

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

**PESQUISA DE *INTEGRONS* E GENES ASSOCIADOS À
RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS EM SEDIMENTOS APÓS O
COLAPSO DA BARRAGEM DE FUNDÃO EM MARIANA, MINAS
GERAIS**

AMANDA APARECIDA FIGUEIREDO CARVALHO

Belo Horizonte

2022

Amanda Aparecida Figueiredo Carvalho

**PESQUISA DE *INTEGRONS* E GENES ASSOCIADOS À
RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS EM SEDIMENTOS APÓS O
COLAPSO DA BARRAGEM DE FUNDÃO EM MARIANA, MINAS
GERAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Paula Prazeres Magalhães

Coorientadores: Anna Gabriella Guimarães Oliveira

João Fernando Gonçalves Ferreira

Luiz de Macêdo Farias

Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios

Departamento de Microbiologia

Instituto de Ciências Biológicas

Universidade Federal de Minas Gerais

2022

043

Carvalho, Amanda Aparecida Figueiredo.

Pesquisa de integrons e genes associados à resistência a antimicrobianos em sedimentos após o colapso da Barragem de Fundão em Mariana, Minas Gerais [manuscrito] / Amanda Aparecida Figueiredo Carvalho. – 2022.

81 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Paula Prazeres Magalhães. Coorientadores: Anna Gabriella Guimarães Oliveira, João Fernando Gonçalves Ferreira, Luiz de Macêdo Farias.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Integrons. 3. Genes MDR. 4. Bacias Hidrográficas. 5. Colapso Estrutural. 6. Sedimentos. I. Magalhães, Paula Prazeres. II. Oliveira, Anna Gabriella Guimarães. III. Ferreira, João Fernando Gonçalves. IV. Farias, Luiz de Macêdo. V. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. VI. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE **AMANDA APARECIDA FIGUEIREDO CARVALHO**

Nº REGISTRO: **2020659349**

Às 14:00 horas do dia **05 de outubro de 2022**, reuniu-se, por via remota, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Marcela França Dias (Pós-doutoranda do Departamento de Microbiologia/ICB /UFMG), Diego Guimarães Florencio Pujoni (Laboratório de Limnologia, Ecotoxicologia e Ecologia Aquática – LIMNEA), Profa. Dra. Paula Prazeres Magalhães (Orientadora), Prof. Dr. Luiz de Macêdo Farias (Coorientador), Anna Gabriella Guimarães Oliveira (Coorientadora) e João Fernando Gonçalves Ferreira (Coorientador) para julgar o trabalho final "**Pesquisa de integrons e genes associados à resistência a antimicrobianos em sedimentos após o colapso da barragem de fundão em Mariana, Minas Gerais**", da aluna **Amanda Aparecida Figueiredo Carvalho**, requisito final para a obtenção do Grau de **MESTRA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Dra. Paula Prazeres Magalhães - Orientadora, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. A candidata tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da dissertação ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Belo Horizonte, 05 de outubro de 2022

Membros da banca:

Dra. Marcela França Dias

Dr. Diego Guimarães Florencio Pujoni

De acordo:

Profa. Dra. Paula Prazeres Magalhães

(Orientadora)

Prof. Dr. Luiz de Macêdo Farias

(Coorientador)

Dra. Anna Gabriella Guimarães Oliveira

(Coorientadora)

Dr. João Fernando Gonçalves Ferreira

(Coorientador)

Profa. Dra. Daniele da Glória de Souza

(Coordenadora do Programa de Pós-graduação
em Microbiologia)



Documento assinado eletronicamente por **Diego Guimaraes Florencio Pujoni, Professor Magistério Superior-Substituto**, em 07/10/2022, às 07:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Paula Prazeres Magalhaes, Professora do Magistério Superior**, em 10/10/2022, às 15:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luiz de Macedo Farias, Professor do Magistério Superior**, em 10/10/2022, às 15:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniele da Gloria de Souza, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 17/10/2022, às 13:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcela França Dias, Usuária Externa**, em 18/10/2022, às 13:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Anna Gabriella Guimarães Oliveira, Usuário Externo**, em 07/11/2022, às 09:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **João Fernando Gonçalves Ferreira, Usuário Externo**, em 05/12/2022, às 14:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1747355** e o código CRC **DE3D07D8**.

Referência: Processo nº 23072.230922/2021-34

SEI nº 1747355

APOIO FINANCEIRO

CAPES

FAPEMIG

FAPES

CNPq

ANA

PRPq/UFMG

AGRADECIMENTOS

Finalmente concluo este ciclo, momento tão desafiador em meio a pandemia de Covid-19 e de vasta aprendizagem.

Agradeço a Deus, por ter me norteado em todos os momentos para que eu chegasse até aqui. À Nossa Senhora Aparecida, pela proteção, intercessão e bênçãos em minha vida.

Gratidão aos meus amados pais, Irinen e Geraldo, pelo imenso amor, dedicação, confiança e apoio em todos os momentos da minha vida. Ao meu irmão Mateus, pelo amor e por ser esta pessoa tão alegre e maravilhosa. Ao Hélio, pelo amor, carinho, companheirismo e encorajamento. Obrigada por nunca me deixar desistir nos momentos mais difíceis e me ensinar a buscar aperfeiçoamento profissional constantemente. A todos da minha família que estiveram comigo durante esta jornada, sempre rezando e torcendo por mim.

Sou grata a minha orientadora Profa. Paula, pela orientação durante o desenvolvimento deste trabalho, pela atenção, paciência, dedicação e confiança depositada em mim. Ao meu coorientador Prof. Luiz pelo apoio e incentivo. Seus diálogos sempre evidenciaram o seu empenho e dedicação na condução do Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios, nosso querido MOA. Sinta-se parte deste e de todos demais trabalhos realizados no laboratório! Aos meus coorientadores João e Anna Gabriella pelos ensinamentos, pela amizade, carinho, paciência e dedicação. Este trabalho só foi possível graças ao empenho de vocês em me auxiliar nos experimentos e nas soluções das dúvidas que surgiram ao longo do desenvolvimento desta pesquisa. A todos os amigos do MOA pelos momentos agradáveis, pela amizade e pelos ensinamentos compartilhados.

Agradeço a Mireille pelo incentivo nos estudos e no trabalho. Sua dedicação e amor pela microbiologia são encantadoras! Às minhas Lideranças e companheiros de trabalho do setor de microbiologia do Grupo Hermes Pardini pela paciência, carinho e convívio.

Meus sinceros agradecimentos a todos que de alguma maneira me apoiaram e me incentivaram durante esta trajetória acadêmica.

RESUMO

A evolução e a propagação da resistência a antimicrobianos nos últimos anos tornaram-se alarmantes, culminando em uma ameaça à saúde global. É necessário um esforço multidisciplinar para o entendimento da distribuição dos genes de resistência a antimicrobianos (ARGs), sobretudo em ambientes modificados pelas atividades antrópicas. Nesse contexto, a atividade mineradora gera impactos ambientais e socioeconômicos. A criação e a história do estado de Minas Gerais possuem relação estreita com a mineração. Na atualidade, o estado foi surpreendido por passivos ambientais relacionados à essa, com destaque, ao colapso da barragem de Fundão, em Mariana, Minas Gerais em 2015, devido aos impactos relacionados aos rejeitos minerais que atingiram a bacia hidrográfica do Rio Doce (BHRD). Sabendo-se da possibilidade de haver cosseleção de genes associados à resistência a múltiplos antimicrobianos na presença de metais, este estudo visa detectar o rDNA 16s, o gene codificador da integrase dos *integrons* da subclasse 1 (*int1*) e 2 (*int2*) e os seguintes ARGs: *vanA*, *ermC*, *qnrB*, *sul1*, *sul2*, *tetM*, *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{NDM-1}*, *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}* e *bla_{VIM}* em duas amostragens, a primeira realizada em fevereiro e a segunda julho, ambas em 2019 em duas sub-bacias da BHRD, sendo uma impactada (Rio Piranga) pelo colapso da barragem de Fundão, e outra não (Rio Santo Antônio). O DNA das amostras foi extraído e submetido à reação de polimerização em cadeia quantitativa. Os resultados demonstraram que os valores médios da abundância relativa para *int1*, *qnrB*, *sul1*, *sul2* e *bla_{TEM}* foram maiores em fevereiro de 2019 na BHRD, assim como, a prevalência do *int1*, *ermC*, *qnrB*, *sul1*, *sul2* e *bla_{TEM}* no mesmo período. Ademais, os genes *sul1*, *sul2* e *qnrB* apresentaram as maiores quantificações em número de cópias do gene por grama de sedimento. Logo, estes ARGs juntamente com o *int1*, podem ser dispersados mais facilmente em sedimentos que outros, principalmente em períodos chuvosos, devido a alta pluviosidade desse período em climas tropicais. Outro dado averiguado neste trabalho foi a maior prevalência, variedade e quantidade de marcadores genéticos detectados na sub-bacia impactada quando comparada a sub-bacia não impactada.

Palavras-chave: *integrons*, genes de resistência a antimicrobianos, sedimentos, reação de polimerização em cadeia quantitativa, bacia hidrográfica do Rio Doce, barragem de Fundão.

ABSTRACT

The evolution and spread of antimicrobial resistance in recent years has become alarming, culminating in a threat to global health. In these circumstances, controlling the spread of antimicrobial resistance requires a multidisciplinary effort to understand the distribution of genetic markers associated with this property. In November 2015, the collapse of the Fundão dam, in Mariana, Minas Gerais, was declared the biggest environmental disaster in the mining sector in the world, due to the impacts related to the mineral tailings that reached the Rio Doce watershed (BHRD). This study aims to detect 16s rDNA, the integrase gene encoding subclass 1 (*int1*) and 2 (*int2*) integrons and the following antimicrobial resistance genes (ARGs): *vanA*, *ermC*, *qnrB*, *sul1*, *sul2*, *tetM*, *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{NDM-1}*, *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}* and *bla_{VIM}* in two samplings, the first carried out in February and the second in July, both in 2019 in the Piranga and Santo Antônio River sub-basins located in the BHRD. The DNA of the samples was extracted and subjected to a quantitative chain polymerization reaction. The results showed that the mean values of relative abundance for *int1*, *qnrB*, *sul1*, *sul2* and *bla_{TEM}* were higher in February 2019 in BHRD, as well as the prevalence of *int1*, *ermC*, *qnrB*, *sul1*, *sul2* and *bla_{TEM}* in the same period. Furthermore, genes *sul1*, *sul2* and *qnrB* showed the highest quantifications in number of gene copies per gram of sediment. Therefore, these ARGs, together with the *int1*, can be dispersed more easily in sediments than others, especially in rainy periods, due to the high rainfall of this period in tropical climates. Another finding in this study was the higher prevalence, variety and quantity of genetic markers detected in the Piranga River sub-basin when compared to the Santo Antônio River sub-basin.

