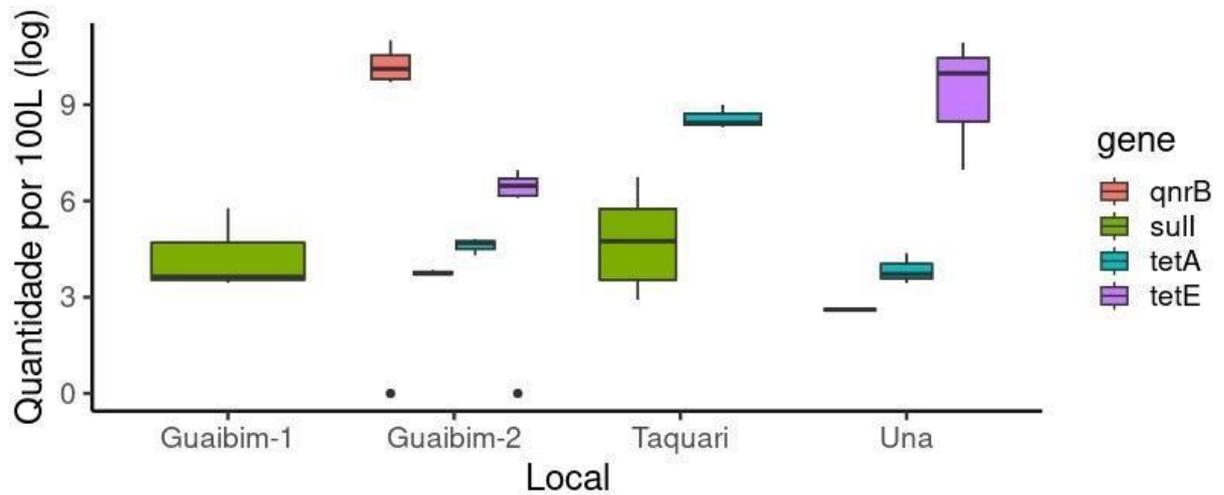
### Concentração absoluta e abundância relativa de ARGs

Todos os genes de resistência foram detectados em pelo menos um dos locais de amostragem, mas houve variação na abundância e a frequência destes genes a depender da localidade. A quantidade de cada ARG variou significativamente entre os locais amostrados ( $p < 0,05$ ).

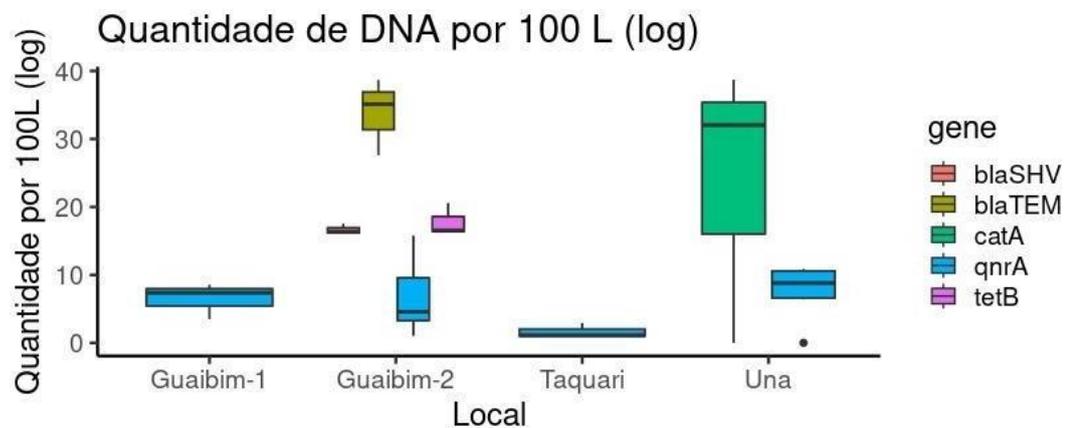
Os resultados de quantificação para os dois tempos de coleta foram analisados como repetições, transformados para a grandeza de 100 litros e logaritimizados para melhor visualização estão dispostos na Figura 7. A concentração de DNA para os genes *qnrB*, *sull*, *tetA* e *tetE* foi menor, enquanto os genes *qnrA*, *catA*, *tetB*, *blaSHV* e *blaTEM* foram encontrados em maior concentração.

O gene *catA* foi exclusivo de Una e houve grande variação entre as repetições. O gene *qnrB*, entretanto, foi exclusivo de Guaibim-2, onde também pode-se afirmar que a variação de quantidade de DNA nas repetições foi menor.

**Figura 7-A:** Log da quantidade de AGRs (*qnrB*, *sull*, *tetA* e *tetE*) por 100 litros nos dois tempos e nos quatro locais de amostragem.



**Figura 7-B:** Log da quantidade de AGRs (*blaSHV*, *blaTEM*, *catA*, *qnrA* e *tetB*) nos dois tempos e nos quatro locais de amostragem.