Keywords: *integrons*, antimicrobial resistance genes, sediments, quantitative chain reaction, Rio Doce watershed, Fundão dam.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Integração do conceito Saúde Única: abordagem holística, transdisciplinar e multissetorial da Saúde.	13
Figura 2. Principais mecanismos de resistência a antimicrobianos.....	16
Figura 3. Estrutura e atividade do <i>integron</i>	22
Figura 4. Principais vias de transferência de genes associados à resistência a antimicrobianos.	25
Figura 5. Localização da Bacia Hidrográfica do Rio Doce.	29
Figura 6. Mapa panorâmico da localização dos pontos de coleta de sedimentos nas sub-bacias impactada e não impactada.	38
Figura 7. Abundância relativa total dos <i>integrons</i> e ARGs detectados na BHRD em 2019.	46
Figura 8. Abundância relativa total dos <i>integrons</i> e ARGs detectados na sub-bacias impactada e não impactada	47
Figura 9. Prevalência dos <i>integrons</i> e ARGs detectados na BHRD nas estações chuvosa e seca de 2019.	48
Figura 10. Prevalência dos <i>integrons</i> e ARGs detectados nas sub-bacias impactada e não impactada em 2019.	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais genes associados à resistência a antimicrobianos em bactérias Gram-negativas.....	17
Tabela 2. Principais genes associados à resistência a antimicrobianos em <i>Staphylococcus</i> spp.	18
Tabela 3. Principais genes associados à resistência a antimicrobianos em <i>Enterococcus</i> spp.....	19
Tabela 4. Localização dos pontos de amostragem na sub-bacia impactada.	39
Tabela 5. Localização dos pontos de amostragem na sub-bacia não impactada.	39
Tabela 6. Lista de iniciadores e amostras padrões utilizados nas q-PCR.....	42
Tabela 7. Média e desvio padrão das adundâncias relativas dos marcadores genéticos em fevereiro de 2019.	45
Tabela 8. Média e desvio padrão das adundâncias relativas dos marcadores genéticos em julho de 2019.....	45
Tabela 9. Valores de p das comparações múltiplas par a par.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ARGs: Genes de resistência a antimicrobianos

ADM: Drenagem ácida de mina

ANA: Agência Nacional de Águas

Ag: Prata

As: Arsênio

Ba: Bário

BRHD: Bacia Hidrográfica do Rio Doce

Cd: Cádmio

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*

Co: Cobalto

Cr: Cromo

Cu: Cobre

DAM: Drenagem ácida de minas

EUA: Estados Unidos da América

FAO: Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura

Fe: Ferro

Hg: Mercúrio

ICB: Instituto de Ciências Biológicas

ICEs: *I*n*t*e*g*r*a*t*i*v*e* *a*n*d* *C*o*n*j*u**g*a*t**i*v*e* *E*l*e*m*e*n*t*s

IGAM: Instituto Mineiro de Gestão das Águas

intl1: Integron da subclasse 1

intl2: Integron da subclasse 2

intl3: Integron da subclasse 3

Mn: Manganês

Nb: Nióbio

Ni: Níquel

ORFs: *O*o*p*e*n* *R*e*a*d*i*n*g*h*o*l*e*s

OIE: Organização Mundial de Sanidade Animal

OMS: Organização Mundial da Saúde

Pb: Chumbo

PIRH-DOCE: Plano integrado de recursos hídricos da Bacia Hidrográfica do Rio Doce

q-PCR: Reação de polimerização em cadeia quantitativa (PCR em tempo real)

Sr: Estrôncio

sul1: gene que confere resistência à sulfonamida

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

UNIFESP: Universidade federal de São Paulo

Zn: Zinco

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1. Resistência a antimicrobianos: aspectos clínicos e ambientais	13
1.1.1 Aspectos gerais do fenômeno de resistência a antimicrobianos	13
1.1.2 Mecanismos de resistência a antimicrobianos.....	15
1.1.3 Resistoma	19
1.1.4 Elementos genéticos móveis e <i>integrons</i>	20
1.1.5 Atividades antrópicas e a emergência da disseminação de genes associados à resistência a antimicrobianos.....	24
1.1.6 Mineração e metais: a possível cosseleção de genes associados à resistência a múltiplos antimicrobianos.....	27
1.2. A bacia hidrográfica do Rio Doce	28
1.2.1. Particularidades da bacia hidrográfica do Rio Doce	28
1.2.2. O colapso da barragem de Fundão em Mariana, Minas Gerais	31
1.2.3. Impactos ambientais na bacia hidrográfica do Rio Doce após o desastre da barragem de Fundão.....	33
2. JUSTIFICATIVA	36
3. OBJETIVOS	37
3.1. Objetivo Geral	37
3.2. Objetivos Específicos	37
4. MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1. Amostragem	38
4.2. Extração de DNA.....	40
4.3. Ensaio de q-PCR.....	40
4.4. Análise dos dados	43
5. RESULTADOS	44
5.1. Avaliação da especificidade e eficiência das reações de amplificação	44
5.2. Abundância absoluta e abundância relativa dos marcadores genéticos na bacia hidrográfica do Rio Doce	44

5.2.1. Abundância absoluta e abundância relativa.....	44
5.2.2. Abundância relativa nas sub-bacias impactada e não impactada.....	46
5.3. Prevalência dos <i>integrons</i> e genes de resistência a antimicrobianos.....	47
5.3.1. Prevalência dos <i>integrons</i> e genes de resistência a antimicrobianos nas estações chuvosa e seca.....	47
5.3.2. Prevalência dos <i>integrons</i> e genes de resistência a antimicrobianos nas sub-bacias impactada e não impactada.....	48
6. DISCUSSÃO.....	50
7. CONCLUSÕES.....	53
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
9. APÊNDICES.....	66

1. INTRODUÇÃO

A descoberta da penicilina, em 1928, por Alexandre Fleming e, posteriormente, a sua produção em escala industrial para fins terapêuticos, na década de 1940, seguida pela introdução de outros compostos com atividade antimicrobiana, inaugurou uma nova era para a Medicina, a era dos antibióticos. A antibioticoterapia foi amplamente utilizada no século XX e teve importância significativa na Segunda Guerra Mundial, mitigando drasticamente o número de soldados mortos por infecções bacterianas anteriormente fatais (TAVARES, 2014). Desde então, diversas substâncias de origem natural e derivados semissintéticos são utilizados para o tratamento de seres humanos e outros animais com doenças infecciosas e na agropecuária, com destaque para o incremento da produção de bens agrícolas e espécies de animais.

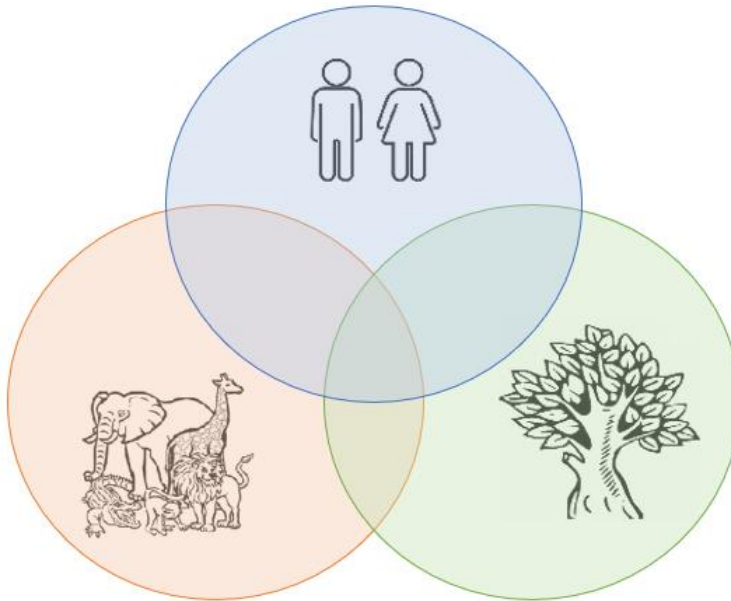
Tradicionalmente, o termo “antibiótico” refere-se a produtos metabólicos naturais produzidos por qualquer microrganismo capazes de aniquilar ou inibir a multiplicação de outros, para assegurar sua sobrevivência no meio ambiente (TAVARES, 2014). Com o desenvolvimento dos processos semissintéticos aliado ao surgimento de tecnologias industriais farmacêuticas, foi possível desenvolver substâncias com efeitos de antibiose. Dessa forma, os termos “agente antibacteriano” e “antimicrobiano” são usados preferencialmente a “antibiótico”.

Nos últimos anos, a emergência e a propagação de patógenos resistentes a antimicrobianos, especialmente bactérias multirresistentes a estes fármacos, tornou-se uma problemática global. A resistência a agentes antimicrobianos diminuiu significativamente as chances de eficácia dos tratamentos de pacientes com doenças infecciosas, resultando em um número maior de complicações e casos fatais, além de aumentar gastos públicos em sistemas de saúde (ANDERSSON; HUGHES, 2011). Uma revisão publicada por O’Neill (2014) estima que, até o ano de 2050, possa haver 10 milhões de mortes ao ano no mundo associadas à resistência antimicrobiana. Nesse âmbito, podemos aplicar o conceito de *One Health* ou Saúde Única para a vigilância em saúde.

Sabendo-se da existência da indissociabilidade entre saúde humana, zoonoses e meio ambiente, a Saúde Única pode ser conceituada como uma abordagem interdisciplinar entre profissionais, instituições e múltiplos setores da sociedade com ações, valores e conhecimentos que envolvam a saúde humana e

animal, com o intuito de mitigar os impactos ambientais (Figura 1). Este conceito surgiu pela combinação de esforços entre a Organização Mundial da Saúde (OMS), a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) e a Organização Mundial de Sanidade Animal (OIE). Assim, a abordagem Saúde Única abrange, entre outros assuntos, a disseminação, o controle e a prevenção de bactérias resistentes a antimicrobianos (DIAS, 2018).

Figura 1. Integração do conceito Saúde Única: abordagem holística, transdisciplinar e multissetorial da Saúde.



Fonte: A autora.

Diante do exposto faz-se necessário o desenvolvimento de abordagens e estudos holísticos e multidisciplinares que incorporem a expertise multifatorial para lidar com a saúde humana, animal e dos ecossistemas. Tais esforços são essenciais para a compreensão de como as rápidas mudanças ambientais no período antropoceno estão ligadas ao surgimento e reemergência de doenças infecciosas e não infecciosas (DESTOUMIEUX-GARZÓN *et al.*, 2018).

1.1. Resistência a antimicrobianos: aspectos clínicos e ambientais

1.1.1 Aspectos gerais do fenômeno de resistência a antimicrobianos

Os antibióticos apresentam propriedades inibitórias parciais ou totais sobre a multiplicação dos microrganismos. A existência dessas substâncias na natureza está relacionada ao fato de que esses compostos podem ser metabólitos utilizados

contra outros microrganismos, tendo papel na competição por nutrientes e servindo como mecanismo de defesa. Além disso, estas substâncias podem atuar como mensageiros químicos na comunicação entre os indivíduos ou, ainda, apresentar funções moduladoras de metabolismo entre comunidades microbianas, sendo assim, essenciais no processo de comunicação entre as células e funcionando como moléculas de sinalização nos ecossistemas (ALLEN *et al.*, 2010).

A ação antimicrobiana dos fármacos pode ser classificada segundo diferentes critérios, como estrutura química, mecanismo de ação e efeito sobre os microrganismos (TAVARES, 2014). Por possuírem estrutura química diversificada, é impraticável classificar os agentes antimicrobianos somente com base nestes critérios. Contudo, uma combinação de local-alvo, juntamente com a estrutura química, oferece uma classificação operacionalmente útil. Os principais mecanismos de ação dos antimicrobianos estão relacionados aos processos de biossíntese das células bacterianas. Os cinco principais locais-alvos são: (i) síntese da parede celular; (ii) síntese proteica; (iii) síntese de ácidos nucleicos; (iv) vias metabólicas e (v) função da membrana celular. A ação de um antibacteriano pode provocar dois efeitos na célula: a morte da bactéria - efeito bactericida ou a inibição da multiplicação da bactéria - efeito bacteriostático (GOERING *et al.*, 2014).

Atualmente, os antimicrobianos disponíveis no mercado são divididos, segundo o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), em várias classes: aminoglicosídeos, ansamicinas, antagonistas da síntese do folato, fosfomicinas, glicopeptídeos, lincosamidas, lipopeptídeos, macrolídeos, nitroheterocíclicos, oxazolidinonas, fenicóis, quinolonas, tetraciclina, estreptograminas e β -lactâmicos. Todos os antimicrobianos β -lactâmicos possuem um anel β -lactâmico reativo, podendo ser dividido em subgrupos que incluem: penicilinas, cefem oral e parenteral, monobactâmicos e penem.

No século XX, a utilização dos antimicrobianos na prática clínica levou à crença de que as doenças infecciosas seriam um problema solucionado, pois a terapia medicamentosa com tais substâncias demonstrou ser extremamente eficiente no controle de microrganismos patogênicos. Todavia, nas últimas décadas, vários microrganismos têm expressado mecanismos de resistência à ação dos antimicrobianos, tanto no ambiente hospitalar como no meio ambiente (WENDLANDT *et al.*, 2013; RANOTKAR *et al.*, 2014; BELLO; DINGLE, 2018).

É fato que a resistência aos fármacos antibacterianos é um fenômeno natural anterior à pressão seletiva moderna do uso desses compostos. Nesse

contexto, o incremento do fenômeno de resistência a antimicrobianos na atualidade pode estar associado a diversos fatores, incluindo o uso extensivo e, muitas vezes, inapropriado dos antimicrobianos na prática clínica humana e veterinária, agricultura e pecuária. Assim, há um acréscimo desses compostos juntamente com outros resíduos antropogênicos no meio ambiente, que alteram a biodiversidade dos ecossistemas microbianos (BUELOW; PLOY; DAGOT, 2021).

1.1.2 Mecanismos de resistência a antimicrobianos

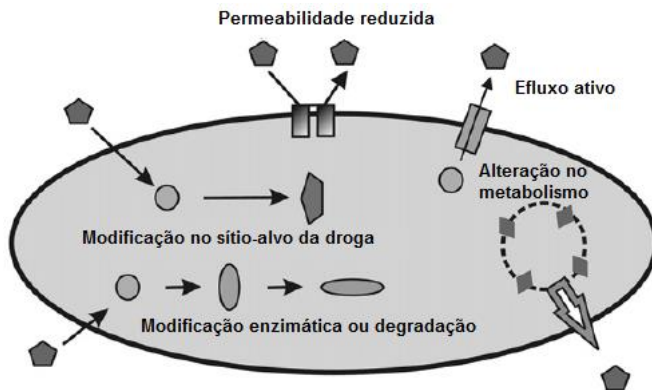
A resistência bacteriana a antimicrobianos começou a ser relatada após a introdução desses medicamentos na prática terapêutica. No final da década de 1930, havia relatos de microrganismos resistentes às penicilinas, sulfonamida e estreptomicina (DAVIES; DAVIES 2010). A resistência bacteriana pode ser caracterizada como: (i) intrínseca ou natural, associada à ausência de receptores ou à existência de estruturas e mecanismos que impedem a ação do fármaco. Nesse caso, a tendência é que a maioria das amostras daquele grupo sejam resistentes aos antimicrobianos de uma determinada classe; (ii) extrínseca ou adquirida, mediada pela aquisição de material genético novo ou mutações cromossômicas, que resultam em modificações na estrutura e no funcionamento da célula bacteriana, proporcionando o surgimento de resistência a um ou vários antimicrobianos numa população originalmente sensível (GOERING *et al.*, 2014; TAVARES, 2014). Nesse contexto, a resistência antimicrobiana pode ser considerada um fenômeno natural de evolução dos microrganismos, mediada por mutações e recombinações.

A recombinação genética é caracterizada pela transferência horizontal de genes, seja por: (i) transformação - algumas bactérias são capazes de captar, integrar e expressar funcionalmente fragmentos de DNA exógeno encontrado livre no ambiente, originado de amostras doadoras previamente mortas; (ii) conjugação - transferência de DNA através do contato célula-célula, por meio do *pili* ou de adesinas da superfície celular e (iii) transdução - o transporte do DNA da célula doadora para a célula receptora ocorre por meio de bacteriófagos. Assim, a disseminação da resistência a antimicrobianos pode ocorrer pela transferência/captação de DNA, quer seja de fragmentos do cromossomo (mais rara) ou dos chamados elementos genéticos móveis (WOZNIAK; WALDOR, 2010; HOLMES *et al.*, 2016;).

Nesse contexto, a resistência bacteriana a antimicrobianos é conferida por cinco mecanismos principais (Figura 2): (i) modificação no local de ação do fármaco;

(ii) modificação enzimática ou degradação do antimicrobiano; (iii) efluxo ativo do antimicrobiano para fora da célula; (iv) permeabilidade reduzida ao agente antimicrobiano, que restringe seu acesso ao sítio de ação; (v) aquisição de vias metabólicas alternativas (VRANAKIS *et al.*, 2014).

Figura 2. Principais mecanismos de resistência a antimicrobianos.



Fonte: Adaptado de Vranakis *et al.* (2014).

A presença de genes que codificam resistência a antimicrobianos localizados em elementos genéticos móveis, tais como, plasmídeos, transpósons e elementos conjugativos integrativos - ICEs (do inglês *Integrative and Conjugative Elements*) permite a mobilização destes marcadores de resistência e também de *integrans*, de uma célula bacteriana para outra. Este evento é de grande importância epidemiológica, devido à capacidade de ampliar a resistência antimicrobiana em diferentes populações e comunidades bacterianas (GOERING *et al.*, 2014; BELLO; DINGLE, 2018). A Tabela 1, a Tabela 2 e a Tabela 3 apresentam os principais genes relacionados à resistência, suas localizações, mecanismos de resistências associados e classes de antimicrobianos afetadas em bactérias Gram-negativas, *Staphylococcus* spp. e *Enterococcus* spp., respectivamente.

Tabela 1. Principais genes associados à resistência a antimicrobianos em bactérias Gram-negativas.

Gene	Localização	Mecanismo de resistência	Classe de antimicrobiano
<i>aac(3)-, aac(6)-, ant(2)-, aph(3)-</i>	Cromossomo Plasmídeo	Inativação enzimática	Aminoglicosídeos
<i>acrAB, tolC, adeABC, mex, sdeAB, sdeCDE, smeABC, vcaM, macAB, emrAB, norM, ydhE, emrE, qac, sugE, mex, adeABC, marA, yhiV, soxX, mdfA, mtrCDE</i>	Cromossomo Plasmídeo	Efluxo ativo	Várias classes
<i>bla_{TEM}, bla_{SHV}, bla_{CTX-M}, bla_{KPC}, bla_{SME}, bla_{NMC}, bla_{IMI}, bla_{GES}, bla_{NDM}, bla_{VIM}, bla_{IMP}, bla_{GIM}, bla_{SIM}, bla_{CMY}, bla_{MIR}, bla_{MOX}, bla_{LAT}, bla_{FOX}, bla_{DHA}, bla_{ACT}, bla_{ACC}, bla_{CFE}, bla_{OXA}</i>	Cromossomo Plasmídeo	Inativação enzimática	β-lactâmicos
<i>gyrA, gyrB, qnr, parC, parE</i>	Cromossomo Plasmídeo	Modificação no sítio-alvo da droga	Fluoroquinolonas
<i>sul1, sul2, drf</i>	Plasmídeo	Modificação no sítio-alvo da droga	Sulfametoxazol Trimetoprima
<i>Mcr</i>	Plasmídeo	Modificação no sítio-alvo da droga	Peptídeos catiônicos
<i>rmtA, rmtB, rmtC, armA</i>	Plasmídeo	Modificação no sítio-alvo da droga	Aminoglicosídeos

Fonte: Adaptado de BELLO; DINGLE, 2018.

Tabela 2. Principais genes associados à resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus* spp.

Gene	Localização	Mecanismo de resistência	Classe de antimicrobiano
<i>aacA-aphD, aadD, aadE, aphA3, str</i>	Cromossomo Plasmídeo Transpósons	Inativação enzimática	Aminoglicosídeos
<i>BlaZ</i>	Cromossomo Plasmídeo Transpósons	Inativação enzimática	β -lactâmicos - penicilinas (exceto isoxazolil penicilinas)
<i>cat_{pC221}, cat_{pC223}, cat_{pC194}</i>	Plasmídeo	Inativação enzimática	Quinolonas
<i>dfrA (dfrS1), dfrD, dfrG, dfrK</i>	Cromossomo Plasmídeo Transpósons	Modificação no sítio-alvo da droga	Trimetropim
<i>ermA, ermC, ermF, ermT, erm(33), erm(43)</i>	Cromossomo Plasmídeo Transpósons	Modificação no sítio-alvo da droga	Macrolídeos Lincosamidas Estreptogaminas
<i>FexA</i>	Cromossomo Plasmídeo Transpósons	Efluxo ativo	Cloranfenicol
<i>inu(A), inu(B)</i>	Plasmídeo Cromossomo	Inativação enzimática	Lincosamidas
<i>mecA, mecC (mecA_{LGA251})</i>	Cromossomo	Modificação no sítio-alvo da droga	β -lactâmicos
<i>sat4</i>	Plasmídeo Transpósons	Inativação enzimática	Estreptomicina
<i>tet(K), tet(L)</i>	Plasmídeo	Efluxo ativo	Tetraciclinas (exceto minociclina e gliciliclinas)
<i>tet(M)</i>	Cromossomo Transpósons	Modificação no sítio-alvo da droga	Tetraciclinas (incluindo minociclina e excluindo gliciliclinas)
<i>vga(A), vga(A)</i>	Cromossomo Plasmídeo Transpósons	Efluxo ativo	Lincosamidas Estreptogaminas

Fonte: Adaptado de Wendlandt *et al.* (2013).