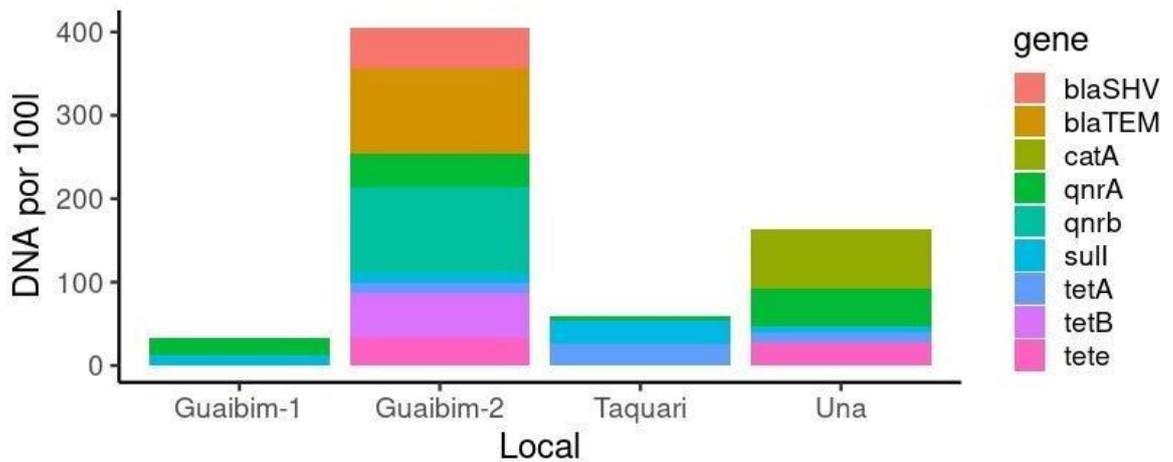
Guaibim-2 obteve maior quantidade de ARGs. Guaibim-1 e Taquari apresentaram as menores quantidades, com pouca diversidade de ARGs. Nas amostras coletadas no rio Una, obteve-se quantidade intermediária entre as coletadas nos pontos supracitados, sendo quase metade desta quantidade relacionada ao gene *catA*.

O gene *tetA* foi detectado em todas as amostras, exceto Guaibim-1 e o gene *sull* também apresentou ampla distribuição.

A Figura 8 melhor representa a distribuição dos genes de resistência nos locais de

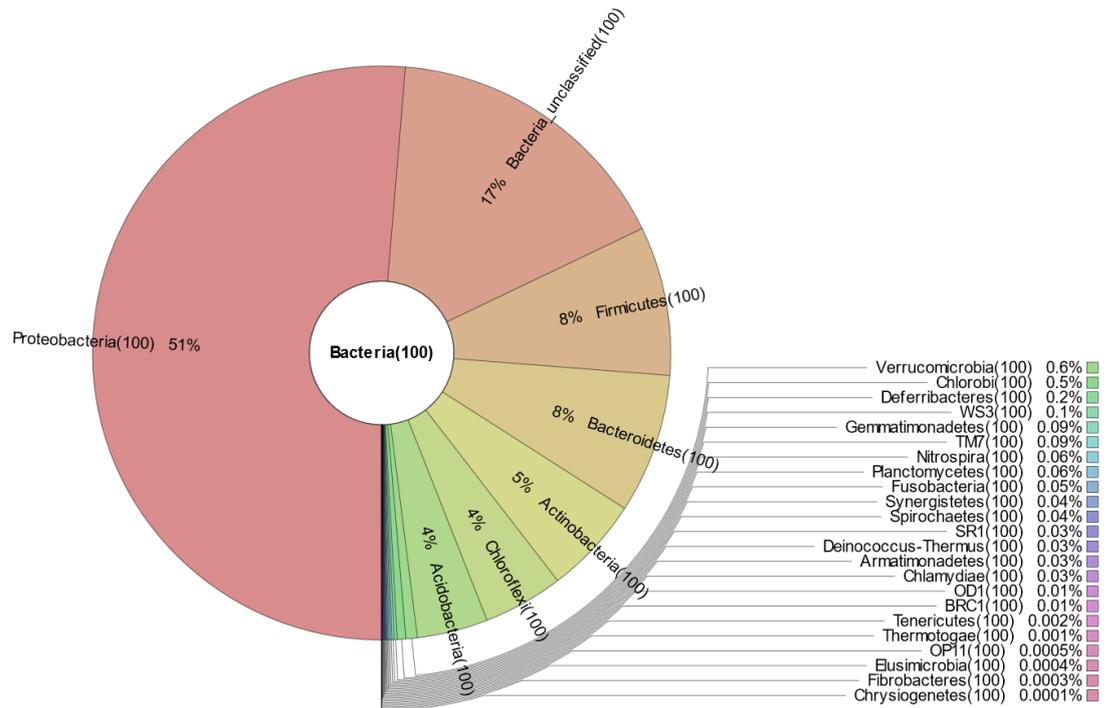
amostragem. As amostras coletadas no Brejo apresentaram maior diversidade em relação aos outros pontos de amostragem, seguida por Una, Taquari e, por fim, Guaibim.