Tabela 3. Principais genes associados à resistência a antimicrobianos em *Enterococcus* spp.

Gene	Localização	Mecanismo de resistência	Classe de antimicrobiano
<i>vanA</i> e <i>vanB</i>	Plasmídeo Transpósons	Modificação no sítio-alvo da droga	Glicopeptídeos
<i>vanC</i> , <i>vanD</i> e <i>vanE</i>	Cromossomo		

Fonte: Adaptado de Ranotkar *et al.* (2014).

1.1.3 Resistoma

A diversidade do microbioma global representa um universo extenso e ainda pouco explorado, pois é estimado que uma parcela ínfima dos microrganismos seja capaz de se multiplicar empregando-se os métodos de cultivo e isolamento utilizados até então. No entanto, com o advento das técnicas independentes de cultivo, foi possível transpor essa barreira e acessar a totalidade de células procarióticas presentes em amostras ambientais. Assim, novas abordagens para o conhecimento dos determinantes genéticos associados à resistência a antimicrobianos tornaram-se possíveis por meio da utilização das técnicas de genética molecular, metagenômica e bioinformática (CROFTS; GASPARRINI; DANTAS, 2017).

O pangenoma microbiano abrange o conjunto de genes presentes em todas as células procariontes da biosfera. A porção do pangenoma que contém os genes associados à resistência antimicrobiana dos microrganismos pertencentes a um dado local é chamada de resistoma (GILLINGS, 2013).

O resistoma envolve além de genes associados a resistência intrínseca e adquirida, os genes denominados ocultos ou de proto-resistência. Os genes de proto-resistência não conferem resistência fenotípica em sua forma original. Entretanto, os mesmos podem tornar-se genes de resistência por meio de mutações ou modificações na sua expressão (GILLINGS, 2013; MARTÍNEZ; COQUE; BAQUERO, 2015).

A porção móvel do pangenoma, o mobiloma, é capaz de gerar enorme diversidade nos genomas procariontes, seja por meio de plasmídeos, transpósons ou ICEs. Isso porque, nesses elementos genéticos móveis, o resistoma pode ser amplamente difundido pela transferência horizontal de genes (GILLINGS, 2013).

Por se tratarem de metabólitos secundários naturais do metabolismo bacteriano, era esperado que antibióticos fossem encontrados em baixas

concentrações em amostras ambientais. Assim, devido a ubiquidade de produção dos antibióticos no meio ambiente, os mecanismos de defesa contra os mesmos, também são antigos, em especial, os ARGs (CROFTS; GASPARRINI; DANTAS, 2017). Em 1973, Benveniste e Davies evidenciaram a presença de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos tanto em *Actinomyces* como em bastonetes Gram-negativos patogênicos. Ainda, um estudo realizado por Forsberg *et al.* (2014) demonstrou a similaridade de ARGs encontrados em amostras de solos e amostras bacterianas de relevância clínica.

Portanto, o estudo do resistoma, com ênfase no mobiloma, é essencial para melhor compreendermos o papel dos distintos ecossistemas como reservatórios e possíveis disseminadores de ARGs (BERENDONK *et al.*, 2015).

1.1.4 Elementos genéticos móveis e *integrons*

Pouco depois do início da antibioticoterapia, foi observada a existência de bactérias resistentes a múltiplos antimicrobianos. Tal fato demonstrou que a emergência de linhagens resistentes não estaria relacionada somente à ocorrência de mutações. Isso porque, as mutações seriam consideradas além do potencial evolutivo de uma determinada população bacteriana (MAZEL, 2006). Nesse contexto, os estudos relacionados a elementos genéticos transferíveis revelaram que esses são os impulsionadores da disseminação da resistência a antimicrobianos (FROST *et al.*, 2005; BOTELHO; SCHULENBURG, 2020).

Os plasmídeos são fragmentos de DNA bacteriano extracromossômicos, que contêm informações não essenciais para a sobrevivência celular, podendo replicar-se independentemente do cromossomo e migrar para outras células bacterianas. Geralmente, os plasmídeos carregam genes que conferem vantagem seletiva às bactérias em condições de estresse. Já foram descritos genes plasmidiais que conferem resistência às principais classes de antimicrobianos, incluindo β -lactâmicos, macrolídeos, quinolonas, aminoglicosídeos, tetraciclinas, cloranfenicol e sulfonamidas (MATHERS; PEIRANO; PITOUT, 2015).

Os transpósons são elementos genéticos transponíveis, com capacidade de autorreplicação. Carreiam, além das sequências de inserção necessárias à sua transposição, os ARGs, por exemplo (WOZNIAK; WALDOR, 2010; BOTELHO; SCHULENBURG, 2020). Embora possam ser transpostos por meio da conjugação

(transpósons conjugativos), os mesmos não possuem uma forma extracromossomal replicativa autônoma, assim, integram-se ao cromossomo de seus hospedeiros.

Os ICEs são um grupo diversificado de elementos genéticos móveis, dentre eles, os transpósons conjugativos, caracterizados pela capacidade de integração ao e excisão do cromossomo bacteriano. São transmitidos tanto por replicação celular, quando ligados ao cromossomo bacteriano, como por conjugação. Isso porque os ICEs podem separar-se do cromossomo do hospedeiro, ser mobilizados e, então, integrados ao cromossomo do microrganismo receptor (WOZNIAK; WALDOR, 2010). Atualmente, vários estudos têm verificado a importância dos ICEs para a evolução do genoma microbiano. Esses elementos fornecem funções adaptativas ao seu hospedeiro, aumentando, assim, a plasticidade e diversificação do genoma, por meio de genes que conferem, por exemplo, resistência a antimicrobianos, metais e bacteriófagos (FROST *et al.*, 2005; BURRUS, 2017; BOTELHO; SCHULENBURG, 2020).

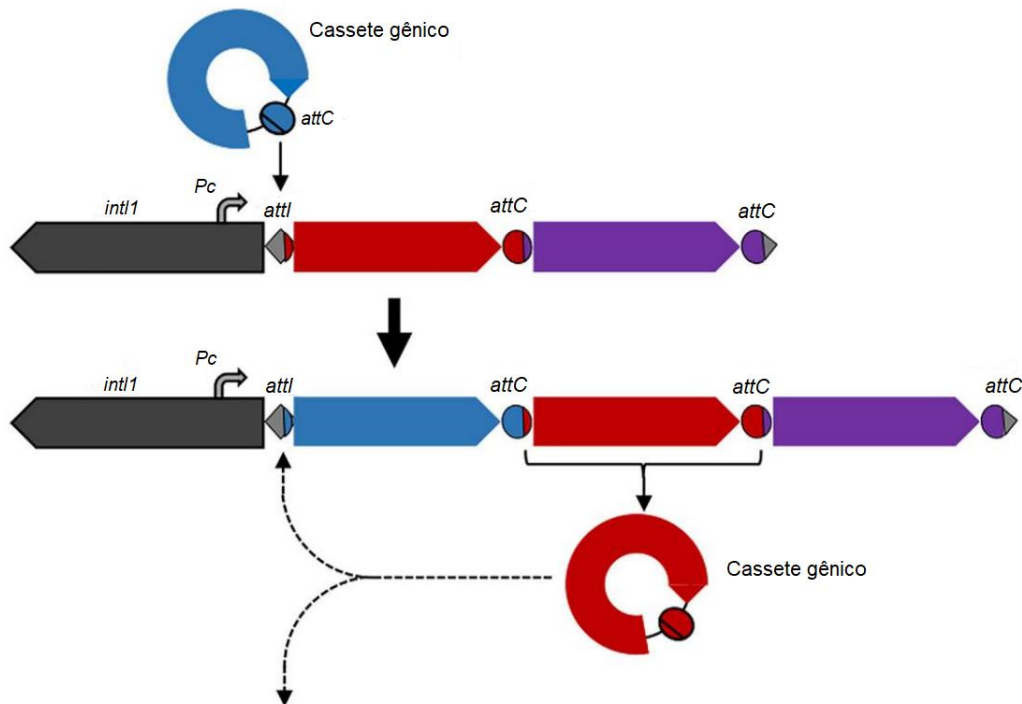
Os *integrons* são descritos como sistemas de clonagem e expressão gênica eficientes, com capacidade de integrar distintos ARGs e disseminá-los entre populações bacterianas. Isso porque os *integrons* são plataformas de montagem capazes de incorporar fases abertas de leitura (*open reading frames*, ORFs) por meio de recombinação sítio específica, convertendo as OFRs em genes funcionais (MAZEL, 2006).

A estrutura funcional de um *integron* consiste em: um gene codificador de uma recombinase sítio-específica, denominada integrase (*intI*), um sítio primário de recombinação (*attI*), localizado proximalmente, e um promotor (Pc), que controla a expressão dos genes capturados. A integrase catalisa a recombinação entre o sítio *attI* e um segundo sítio chamado *attC*. O sítio *attC* é normalmente associado a uma ORF de fita simples circular, formando uma estrutura chamada cassete gênico (Figura 3). Os cassetes gênicos não possuem um promotor, logo, os *integrons* são essenciais para a transcrição desses genes (MAZEL, 2006; GHALY *et al.*, 2020).

Abordagens de metagenômica evidenciaram uma diversidade de classes de *integrons* localizados principalmente nos cromossomos bacterianos. Sua classificação ocorre segundo as sequências de aminoácidos das integrases. Os *integrons* cromossômicos possuem uma variedade de cassetes gênicos, que por sua vez, codificam genes de função desconhecida. Ademais, esses *integrons* possuem sítios *attC* conservados em sequência e estrutura secundária e já foram relatados em vários filos bacterianos, em especial, em Proteobacteria. Já os *integrons* mobilizáveis

das classes 1 (*int1*), 2 (*int2*) e 3 (*int3*) são normalmente descritos em ambientes naturais e clínicos (GHALY *et al.*, 2021).

Figura 3. Estrutura e atividade do *integron*.



Fonte: Adaptado de Ghaly *et al.* (2020).

A maioria dos *integrons* descritos até o momento pertencem à classe 1. Os *int1* geralmente apresentam na região conservada 3'CS um gene que codifica resistência a compostos de amônio quaternário (*qacEΔ1*) e um gene de confere resistência à sulfonamida (*su1*) (AMOS *et al.*, 2018). Variados cassetes já foram identificados em *int1*. Entre eles, elementos que conferem resistência a β-lactâmicos, aminoglicosídeos, cloranfenicol, trimetoprim, estreptotricina, rifampicina, eritromicina, fosfomicina, lincomicina e compostos de amônio quaternário (STADER *et al.*, 2012).