**Figura 8:** Log da quantidade de ARGs por 100 L em cada local de amostragem.



### Composição da comunidade bacteriana

Foram identificadas um total de 60000, 36755, 37746 e 54248 sequências para as amostras coletadas em Guaibim-1, Guaibim-2, Taquari e Una, respectivamente, sendo a maior parte pertencente ao filo Proteobacteria (51%), seguido de Firmicutes (8%), Bacteroidetes (8%), Actinobacteria (5%), Chloroflexi (4%) e Acidobacteria (4%). 17% das bactérias não puderam ser classificadas. Estes dados podem ser observados na Figura 10. Dentre as proteobactérias, destacam-se os grupos Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria e Deltaproteobacteria.

**Figura 9:** Frequência relativa dos grupos bacterianos presentes nas comunidades amostradas.

A frequência relativa destes grupos variou em cada ponto de coleta, porém os principais grupos de bactérias tiveram representatividade em todas as amostras (Tabela 3).

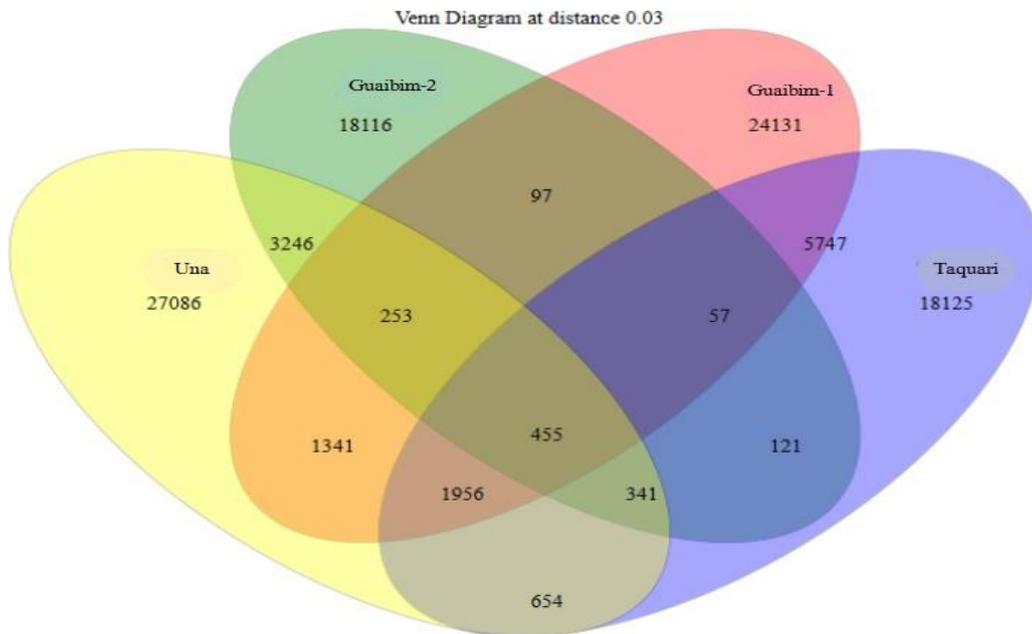
**Tabela 3** - Abundância expressa em número de sequências dos principais filos componentes das comunidades microbianas em cada ponto de amostragem.

Filo	Local de amostragem			
	Guaibim-1	Guaibim-2	Taquari	Una
Proteobacteria	44819	17377	26427	24121
Actinobacteria	4811	2779	2891	4971
Firmicutes	1482	7938	523	6229
Chloroflexi	2757	891	2388	5924
Bacteroidetes	1640	1315	1327	6911
Acidobacteria	486	2015	452	357
Não identificadas	3948	2165	2694	7627

Complementarmente, verificou-se que as amostras coletadas no Una apresentaram

maior número de espécies exclusivas. Guaibim-1 e Taquari apresentam maior co-ocorrência de espécies, seguido por Guaibim-2 e Una.

**Figura 10:** Diagrama de Venn expressando a co-ocorrência de espécies nos locais de amostragem.



### Presença de bactérias patogênicas

Inicialmente, foi verificada a presença de bactérias do grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp), que estão listadas pela Organização Mundial da Saúde como de vigilância prioritária. Estas bactérias são frequentemente associadas a multirresistência, possuem rápida replicação, transmissibilidade elevada e frequentemente causam infecções duradouras, devido à dificuldade de tratamento (RIBEIRO et al., 2022).

Em Guaibim-2, foram detectadas sequências pertencentes aos grupos *Enterococcus faecium* e *Acinetobacter* sp. Em Una, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecium* e *Enterobacter cloacae* foram encontrados. Outras bactérias causadoras de infecções também foram identificadas, como *Escherichia coli*, comum no trato intestinal de vários animais, embora associadas a infecções no sistema urinário e *Clostridium botulinum*, bactéria que causa o botulismo.

Além das bactérias patogênicas, verificou-se, também, alta frequência de bactérias associadas a reciclagem de enxofre e bactérias metanogênicas.

## DISCUSSÃO

A diversidade de ARGs em Guaibim-2 pode estar relacionada à escassez de um plano de saneamento básico na região. Como o destino dos resíduos são as fossas sépticas, é possível que estes genes sejam eliminados pelos próprios habitantes da região e o extravasamento das fossas contamine águas que compõem o complexo ecossistêmico do brejo. Além disso, o uso da água por animais para os quais são administrados antibióticos e, portanto, constituem um habitat com uma forte pressão para a seleção de bactérias resistentes, também pode ser um fator preponderante no aumento da diversidade de ARGs neste ponto de amostragem.

Em Taquari, Una e Guaibim-1, há ainda a influência da maré. Embora estuários sejam ambientes de deposição, a variação de maré pode ser um fator que contribui para uma maior dispersão dos genes de resistência, como verificado em outros estudos (ZHENG et al., 2022; WANG et al., 2023), enquanto Guaibim-2 constitui um ambiente mais estável, com maior taxa de deposição de ARGs.

A composição da comunidade microbiana nos locais observados, com maior frequência de bactérias dos filos Proteobacteria, Actinobacteria e Firmicutes é similar a de trabalhos anteriormente publicados (COSTA et al., 2023; LAI et al., 2022). Em geral, há uma grande diversidade de deltaproteobactérias, que inclui famílias como *Desulfobacteraceae* e *Desulfobulbaceae*, que participam da redução de sulfatos a sulfitos, e outros envolvidos no metabolismo do metano. Vários grupos pertencentes aos filos Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria e Deltaproteobacteria, que são abundantes em todas as amostras, desempenham importantes papéis na ciclagem de nitrogênio (ANDREOTE et al., 2012).

Pesquisas anteriormente publicadas indicam que há maior representatividade de Bacteroidetes em solos contaminados com petróleo (ROGEL, 2019). No entanto, ainda que fosse possível fazer uma inferência para o presente estudo, a frequência de Bacteroidetes foi baixa em todas as amostras. Há, também, uma correlação entre a presença de bactérias anaeróbias e contaminação ambiental (LI et al., 2019). Por este ângulo, verifica-se que a maior quantidade de bactérias de famílias metanogênicas como *Methanomicrobiaceae*, *Methanosarcinaceae*, *Methanococcaceae* e *Methanobacteriaceae*, e *Desulfovibrionaceae* e *Desulfobacteraceae* em Guaibim-2 e Una, o que pode ser um indicador de maior nível de contaminação nesses locais.

Adicionalmente, bactérias do filo Firmicutes são frequentemente associadas à degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. Sua alta frequência no Brejo e em Una indica potencial biotecnológico da microbiota nativa, uma vez que o metabolismo destes organismos permite seu uso processos de biorremediação de áreas contaminadas com hidrocarbonetos, resíduos industriais e como controladores de pragas (HASHMI et al., 2020; GOU et al., 2020).

A maior proporção de bactérias pertencentes ao filo Acidobacteria é um indicativo de variação de pH do solo. Embora de ocorrência natural e com ampla distribuição, a frequência relativa deste grupo nas comunidades microbianas é baixa, tendendo a aumentar em solos mais ácidos (PEDRINHO et al., 2021). Pedrinho et al. demonstraram que o uso de lodo de esgoto tende a aumentar a frequência de acidobactérias e reduzir a diversidade da comunidade. Com base nisso, é importante salientar que a abundância relativa de acidobactérias três vezes maior em Guaibim-2 do que em outros locais pode indicar que a taxa de contaminação por esgoto seja alta nesta região. Este dado, combinado aos fatos de que a diversidade de ARGs detectados neste ponto de amostragem é maior, indica a necessidade de monitoramento do local.

De forma geral, em relação aos efeitos da contaminação na composição da comunidade microbiana a nível de filo, pouco pode ser inferido a partir de análises metagenômicas para esta pesquisa, uma vez que diversos estudos apontam que diferentes ambientes podem ter composições bióticas distintas, que variam de acordo com vários parâmetros físico-químicos (pH, nutrientes disponíveis, salinidade e vários tipos de compostos poluentes). Para uma verificação mais acurada, seria necessário um monitoramento contínuo, que levasse em conta estes parâmetros, e verificasse a mudança na composição da microbiota dos locais após diferentes eventos.

A metagenômica, neste caso, atua como importante fonte de dados complementares para a investigação da resistência antimicrobiana em um local. De fato, algumas bactérias listadas como de vigilância prioritária pela Organização Mundial da Saúde foram detectadas nas amostras. *Enterococcus faecium*, *Acinetobacter sp*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecium* e *Enterobacter cloacae* têm histórico de resistência contra potentes antibióticos utilizados nos sistemas de saúde (LIMA; BENJAMIM; SANTOS, 2017; CHAGAS, 2011; BALLABEN, 2019). A co-ocorrência destas bactérias com ARGs, sobretudo sua presença nos locais onde maior diversidade de genes de resistência foi encontrada, indica que Guaibim-2 e

Una são locais de preocupação de saúde pública, sobretudo por se tratarem de locais que podem ser fonte de recursos hídricos e alimentares para humanos e outros animais.

O grande número de espécies compartilhadas entre Guaibim-1 e Taquari indica a proximidade destes ambientes, o que reflete maior similaridade entre as comunidades microbianas.

Guaibim-2 e Una, em contrapartida, apresentam características distintas e não estão geograficamente próximos. A partir disso, é possível inferir que seu status de preservação, possivelmente influenciado pela presença de efluentes domésticos, foi um dos fatores de seleção para os grupos bacterianos observados.