Atualmente, há estudos que relatam a presença de *integrons*, principalmente *int1*, em amostras bacterianas isoladas de indivíduos doentes, solos, águas superficiais, sedimentos e efluentes (WRIGHT *et al.*, 2008; STADER *et al.*, 2012; McGIVERN *et al.*, 2021; QUINTELA-BALUJA *et al.*, 2021). No meio ambiente, além de ARGs, os *integrons* podem expressar genes relacionados à adaptação das comunidades bacterianas em resposta a pressões ambientais. Um único *integron* pode conter diversos genes relacionados a processos metabólicos e celulares, que podem ser mobilizados, reorganizados e disseminados entre as bactérias. Como consequência, os *integrons* desempenham um papel importante na evolução do

resistoma e na adaptação dos microrganismos (SANDOVAL-QUINTANA; LAUGA; CAGNON, 2022).

Nesse contexto, a poluição causada pela ação antrópica, associada a metais pesados, pesticidas, medicamentos, efluentes e outras substâncias tóxicas, pode alterar o resistoma e promover o surgimento e incremento de ARGs no meio ambiente (SIDRACH-CARDONA *et al.*, 2014; CHAMOSA *et al.*, 2017; STALDER *et al.*, 2019). Isso porque os domínios Bacteria e Archaea são os principais responsáveis pela biorremediação nos ecossistemas. Alguns grupos de microrganismos são metabolicamente ativos em ambientes com pH, temperatura e sanilidade extremas. Ademais, os procariontes desenvolveram mecanismos adaptativos para reduzir a quantidade e disponibilidade de metais tóxicos, xenobióticos e poluentes no ambiente. Os mecanismos elucidados estão relacionados a bombas de efluxo, canais iônicos de ligação e transporte de metais na parede celular, mecanismos de biotransformação, modificação química, presença de genes de resistência a metais e ARGs (MOHAPATRA *et al.*, 2011; MENEZES; CLIPSON; DOYLE, 2012; YAN jinget *al.*, 2020).

Análises de metagenômicas do Rio Yamuna, um dos rios mais poluídos da Índia, evidenciaram modificações no microbioma ribeirinho relacionadas à captação de vários efluentes provenientes de atividades antrópicas, como produtos químicos, metais pesados e esgoto. Dentre os genes encontrados, destacam-se aqueles relacionados ao metabolismo de nitrogênio e enxofre, resistência a metais, vias de degradação de compostos aromáticos como tolueno, xileno, benzeno e fenol. Os resultados demonstraram uma variedade de ARGs juntamente com antimicrobianos de amplo espectro (MITTAL *et al.* 2019).

Finalmente, estabelecer uma relação entre as atividades antrópicas e as mudanças no meio ambiente é uma tarefa difícil. Isso porque, temos uma multiplicidade de variáveis envolvidas no processo (COLLIER *et al.*, 2019). Assim, estudos integrativos no âmbito da Saúde Única são essenciais para esclarecer as possíveis consequências das atividades antrópicas nos ecossistemas.

1.1.5 Atividades antrópicas e a emergência da disseminação de genes associados à resistência a antimicrobianos

Apesar de se tratar de um fenômeno natural, nos últimos anos, a evolução e a propagação da resistência bacteriana a antimicrobianos tornaram-se alarmantes, pois tais fenômenos têm ocorrido mais rapidamente que a conscientização sobre o controle do uso de antimicrobianos e o desenvolvimento de novos fármacos (DROPA, 2012).

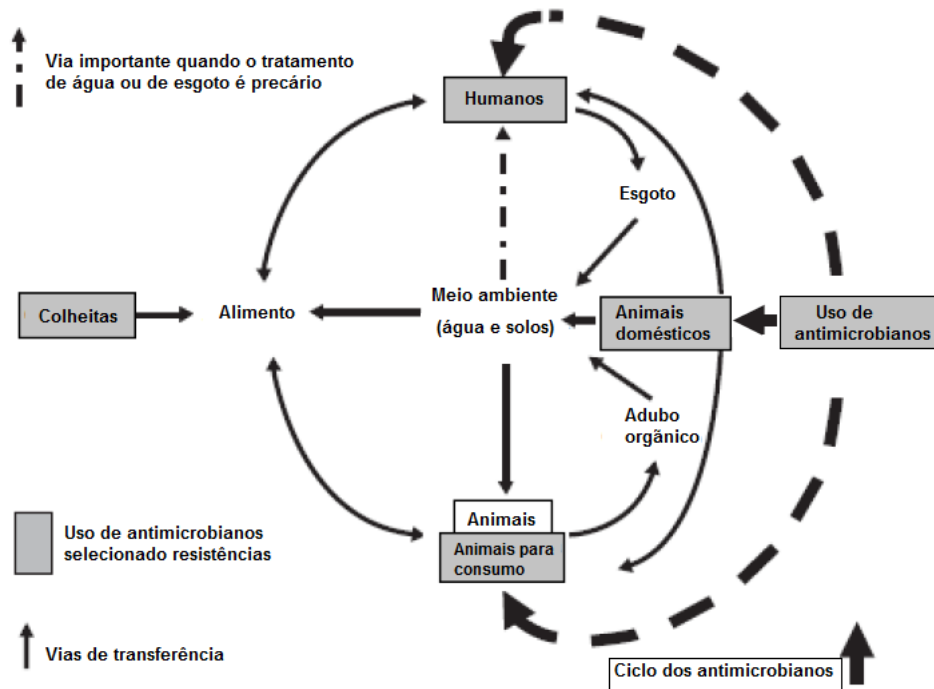
O uso inadequado de antibacterianos no curso de infecções virais, fúngicas ou parasitárias e a administração de antimicrobianos em doses abaixo das recomendadas na clínica médica são fatores que podem levar a um aumento de populações bacterianas resistentes. Subdoses de antimicrobianos também selecionam mutações e recombinações genéticas nas bactérias expostas (DROPA, 2012; BEN *et al.*, 2019).

Fatores preponderantes para a disseminação de resistência antimicrobiana estão relacionados à utilização extensiva desses fármacos na agricultura, na criação, na profilaxia e no tratamento de animais (GARCIA-ALVAREZ *et al.*, 2012; CYCON; MROZIK; PIOTROWSKA-SEGET, 2019). Isso porque as mesmas classes de antimicrobianos utilizadas para esses fins são empregadas na medicina humana (ANTONELLI *et al.*, 2019).

O controle da disseminação da resistência bacteriana aos antimicrobianos requer um esforço multidisciplinar sobre o entendimento da distribuição dos ARGs que codificam esta propriedade em amostras de bactérias de fontes clínicas e não clínicas, como alimentos e matrizes ambientais. Ademais, é preciso avaliar como as atividades antrópicas afetam esta distribuição. Nesse contexto, na atualidade, vários estudos têm buscado compreender melhor o papel do ambiente na origem, transmissão e perpetuação dos ARGs (MARTI *et al.*, 2018; SEMEDO-LEMSADDEK *et al.*, 2018; MILAKOVIC *et al.*, 2019; SANDERSON *et al.*, 2019; BALBIN *et al.*, 2020).

A Figura 4 mostra as principais vias de transferência de ARGs entre seres humanos, animais, alimentos e ambiente.

Figura 4. Principais vias de transferência de genes associados à resistência a antimicrobianos.



Fonte: Adaptado de Garcia-Alvarez *et al.* (2012).

O ambiente é um importante reservatório de ARGs. Bactérias resistentes podem estar em sítios como pele e trato digestivo de seres humanos e outros animais e, principalmente, em esgotos (WENDLANDT *et al.*, 2013; AUGUET *et al.*, 2017; JING; YAN, 2020). Nesse âmbito, o aumento exponencial das populações humanas e a globalização promovem destruição de *habitats* e perda de biodiversidade. Dessa forma, surgem pressões antropogênicas capazes de alterar os padrões de transmissão das doenças, promover o acúmulo de poluentes tóxicos e a invasão de espécies exóticas, viabilizando, assim, a disseminação de novos patógenos e microrganismos resistentes a antimicrobianos entre animais silvestres, animais domésticos e seres humanos (AGUIRRE, 2009).

Na contemporaneidade, o setor de mineração exerce uma enorme pressão seletiva no meio ambiente e sua permanência suscita discussões sobre a utilização sustentável dos recursos minerais, pensando-se na sua importância econômica e na mitigação dos impactos ambientais gerados pela atividade. A extração, elaboração e beneficiamento de minerais, sejam eles carvão, petróleo, gás natural e minérios (ouro, prata, ferro, bauxita, manganês, nióbio), são essenciais para o fornecimento de matéria-prima para outros setores da indústria, como, por exemplo, a indústria

automobilística, ferroviária, naval, de eletrodomésticos e construção civil (CARVALHO; MESQUITA; ARAÚJO, 2016).

A degradação ambiental gerada pela atividade mineradora está relacionada à supressão da cobertura vegetal, poluição do ar e alterações na quantidade e qualidade dos recursos hídricos (MACDONALD *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2019). Nessa circunstância, um dos impactos ambientais mais graves associados à mineração é a geração de drenagem ácida de minas (DAM). A DAM é caracterizada por baixos valores de pH, altas concentrações de sulfato e cátions metálicos em concentrações superiores àquelas normalmente encontradas em ambientes naturais. É gerada por reação de oxidação de minerais sulfetados em presença de água e oxigênio atmosférico (MELLO; DUARTE; LADEIRA, 2014).

As soluções ácidas provenientes da DAM, ao penetrarem em solos e rochas, podem solubilizar alguns elementos químicos presentes, como os íons metálicos arsênio (As), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cobre (Cu), cromo (Cr), manganês (Mn) e zinco (Zn), dentre outros. Os metais As, Cd, Cu, Pb e Zn são potencialmente tóxicos. Assim, a dispersão e contaminação dos solos, águas superficiais e águas subterrâneas pela DAM ocasiona a perda de habitats e biodiversidade (SMUCKER; DRERUP; VIS, 2014; HAN *et al.*, 2017; DEAN *et al.*, 2019), bioacumulação (JIA *et al.*, 2018) e riscos à saúde pública (EDELSTEIN; BEN-HUR, 2018; SUN; HU; CHENG, 2020; YAN BO *et al.*, 2020).

Outro agravante da contaminação e acumulação de metais no meio ambiente é a possibilidade de cosseleção de resistência bacteriana a múltiplos antimicrobianos. Uma vez que os metais não são biodegradáveis, a contaminação ambiental por estes elementos químicos pode funcionar como uma pressão de seleção de longo prazo ocasionando mudanças e consequências ambientais duradouras, inclusive sobre o resistoma. Assim, o aumento de respostas adaptativas que alteram a fisiologia celular bacteriana pode provocar o incremento e a disseminação de ARGs (KNAPP *et al.*, 2017).