Ademais, tanto o mangue mais afetado por atividades antrópicas (Guaibim-1), quanto o mais conservado (Taquari) apresentam baixa abundância relativa de genes de resistência, o que indica que de fato, ambos ainda não alcançaram níveis de contaminação muito alarmantes. A ausência de bactérias do grupo ESKAPE (assim como de outros grupos de organismos infecciosos geralmente presentes em esgotamento sanitário) também pode ser citada como um fator indicador do baixo nível de contaminação.

A julgar pela quantidade de DNA destes genes presente em Guaibim-2 e Una, é pouco provável que a resistência seja de origem natural, uma vez que os antibióticos aos quais os ARGs conferem resistência foram listados como usuais na rede de saúde pública da Bahia. Isto indica que eles podem ter um efeito na seleção dos ARGs distribuídos nas diferentes localidades estudadas, mesmo em ambientes supostamente conservados. No entanto, uma vez que os dados deste estudo são insuficientes para permitir o rastreamento da origem da resistência antimicrobiana, não se pode concluir que a alta frequência dos ARGs detectados é determinada pelo uso de antibióticos na pecuária, aquicultura ou na saúde humana. É importante salientar que, mesmo em locais livres das bactérias do grupo ESKAPE, a alta frequência de ARGs e a presença de outras bactérias causadoras de infecções indica que a água, sem tratamento adequado, é imprópria para consumo humano, pois pode ser uma fonte de transferência de genes de resistência (CZEKALSKI et al., 2014).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados indicam que há uma urgência do desenvolvimento de estudos integrados entre órgãos ambientais e de saúde para o monitoramento da resistência microbiana na cidade de Valença, sobretudo a antibióticos das classes tetraciclina e quinolona. Além disso, deve-se reafirmar a necessidade de campanhas de conscientização e sensibilização sobre o uso da água não tratada para consumo e o uso indiscriminado de antibióticos.

A presença de bactérias que indicam contaminação dos ambientes por resíduos humanos é um fator alarmante, e indica a deficiência do setor de saneamento na cidade, especialmente em Guaibim, onde o sistema de esgotamento sanitário ainda não foi instalado. É interessante notar que, mesmo em Valença, onde há sistema de esgoto, mesmo que não de forma integral, os AGRs foram detectados. Isto indica a necessidade do desenvolvimento de ferramentas e técnicas capazes de tratar e eliminar genes de resistência dos resíduos que são lançados em corpos hídricos e seu incremento no sistema de saneamento.

Ademais, há a necessidade do desenvolvimento de estudos capazes de verificar a presença de ARGs nos recursos pesqueiros da região, que são frequentemente consumidos e comercializados. Com o monitoramento contínuo da presença destes genes nos alimentos de origem animal, combinado ao efetivo tratamento dos resíduos domésticos e industriais e à eficaz administração de medicamentos antimicrobianos nos sistemas de saúde, pode-se romper o ciclo de transmissão destes genes e mitigar futuros surtos de infecções causadas por organismos resistentes.

## CONCLUSÃO GERAL

O aumento na frequência de casos de infecção por bactérias resistentes a antibióticos traz à tona a deficiência nos setores farmacêutico e de saneamento. Com a rápida disseminação de novos patógenos propiciada pela globalização somada à capacidade destes organismos em adquirir mecanismos de resistência, seja por meio de transmissão horizontal ou vertical, o processo de produção de novos antibióticos é dificultado. Neste sentido, é necessário promover e subsidiar o desenvolvimento de políticas e a implementação de técnicas mais efetivas de vigilância epidemiológico-sanitária, que facilitem a identificação e o rastreio da origem de patógenos emergentes e genes de resistência em uma população, para que se possa estabelecer estratégias de combate a infecções por estes organismos.

Análises genômicas de amostras ambientais têm se revelado uma alternativa efetiva, mesmo sob pequena escala. A diminuição dos custos dos experimentos e o maior investimento em formação de mão de obra especializada propiciam a implementação desta estratégia.

Em uma perspectiva de Saúde Única, diversos setores da administração pública e autarquias serão capazes cooperar para garantir a implementação da vigilância genômica. Para subsidiar esta estratégia, é fundamental o desenvolvimento de pesquisas que explorem esta área, sobretudo em instituições públicas de ensino superior, que são capazes de converter os investimentos em benefícios para a sociedade.

## **AGRADECIMENTOS**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, da Universidade Estadual de Feira de Santana, do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB).

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, N. **Detecção de genes bla em bactérias produtoras de ESBL isoladas de pacientes com doenças hematológicas**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação Multidisciplinar em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, 103 p, 2011.
- ALONGI, D. The Impact of Climate Change on Mangrove Forests. **Curr Clim Change Rep**, v. 1, p. 30–39, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40641-015-0002-x>
- ANDREOTE, F et al. The Microbiome of Brazilian Mangrove Sediments as Revealed by Metagenomics. **PLOS ONE**, 2012.
- AMINOV, R, CHEE-SANFORD, J.C, and GARRIGUES, N. Development, validation, and application of PCR primers for detection of tetracycline efflux genes of gram-negative bacteria. **Appl Environ Microbiol**, v. 68, p. 1786-1793, 2002.
- BAI, N; REN, J; BAI, F; HAO, L. Selection and validation of reference genes for gene expression studies in *Pseudomonas brassicacearum* GS20 using real-time quantitative reverse transcription PCR. **PLoS ONE**, v.15, 2020.
- BALLABEN, A. **Estudo genético da resistência aos antibióticos beta-lactâmicos, quinolonas e aminoglicosídeos em bactérias isoladas de pacientes com suspeita de meningite no Estado de São Paulo**. Tese (Doutorado em Ciências) - Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia, Ribeirão Preto, 2019.
- BASSITA, R. Spread of antimicrobial resistance genes via pig manure from organic and conventional farms in the presence or absence of antibiotic use. **Applied Microbiology**, v. 133, p. 2457-2465, 2022.
- BENOY, I et al. Using the VALGENT-3 framework to assess the clinical and analytical performance of the RIATOL qPCR HPV genotyping assay. **Journal of Clinical Virology**, v. 120, p. 57-62, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2019.09.008>.
- BERENDONK, T; MANAIA, C; MERLIN, C et al. Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. **Nat Rev Microbiol**, v. 13, p. 310–317, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro3439>

BEZERRA, A. Vigilância em saúde ambiental no Brasil: heranças e desafios. **Saúde soc**, v. 26, n. 4, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0104-12902017170093>

BRYAN-BROWN, D; CONNOLLY, R; RICHARDS, D. *et al.* Global trends in mangrove forest fragmentation. **Sci Rep**, v. 10, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63880-1>

CASTRO, Í; CASTRO, L; LIMA, A. Bactérias resistentes a antibióticos e o meio aquático: efeito na produção animal. **Ciência Animal**, v. 31, n. 3, 2021.

Centro de recursos ambientais. **Área de Proteção Ambiental do Guaibim**: zoneamento ambiental. Salvador, 1993.

CATTOIR, V et al. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *J. Antimicrob. Chemother*, v. 60, p. 394–397, 2007.

CHAGAS, T. **Deteção de bactérias multirresistentes aos antimicrobianos em esgoto hospitalar no Rio de Janeiro**. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 147 p, 2011.

CONTE, J; POTOCZNIAK, M; TOBE, S. Using synthetic oligonucleotides as standards in probe-based qPCR. *BioTechniques*, v. 64, n. 4, p. 177-179, 2018. DOI: <https://doi.org/10.2144/btn-2018-2000>.

COPRASO, J et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **The ISME Journal**, v. 6, p. 1621–1624, 2012.

COSTA, G et al. Effects of Degradation on Microbial Communities of an Amazonian Mangrove. **Microorganisms**, v. 11, n. 6, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061389>.

CZEKALSKI, N; DÍEZ, E; Bürgmann, H. Wastewater as a point source of antibiotic-resistance genes in the sediment of a freshwater lake. **ISME J**, v. 8, p. 1381–1390, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.8>

DIAS, L *et al.* Bioprospecção de Microorganismos de Interesse Biotecnológico Isolados em Ecossistema de Manguezal. **Revista de Investigação Biomédica**, v. 9, n. 1, 2017. DOI: <https://doi.org/10.24863/rib.v9i1.84>

GARRIDO, L; SÁNCHEZ, O; FERRERA; Tomàs, N; Mas, J. Dynamics of microbial diversity profiles in waters of different qualities. Approximation to an ecological quality indicator. **Science of The Total Environment**, v. 468–469, p. 1154-1161, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.08.065>.

GILLINGS, M; STOKES, H. Are humans increasing bacterial evolvability? **Trends in Ecology & Evolution**, v. 27, n. 6, p. 346-352, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tree.2012.02.006>

GOU, Y et al. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and the response of indigenous bacteria in highly contaminated aged soil after persulfate oxidation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 190, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.110092>.

HUIJBERS, P; FLACH, C; LARSSON, D. A conceptual framework for the environmental surveillance of antibiotics and antibiotic resistance. **Environment International**, v. 130, p. 104880, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.05.074>

**IBGE** - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Cidades e estados: Valença. **IBGE**, 2022. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados.html>.

ISHIDA, Y et al. 2010. Molecular analysis of antimicrobial resistance in gram-negative bacteria isolated from fish farms in **Egypt. J. Vet. Med. Sci**, v. 72, p. 727–734, 2010.

KARIMI, B; MARON, P; BOURE, N. *et al.* Microbial diversity and ecological networks as indicators of environmental quality. **Environ Chem Lett**, v. 15, p. 265–281, 2017. <https://doi.org/10.1007/s10311-017-0614-6>.

KERRN, M. et al. Susceptibility of Danish *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections and bacteraemia, and distribution of *sul* genes conferring sulphonamide resistance. **J Antimicrob Chemother**, v. 50, 2002.

KLOMPMAKER, A. et al. Estimating Clinically Relevant Cut-Off Values for a High-Throughput Quantitative Real-Time PCR Detecting Bacterial Respiratory Pathogens in Cattle. **Front. Vet. Sci.**, v. 8, 2021. DOI:<https://doi.org/10.3389/fvets.2021.674771>.