1.1.6 Mineração e metais: a possível cosseleção de genes associados à resistência a múltiplos antimicrobianos

Os ecossistemas impactados pela mineração atuam como potenciais promotores de estresse. Em relação aos metais, a acumulação desses elementos no meio ambiente possibilita a cosseleção de resistência bacteriana a antimicrobianos. A cosseleção em bactérias ocorre por dois mecanismos, a saber: corresponsistência e resistência cruzada.

A corresponsistência em bactérias é caracterizada pela presença de diferentes genes de resistência em um mesmo elemento genético móvel, como plasmídeos e transpósons, e também, nos elementos mobilizáveis, ou seja, nos *integrons*. Assim, os procariontes apresentam resistência a diferentes compostos simultaneamente. Vários estudos em ambientes impactados pela mineração evidenciaram a presença de ARGs e genes que codificam resistência a metais em bactérias (IMRAN; DAS; NAIK, 2019, CHEN *et al.*, 2020; LIU *et al.*, 2021; ZOU *et al.*, 2021).

Já foi verificado que baixas concentrações de metais são capazes de promover a transferência horizontal de ARGs em procariontes por meio de alterações fisiológicas, bioquímicas e genômicas. Essas alterações incluem: a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) intracelular, aumento da permeabilidade da membrana celular, indução de estresse oxidativo por meio da resposta SOS e expressão alterada de genes envolvidos na transferência conjugativa (ZHANG YE *et al.*, 2018; ZHAO *et al.*, 2019; LU *et al.*, 2020). Nesse contexto, a relação entre resistência a metais e antimicrobianos foi comprovada em testes de suscetibilidade realizados em laboratório. Assim, o aumento da concentração de metais foi associado à elevação da frequência de resistência a esses fármacos (FERNANDEZ-CALVINO; BAATH, 2013; ZHANG MENGLU *et al.*, 2020).

Estudos sobre a cosseleção de resistência a biocidas, metais e antimicrobianos foi evidenciada por Pal *et al.* (2015) numa abordagem de bioinformática em grande escala, com base na análise de genomas bacterianos disponíveis publicamente. Os dados evidenciaram que espécies bacterianas clinicamente importantes estão propensas a carrear simultaneamente ARGs e genes que conferem resistência a metais. Outra análise bibliométrica realizada por Poole (2017) demonstrou a simultaneidade entre a multirresistência a antimicrobianos em alguns patógenos de relevância clínica e a presença de genes relacionados à resistência aos metais Cu e Zn.

Ohore *et al.* (2019) evidenciaram uma correlação significativa entre a existência de ARGs, especialmente aqueles que conferem resistência a sulfonamidas e tetraciclinas, e a presença de metais como Fe, Mn, Cr, Cu, Zn em amostras de sedimentos provenientes do lago Taihu, localizado na China.

Por meio da resistência cruzada, as bactérias adquirem resistência simultânea a diferentes compostos por meio de um único mecanismo. Pensando-se em metais e antimicrobianos, a aquisição de proteínas transmembranas, capazes de atuar no efluxo de substâncias contra um gradiente de concentração, juntamente com a redução da permeabilidade da membrana celular, aquisição de vias metabólicas alternativas ocasionadas pela presença dos metais podem promover a resistência a antimicrobianos (BAKER-AUSTIN *et al.*, 2006; YAN CHANGCHUN *et al.*, 2020a).

Por serem os responsáveis por numerosas transformações orgânicas e inorgânicas, ciclos geoquímicos de energia e de nutrientes na natureza, os estudos e a identificação da diversidade filogenética e mecanismos ecofisiológicos dos procariontes é uma premissa nos dias de hoje. Compreender os mecanismos envolvidos nesses processos são essenciais para a promoção de políticas ambientais sustentáveis no contexto da Saúde Única (SHARMA; DANGI; SHUKLA, 2018; ANUSHA; NATARAJAN, 2020; ZHANG HANYAN *et al.*, 2020; YAN CHANGCHUN *et al.*, 2020b).

1.2.A bacia hidrográfica do Rio Doce

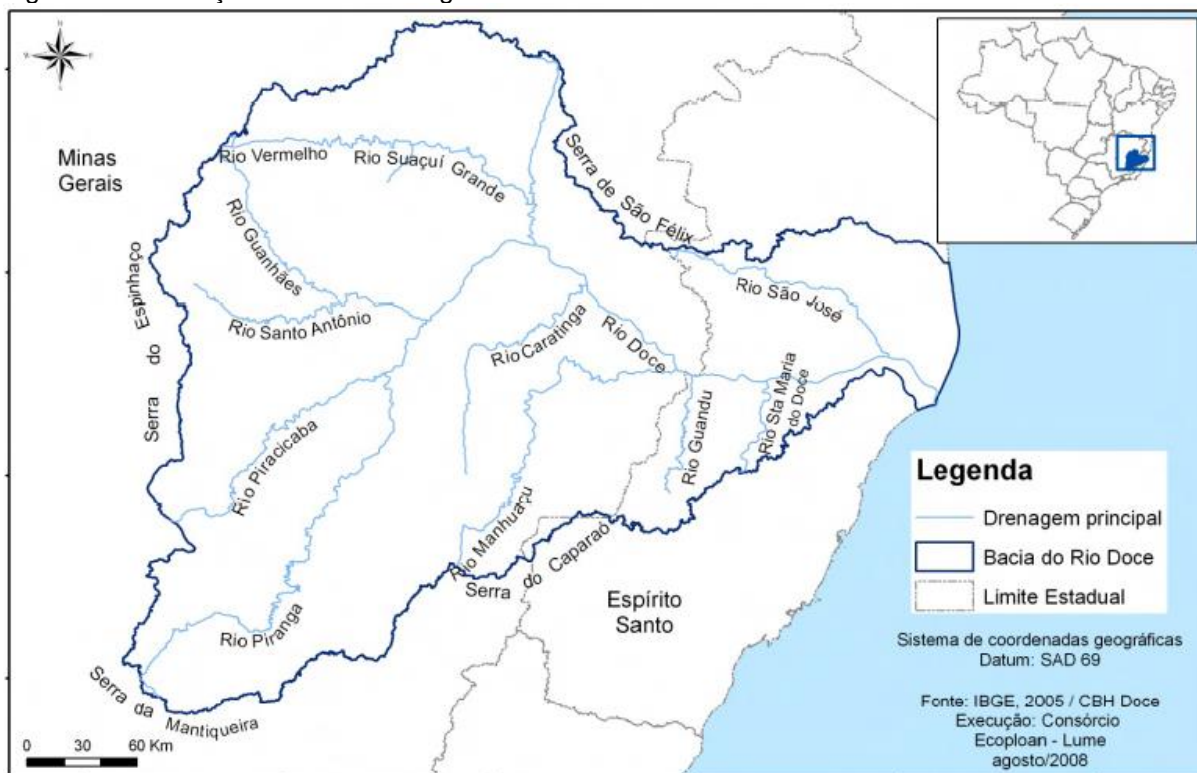
1.2.1. Particularidades da bacia hidrográfica do Rio Doce

A bacia hidrográfica do Rio Doce (BHRD) está localizada na região Sudeste do Brasil, entre os estados de Minas Gerais e Espírito Santo, abrangendo um total de 230 municípios e cerca de 3,5 milhões de habitantes. Possui uma extensão total de 853 km e uma área de drenagem de aproximadamente 83.465 km². Mais de 80% da totalidade dessa bacia pertencem ao estado de Minas Gerais (Plano integrado de recursos hídricos da bacia hidrográfica do Rio Doce e planos de ações para as unidades de planejamento e gestão de recursos hídricos no âmbito da bacia do Rio Doce - PIRH-DOCE, 2010). As nascentes do Rio Doce situam-se nas serras da Mantiqueira e do Espinhaço e suas águas percorrem cerca de 850 km, até atingirem o oceano Atlântico (Figura 5).

A BHRD é reconhecida mundialmente como um *hotspot* de biodiversidade, pois a sua área abrange os biomas Mata Atlântica e Cerrado. Além disso, a bacia está situada em uma área de alta relevância econômica, principalmente no que se refere às atividades agrícolas, industriais e de mineração, como produção de laticínios, celulose e aço (DAVILA *et al.*, 2020).

As atividades econômicas efetuadas ao longo da BHRD são diversas e estão relacionadas com agropecuária, agroindústria, mineração, comércio e geração de energia elétrica. As sub-bacias do Rio Piranga e do Rio Piracicaba, abrigam o maior complexo siderúrgico da América Latina, conhecido como Quadrilátero de Ferro. Esse complexo juntamente com as indústrias de celulose são responsáveis por uma expressiva parcela das exportações brasileiras de minério de ferro, aço e celulose. Entretanto, ao longo de toda a extensão da BHRD, verifica-se uma acentuada desigualdade socioeconômica entre os municípios, pois o crescimento das atividades econômicas ocorreu de forma desigual. Os indicadores sociais e econômicos de uma parte significativa dos municípios da bacia mostram que quase uma centena deles são classificados como municípios pobres (PIRD-DOCE, 2010).

Figura 5. Localização da Bacia Hidrográfica do Rio Doce.



Fonte: PIRH-DOCE, 2010.

A urbanização e o desmatamento indiscriminado somados aos despejos inadequados de resíduos, sejam eles esgotos domésticos, de atividades agrícolas ou industriais, são responsáveis pelo assoreamento contínuo dos leitos dos rios da bacia (Agência Nacional de Águas - ANA, 2016).

Com relação ao esgotamento sanitário na BHRD, a situação é preocupante. Isso porque a população de aproximadamente 3,5 milhões de habitantes, concentradas predominantemente em áreas urbanas, gera uma quantidade significativa de rejeitos domésticos, sendo que, dos 211 municípios com sede na bacia, apenas 21 dispõem de algum tipo de tratamento de esgotos, cobrindo uma pequena parcela da população total (PIRD-DOCE, 2010).

A mineração é uma atividade secular, tradicional e economicamente relevante para o estado de Minas Gerais. Nos dias atuais, existe uma preocupação com a exaustão das reservas minerais. Tal fato tem fomentado estudos e discussões a respeito dos impactos ambientais, sociais e de saúde pública gerados pela mineração no estado após décadas de exploração (REZENDE, 2016).

A mineração histórica de ouro no Quadrilátero Ferrífero fomentou estudos relacionados aos impactos ambientais da atividade na região, com destaque aos relacionados à contaminação do meio ambiente em longo prazo com As. A disseminação de grandes quantidades de As no meio ambiente, estão relacionadas as atividades antropogênicas. O tratamento e a fundição do minério de ouro possibilitam a oxidação, a separação e a exposição do As. Assim, durante 300 anos, a região do Quadrilátero de Ferro recebeu nos sistemas de drenagens de águas, aproximadamente 390.000 toneladas de rejeitos de minérios contaminados com As (BORBA *et al.*, 2000). Tal fato acarretou uma anomalia de As na região, pois as concentrações elevadas do metal podem ser encontradas em águas superficiais, subterrâneas, solos, alimentos e em humanos (MATSCHULLAT *et al.*, 2007).