LAI, J. et al. A Systematic Review of the Physicochemical and Microbial Diversity of Well-Preserved, Restored, and Disturbed Mangrove Forests: What Is Known and What Is the Way Forward? **Forests**, v. 13, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/f13122160>

- LANGLOIS, V. et al. The need for robust qPCR-based eDNA detection assays in environmental monitoring and species inventories. *Environmental DNA*, v. 3, n. 3, p. 519-527, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1002/edn3.164>
- HASHMI, I; BINDSCHEDLER, S; JUNIER, P. Chapter 18 - Firmicutes. In: AMARESAN, N et al. **Beneficial Microbes in Agro-Ecology**, Academic Press, p. 363-396, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823414-3.00018-6>.
- LIMA, C; BENJAMIM, S; SANTOS, R. Mecanismos de resistência bacteriana frente a fármacos: uma revisão. **CuidArt Enfermagem**, v. 11, n. 1, p. 105-116, 2017.
- LI, Y., ZHENG, L., ZHANG, Y. et al. Comparative metagenomics study reveals pollution induced changes of microbial genes in mangrove sediments. **Sci Rep**, v. 9, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42260-4>
- LIU, M; HUANG, H; BAO, S *et al.* Microbial community structure of soils in Bamenwan mangrove wetland. *Sci Rep* **9**, 8406 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44788-x>.
- LOUREIRO, J. et al. O uso de antibióticos e a resistência bacteriana: breves notas sobre sua evolução. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, [s. l.], v. 34, n. 1, p. 77–84, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rpsp.2015.11.003>
- MA, Z et al. Incorporating soil aggregate-associated indicators into evaluating ecological responses of degraded estuarine wetlands to freshwater replenishment at different intensity: A case study from Yellow River Delta, China. **Ecological Indicators**, v. 121, 2021.
- MCMILLAN, E et al. Antimicrobial Resistance Genes, Cassettes, and Plasmids Present in *Salmonella enterica* Associated With United States Food Animals. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00832>
- MABILAT, C; GOUSSARD. PCR detection and identification of genes for extended-spectrum  $\beta$ -lactamases, p. 553-559. In D. H. Persing, T. F. Smith, F. C. Tenover, and T. J. White (ed.), **Diagnostic molecular microbiology: principles and applications**. American Society for Microbiology, Washington, D.C, 1993.
- MARANO, R; GUPTA, C; COZER, T; JURKEVITCH, E; CYTRYN, E. Hidden Resistome: Enrichment Reveals the Presence of Clinically Relevant Antibiotic Resistance Determinants in Treated Wastewater-Irrigated Soils. **Environ Sci Technol**, v. 55, n. 10, 2021. DOI: [10.1021/acs.est.1c00612](https://doi.org/10.1021/acs.est.1c00612).

MATOS, E; DURRER, A; ANDREOTE, F. Ecologia Microbiana. In: CARDOSO, E; ANDREOTE, F. **Microbiologia do Solo**. 2 ed. Piracicaba: ESALQ, 2016, 221 p.

MELLONI, R. Quantificação Microbiana da Qualidade do Solo. In: SILVEIRA, Adriana; FREITAS, Sueli. **Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental**. Campinas: Instituto Agronômico, 2007, 312 p.

MCLUSKY, D; ELLIOT, M. **The Estuarine Ecosystem: Ecology, Threats and Management**, 3 ed. Oxford, 2010. DOI:  
<https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198525080.001.0001>.

NG, L, MARTIN, I; ALFA, M; MULVEZ, M. Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. **Mol cell probe**, v. 15, p. 209-215, 2001.

OLMEDO, L. **Caracterização dos mecanismos de resistência aos antimicrobianos em cepas de Escherichia coli recuperadas de mariscos** (Dissertação - Mestrado em Microbiologia) - Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

OTTONI, F et al. Manguezais brasileiros sob risco. **Biota Neotrop**, v. 21, n. 2, 2021.

PADILLA-GARCÍA, C; CAMACHO-SÁNCHEZ, F; REYES-LÓPEZ, M. *Metabarcoding* de DNA ambiental: un enfoque para el seguimiento de la biodiversidad. **CienciaUAT**, v. 16, n. 1, 2021.

PEDRINHO, E et al. Avaliação do impacto do lodo de esgoto na microbiota do solo utilizando o gene 16S rRNA. **Arq. Ins. Bio**, v. 76, n. 3, p. 443-448, 2009.

RAMAZANZADEH, R. Etiologic agents and extended-spectrum beta-lactamase production in urinary tract infections in Sanandaj, Iran. **Eastern Journal of Medicine**, v. 15, p. 57-62, 2010.

RIBEIRO, E; ALVES, J; ALVES, K. Ocorrência e perfil de resistência de bactérias pertencentes ao grupo ESKAPE em pacientes hemodialíticos. **Revista Prevenção de Infecção e Saúde**, v. 8, n. 1, 2022. DOI: <https://doi.org/10.26694/repis.v8i1.2248>.