Além de As, outros metais potencialmente tóxicos como Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb e Zn também são encontrados em águas e sedimentos de rios utilizados para a agricultura e consumo humano na região do Quadrilátero de Ferro (VAREJAO *et al.*, 2011; REZENDE *et al.*, 2011). Assim, Teixeira *et al.* (2020) compilaram em sua publicação estudos científicos e dados disponíveis relacionados à contaminação de As no Brasil nas últimas décadas. A contaminação com As no meio ambiente e em humanos foi evidenciada para o município de Santana, juntamente com a região do Vale do Ribeira e o Quadrilátero Ferrífero. Segundo o levantamento, a região do Quadrilátero de Ferro é a mais impactada, com altos níveis de contaminantes

inorgânicos potencialmente tóxicos, como As, Cd, Co, Cu, Mn, Pb advindos essencialmente da atividade mineradora.

Apesar de causar inúmeras desordens relacionadas ao meio ambiente, estudos realizados em regiões mineradoras no estado de Minas Gerais, sejam minas ativas ou desativadas, demonstram a magnitude da biodiversidade ali presente e sua capacidade adaptativa. Microrganismos, plantas e fungos podem se adaptar e sobreviver nas mais variadas condições ambientais, incluindo a presença de metais tóxicos (FERNANDES *et al.*, 2018; VIEIRA *et al.*, 2018b; COELHO *et al.*, 2020). Ademais, a recuperação dos solos e da vegetação nativa torna-se viável com a aplicação de técnicas corretas de restauração (VIEIRA *et al.*, 2018a; BALESTRIN *et al.*, 2019). Tais achados são importantes para o gerenciamento das necessidades socioeconômicas relacionadas à exploração de recursos naturais e as práticas de manejo, manutenção e preservação da biodiversidade no território brasileiro.

Nesse contexto, o rompimento da barragem de Fundão, em novembro de 2015, aumentou abruptamente os impactos e riscos ambientais para vidas humanas e de outros animais, bem como de ecossistemas à curto e longo prazo na BHRD.

1.2.2. O colapso da barragem de Fundão em Mariana, Minas Gerais

A acomodação da DAM e outros rejeitos provenientes das atividades de mineração são um desafio para o Brasil e o mundo. Geralmente, diques são construídos com o próprio material residual da mineração para o armazenamento de longo prazo. No Brasil, a lei nº 12.334, de 20 de setembro de 2010, estabelece a Política Nacional de Segurança de Barragens destinadas à acumulação de água para quaisquer usos, à disposição final ou temporária de rejeitos e à acumulação de resíduos industriais (Brasil, 2010). O declive das barragens é, frequentemente, modificado pelo aumento da quantidade de rejeitos produzidos. Assim, o monitoramento contínuo da estabilidade e capacidade de armazenamento dessas infraestruturas de custos elevadíssimos durante a exploração mineral torna-se difícil (AIRES *et al.*, 2018).

Atualmente, a crescente demanda por *commodities* minerais do mercado global associada ao avanço das tecnologias modernas possibilitou a exploração extensiva de reservas minerais (CARMO *et al.*, 2017). Nesse contexto, a gestão das barragens de rejeitos é essencial para o desenvolvimento sustentável da indústria

mineradora. Ainda, é necessário mitigar os efeitos adversos relacionados à DAM e os possíveis desastres relacionados à mineração (BURRITT; CHRIST, 2018).

Em um curto intervalo de tempo, dois municípios pertencentes à região do Quadrilátero de Ferro no estado de Minas Gerais foram acometidos por desastres ambientais de repercussão global relacionados à mineração. O primeiro deles ocorreu em 5 de novembro de 2015, no município de Mariana, no qual houve o rompimento da barragem de Fundão, pertencente ao complexo mineiro Germano, sendo esse o maior desastre ambiental mundial descrito até então, segundo critérios de impactos ambientais e gerenciamento de riscos hídricos (CARMO *et al.*, 2017). Posteriormente, em 25 de janeiro de 2019, a barragem Córrego do Feijão, na cidade de Brumadinho, rompeu-se, ocasionando mais de 250 vítimas humanas fatais (THOMPSON *et al.*, 2020).

O complexo de Germano, localizado no município de Mariana, Minas Gerais, produzia 23 milhões de toneladas ao ano de concentrado de minério de ferro destinados à exportação. A megaestrutura continha três barragens de rejeitos: Santarém, Germano e Fundão. A barragem de Fundão começou a operar em 2008 e foi projetada para conter um total de 79,6 milhões de m³ de rejeitos finos ou aquosos e 32 milhões de m³ de rejeitos arenosos durante seus 25 anos de operação (CARMO *et al.*, 2017).

Com o desabamento da barragem de Fundão, aproximadamente 60 milhões de m³ de resíduos foram abruptamente descarregados na BHRD. A onda de lama inundou o distrito de Bento Rodrigues, ocasionando a morte de 19 pessoas no local, e continuou seu percurso ao longo do rio Doce e seu estuário, numa trajetória de 663,2 km, chegando, então, à costa atlântica (CARMO *et al.*, 2017; ALMEIDA *et al.*, 2018).

Os relatórios técnicos sobre as possíveis causas do maior desastre ambiental da indústria mundial de mineração concluíram que o colapso da barragem de Fundão foi ocasionado por falhas e danos estruturais que culminaram na liquefação do material que compunha a mesma. Esse fenômeno ocorre quando materiais sólidos (rejeitos arenosos) perdem sua resistência mecânica e apresentam características de fluidos (MORGENSTERN *et al.*, 2016).

1.2.3. Impactos ambientais na bacia hidrográfica do Rio Doce após o desastre da barragem de Fundão

Imediatamente após o colapso da barragem de Fundão, em novembro de 2015, e logo no início do ano de 2016, vários impactos nos recursos hídricos foram evidenciados na BHRD. Dentre eles, podemos citar: interrupção do abastecimento de água em função da degradação dos parâmetros de qualidade dos rios afetados; assoreamento e alterações morfológicas dos corpos hídricos; comprometimento e redução das atividades pesqueiras, agrícolas, de geração de energia hidrelétrica e de matérias-primas ao longo de toda a extensão da bacia e na transição com o ambiente marinho. Ademais, houve uma perturbação do equilíbrio dos ecossistemas aquáticos, ocasionando a mortandade de peixes e outros organismos (ANA, 2016; FERNANDES *et al.*, 2016). Nesse âmbito, Segura *et al.* (2016) demonstraram que amostras de lama e solo coletadas seis dias após o colapso da barragem de Fundão, na região primeiramente impactada, localizada no distrito de Bento Rodrigues, no município de Mariana, apresentavam riscos potenciais de citotoxicidade e danos ao DNA. Ainda, testes de lixiviação e extração sugeriram que os metais Al, As, Ba, Fe, Mn, Pb e estrôncio (Sr) apresentavam alto potencial de mobilização da lama para a água.

Estudos realizados por Gomes *et al.* (2017) com sedimentos coletados ao longo do estuário do Rio Doce demonstraram que a chegada da pluma de rejeitos ocasionou o predomínio de partículas de argila e o aumento das concentrações de metais-traço, como Al, Ba, Cr, Fe e Zn, em até cinco vezes em algumas áreas. A rápida sedimentação da lama de rejeitos impactou imediatamente as assembleias da macrofauna estuarina devido à perda de superfície.

Hajte *et al.* (2017) demonstraram que no início do ano de 2016, 75 dias após o derramamento da barragem de Fundão, houve um aumento substancial nas cargas suspensas de sedimentos, além de grandes deposições de resíduos ao longo da BHRD. Nas águas, houve uma maior dissolução e transporte dos metais Al, Ba e Fe. Nos sedimentos, Co, Fe, Hg e níquel (Ni) foram os metais com maiores taxas de enriquecimento, enquanto As, Ba, Cr, Cu, Mn, Pb e Zn foram abundantes em partículas suspensas. Fe, As, Hg e Mn excederam as diretrizes de qualidade para os sedimentos. Posteriormente, trabalhos desenvolvidos por Queiroz *et al.* (2018) evidenciaram resultados similares. Com relação à sua composição, os rejeitos escoados da barragem de Fundão são compostos principalmente por hidróxido de ferro associado a metais potencialmente tóxicos.

Estudos realizados com peixes larvais coletados ao longo da costa marinha brasileira, em janeiro, fevereiro e abril de 2016, sugerem que mudanças na morfologia larval, evidenciadas pela degeneração do trato digestivo, e altas concentrações de metais, como Cd, Cu, Cr, Fe, Hg, Mn e Pb nesses peixes, podem estar associadas diretamente ao escoamento de rejeitos do colapso da barragem de Fundão (BONECKER *et al.*, 2019). Nesse contexto, um estudo realizado por Lopes *et al.* (2019), relativo à espécie *Narcine brasiliensis*, obteve resultados semelhantes. Weber *et al.* (2020) demonstraram também que os resíduos minerais provenientes da barragem de Fundão causam danos hepáticos nas espécies *Hoplias intermedius* e *Hypostomus affinis* nativas da BHRD, além de induzir a expressão de proteínas e enzimas relacionadas à contaminação por metais. Outros estudos realizados ao longo da BHRD evidenciaram interferências no crescimento e desenvolvimento de plantas nativas da região, impactadas direta ou indiretamente pela onda de rejeitos (BOTTINO *et al.*, 2017; PRADO *et al.*, 2019; CRUZ *et al.*, 2020).

Impactos de curto prazo em comunidades microbianas ao longo da BHRD relacionados ao derramamento de rejeitos da barragem de Fundão foram demonstrados por um estudo de Cordeiro *et al.* (2019), que empregaram ferramentas de análises metagenômicas. Os resultados demonstraram um aumento das sequências genéticas relacionadas à patogenicidade microbiana, como motilidade, respiração, transporte de membrana e metabolismo de ferro e nitrogênio no microbioma de água doce. Ademais, em todos os genomas parciais recuperados foi evidenciada a presença de genes associados ao ciclo de Fe e resistência a metais. Outro estudo, conduzido por Reis *et al.* (2020), obteve resultados semelhantes, demonstrando-se a presença de altas concentrações dos metais Al, Fe, Mn e Mg em amostras de água e, especialmente, em sedimentos coletados ao longo da BHRD. Também, foi possível averiguar alterações no microbioma ribeirinho com a predominância de táxons relacionados com redução e oxidação de Fe.