ROBICHAW, J et al. Genomic surveillance to combat COVID-19: challenges and opportunities. **The Lancet Microbe**, v. 2, n. 9, p. 481-484, 2021. DOI:  
[https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(21\)00121-X](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(21)00121-X)

ROGEL, R. **Caracterización de la comunidad bacteriana de una zona contaminada con petróleo, mediante técnicas dependientes e independientes de cultivo en Nieva-Amazonas 2016**. 2019. 73f. Tese - Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Piura, Piura, 2019.

SANT'ANNA, G. S. L.; CUNHA, J. M. F.; NUNES, J. F.; AVILA, I. A. F.; GONÇALVES, J. V.

S.; FERREIRA, P. F. A.; SOUZA, M. M. S.; COELHO, S. M. O.; COELHO, I. S..

Antimicrobial resistance genes and bacterial diversity in sediments of Guandu River, Brazil.

**Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v.12, n.4, p.116-123, 2021. DOI:

<http://doi.org/10.6008/CBPC2179-6858.2021.004.0012>

SANTOS, N. **Serviços ecossistêmicos em manguezal: identificação e mapeamento dos serviços de provisão no manguezal do rio Tijupá, Ilha do Maranhão - MA, Brasil**. 2018. 124f. Dissertação (Mestrado em Geografia) - Centro de Ciências Humanas, Letras e Artes, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2018.

SILVA, U. **Análise metagenômica da microbiota de ambientes aquáticos do estado do Rio Grande do Norte - Brasil**. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Programa Rede Nordeste de

Biotecnologia – RENORBIO, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, 113 p. 2013.

SOUSA, A. **Turismo e produção no território da Bahia: impactos das políticas públicas em Valença**. Dissertação (Mestrado em Planejamento Territorial) - Núcleo de Pós-graduação em Política Pública e Planejamento Territorial, Universidade Estadual de Feira de Santana, 235 p. 2015.

SOUSA, R. **Pesquisa de genes de resistência a quinolonas em bacilos Gram negativos de origem clínica e ambiental**. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 102 p. 2014.

TOLOSI, R. et al. Optimization of five qPCR protocols toward the detection and the quantification of antimicrobial resistance genes in environmental samples. **MethodsX**, v. 8, 2021. DOI: 10.1016/j.mex.2021.101488.

TORTORA, G; FUNKE, B; CASE, C. **Microbiologia**. 10 Ed. Artmed, 2012.

WANG, C et al. Effects of tidal action on the stability of microbiota, antibiotic resistance genes, microplastics in the Pearl River Estuary, Guangzhou, China. **Chemosphere**, v. 237, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.138485>.

WANG, Y; QIAN P. Conservative Fragments in Bacterial 16S rRNA Genes and Primer Design for 16S Ribosomal DNA Amplicons in Metagenomic Studies. **PLOS ONE**, v. 4, n. 10, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007401>

WASEEM, H. Contributions and Challenges of High Throughput qPCR for Determining Antimicrobial Resistance in the Environment: A Critical Review. **Molecules**, v. 24, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules24010163>

ZHENG, C; ZHU, D; XU, Y. Co-driving factors of tidal effect on the abundance and distribution of antibiotic resistance genes in the Yongjiang Estuary, China. **Environmental Research**, v. 213, 2022, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113649>.

ZILLI, J; RUMJANEK, N; XAVIER, G; COUTINHO, H; NEVES, M. Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 20, n. 3, p. 391-411, 2003.

## ANEXO 1

### Protocolo Quick-DNA/RNATM MagBead (Zymo Research) modificado

1. As amostras devem ser fracionadas ao máximo ( $\leq 25$  mg) e separadas em um microtubo de 1,5 ml.
2. Adicionar 800  $\mu$ l de DNA/RNA ShieldTM (2X concentrate) com beads de sílica, agitar por 1 min em disruptor em velocidade máxima. Após a homogeneização, remover as partículas por centrifugação.
3. Adicionar 200  $\mu$ l de tampão de lise e 20  $\mu$ l de proteinase K a 200  $\mu$ l do sobrenadante e incubar a 56°C em banho seco por 4h.
4. Adicionar 400  $\mu$ l de etanol (95-100%) e misturar bem.
5. Adicionar 30  $\mu$ l de MagBinding Beads and misturar bem por 20 minutos.
6. Transferir a mistura para o suporte, esperar as beads peletizarem e descartar o sobrenadante.
7. Adicionar 500  $\mu$ l MagBead DNA/RNA Wash 1 e misturar bem. Recolocar o tubo no suporte e esperar as beads peletizarem antes de descartar o sobrenadante.
8. Adicionar 500  $\mu$ l MagBead DNA/RNA Wash 2 e misturar bem. Recolocar o tubo no suporte e esperar as beads peletizarem antes de descartar o sobrenadante.
9. Adicionar 500  $\mu$ l de etanol (95-100%) e misturar bem. Recolocar o tubo no suporte e esperar as beads peletizarem antes de descartar o sobrenadante.
10. Repetir a etapa anterior.
11. Incubar a 30°C até o álcool evaporar e ressuspender em 50  $\mu$ l de Água UltraPura™ DNase/RNase-Free.