Suhadolnik *et al.* (2022), por meio de um estudo espaço-temporal, investigaram o resistoma dos rios Carmo e Casca, pertencentes a BHRD, após 7, 30, 150 e 390 dias após o colapso da barragem de Fundão. Os resultados evidenciaram a presença de ARGs, genes que conferem resistência a metais e fatores de patogenicidade em todos os períodos de estudo, enfatizando a maior prevalência desses fatores no 7º dia após o desastre. Com o decorrer do tempo, averiguou-se que o resistoma tornou-se semelhante ao do rio Água Fria, não impactado. Além dos ARGs clinicamente relevantes, que conferem resistência a β -lactâmicos, aminoglicosídeos,

sulfonamidas, tetraciclina e colistina e *int1*, foi detectada a presença ARGs únicos, que podem ser indicadores da contaminação com minério de ferro. Portanto, esses resultados apontam para a existência de ARGs no meio ambiente e uma correlação positiva entre bactérias resistentes a metais e cosseleção de ARGs.

Desde o colapso da barragem de Fundão, o Instituto Mineiro de Gestão das Águas (IGAM), no uso de suas competências, intensificou o monitoramento da qualidade das águas e dos sedimentos dos corpos de água diretamente afetados pelo rompimento.

Em 2020, o IGAM publicou um compilado de dados sobre a qualidade das águas do rio Doce após quatro anos do rompimento da barragem de Fundão, entre os anos de 2015 e 2019. Com relação às águas superficiais, parâmetros como turbidez, sólidos totais em suspensão, Mn total, Ni total, Cr total e Zn total apresentaram aumento expressivo no ano de 2016, primeiro ano após o rompimento, devido aos efeitos imediatos da passagem da pluma de rejeitos, seguido de uma redução nos anos seguintes. Entretanto, mesmo com a redução gradativa dos níveis dos parâmetros avaliados, a situação da qualidade das águas ainda é preocupante, sendo que a recuperação da BHRD não acontecerá num curto intervalo de tempo, necessitando de intervenções e monitoramento duradouros dos vários aspectos envolvidos nos próximos anos (IGAM, 2019).

A elevação dos níveis dos parâmetros relacionados ao Fe nas águas superficiais e nos sedimentos ao longo dos quatro anos de monitoramento foram apontados como consequências diretas do colapso da barragem de Fundão, uma vez que a lama de rejeitos continha uma quantidade gigantesca de resíduos de minério de Fe a serem tratados (IGAM, 2019).

Por fim, o desastre da barragem de Fundão está inserido no contexto histórico da atividade mineradora no estado de Minas Gerais. Assim, o isolamento de uma nova linhagem do gênero *Micrococcus* na região do Quadrilátero Ferrífero, por Costa *et al.* (2015), que apresentou um repertório genômico altamente especializado, associados à presença de proteínas específicas relacionadas à resistência aos metais As, Cd, Co, Cu, Hg e Zn reforça a hipótese de que o acúmulo de metais no meio ambiente potencie a cosseleção e disseminação de ARGs ao longo da BHRD.

2. JUSTIFICATIVA

Na atualidade, a emergência de resistência a antimicrobianos é uma problemática global, visto que coloca em risco a saúde humana e animal. É fato que o uso indiscriminado de agentes antibacterianos na medicina humana e na agropecuária e os impactos ambientais relacionados às atividades antropogênicas estão acelerando a disseminação de *integrons* e ARGs, pois estes fenômenos exercem pressões seletivas nos microrganismos em diversos *habitats*. Nessa circunstância, a atividade mineradora, por sua própria natureza, torna a sustentabilidade ambiental vulnerável, devido aos riscos relacionados, em especial, à geração e ao armazenamento de grandes quantidades de rejeitos dispostos em barragens. O colapso da barragem de Fundão em 2015, no município de Mariana, Minas Gerais, teve repercussão mundial devido à magnitude dos impactos ambientais relacionados aos rejeitos minerais que atingiram a BHRD. Ademais, na região em questão, a atividade mineradora data do século XVIII, tornando-se relevante a detecção de *integrons* e ARGs em amostras de sedimentos coletadas na região. Os dados gerados por esta pesquisa contribuirão para o entendimento da disseminação de resistência a antimicrobianos em ambientes profundamente impactos pela mineração pensando-se na possibilidade de haver cosseleção de genes associados à resistência a múltiplos antimicrobianos na presença de metais.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Pesquisar, empregando-se reação de polimerização em cadeia quantitativa (q-PCR), *integrons* e ARGs em sedimentos coletados na BHRD após o colapso da barragem de Fundão, nas estações chuvosa (fevereiro) e seca (julho) de 2019.

3.2. Objetivos Específicos

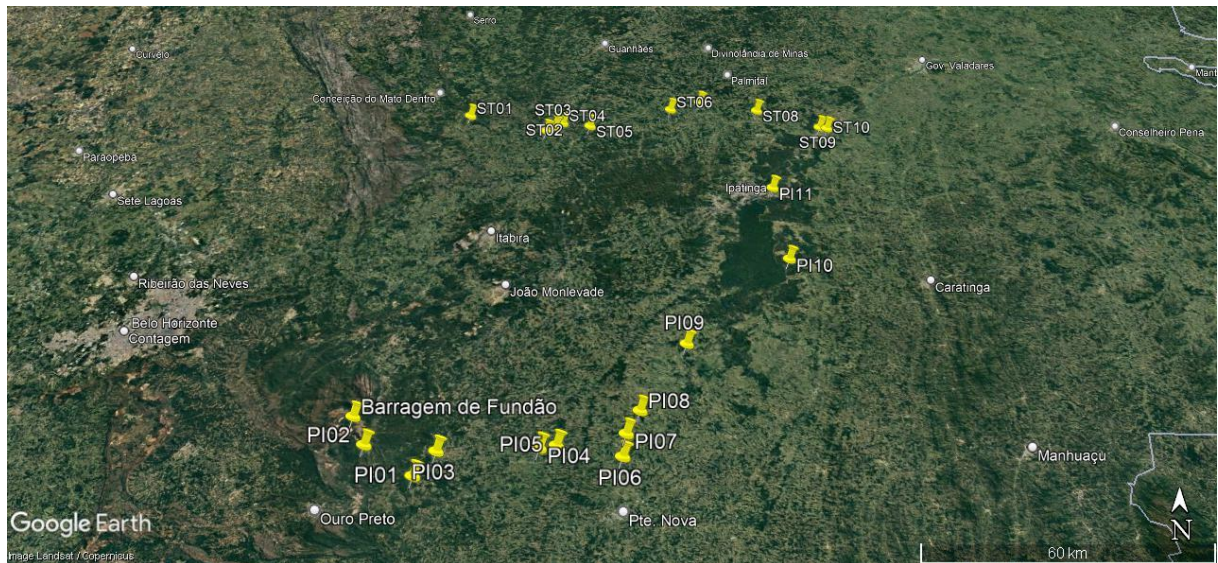
- Avaliar a eficiência e especificidade dos protocolos de q-PCR para à detecção de *integrons* e ARGs.
- Quantificar a abundância absoluta e calcular a abundância relativa nas estações chuvosa e seca de 2019.
- Verificar possíveis diferenças entre às abundâncias relativas dos marcadores nas estações chuvosa e seca de 2019.
- Verificar correlações entre os marcadores genéticos detectados nas estações chuvosa e seca de 2019.
- Calcular a prevalência dos *integrons* e ARGs nas distintas amostragens realizadas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Amostragem

As amostras de sedimento foram coletadas ao longo da drenagem da BHRD em 2019, quatro anos após o desastre da barragem de Fundão. A onda de rejeitos desse acontecimento afetou a sub-bacia do Rio Piranga (impactada), ao contrário, da sub-bacia do Rio Santo Antônio (não impactada). A Tabela 4 e a Tabela 5 mostram a localização dos pontos de amostragem nas bacias impactada e não impactada, respectivamente. Os locais foram escolhidos com base na localização dos maiores afluentes nas sub-bacias (Figura 6).

Figura 6. Mapa panorâmico da localização dos pontos de coleta de sedimentos nas sub-bacias impactada e não impactada.



Fonte: Google Earth, 2022.

Tabela 4. Localização dos pontos de amostragem na sub-bacia impactada.

Ponto	Rio	Município	Latitude	Longitude
PI01	Carmo	Mariana	-20.35	-43.32
PI02	Gualaxo do Norte	Mariana	-20.2765	-43.4317
PI03	Gualaxo do Norte	Mariana	-20.2927	-43.2792
PI04	Gualaxo do Norte	Barra Longa	-20.28605	-43.06584
PI05	Carmo	Barra Longa	-20.28	-43.03
PI06	Piranga	Ponte Nova	-20.30695	-42.89248
PI07	Doce	Santa Cruz do Escalvado	-20.25216	-42.88424
PI08	Doce	Santana do Deserto	-20.19472	-42.85444
PI09	Doce	São Domingos do Prata	-20.01439	-42.74464
PI10	Doce	Pingo-d'Água	-19.74888	-42.47838
PI11	Doce	Caratinga	-19.48999	-42.49
PI12	Doce	Naque	-19.23638	-42.30824

Tabela 5. Localização dos pontos de amostragem na sub-bacia não impactada.

Ponto	Rio	Município	Latitude	Longitude
ST01	Santo Antônio	Conceição do Mato Dentro	-19.18018	-43.31797
ST02	Santo Antônio	Conceição do Mato Dentro	-19.25173	-43.09831
ST03	Santo Antônio	Ferros	-19.23356	-43.07444
ST04	Santo Antônio	Ferros	-19.21662	-43.05276
ST05	Santo Antônio	Ferros	-19.23014	-42.97588
ST06	Santo Antônio	Joanésia	-19.15373	-42.74569
ST07	Santo Antônio	Joanésia e Açucena	-19.11944	-42.66005
ST08	Santo Antônio	Açucena e Belo Oriente	-19.15775	-42.49826
ST09	Santo Antônio	Naque	-19.23214	-42.32816

Duas amostragens distintas em ambas as sub-bacias da BHRD foram realizadas em 2019: a primeira em fevereiro e a segunda em julho. Para ambas as amostragens na sub-bacia impactada, foram coletadas amostras de sedimentos de todos os pontos relacionados na Tabela 4. Na sub-bacia não impactada, a amostragem de fevereiro não contemplou o ponto ST01. Já em julho, todos os pontos descritos na Tabela 5 foram coletados. Dessa forma, para esta pesquisa, obtivemos um total de 41 amostras de sedimentos, sendo que: 20 amostras foram coletadas na estação chuvosa e 21 na estação seca.

Todos os sedimentos coletados foram acondicionados em tubos de rosca (50 mL) estéreis e transportados, sob refrigeração, para o Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). As amostras foram mantidas em *freezer*, à temperatura de -20 °C.

4.2. Extração de DNA

O DNA foi extraído de uma fração de 10 g de sedimento, utilizando-se o E.Z.N.A[®] *Soil DNA Kit* (OMEGA Bio-Tak, Norcross, GA, EUA), conforme instruções do fabricante. Os sedimentos foram retirados do *freezer* e acondicionados em geladeira um dia antes de serem submetidos à extração de DNA. Resumidamente, o protocolo de extração de DNA inclui etapas de adição de reagentes, homogeneização, centrifugação e filtração da amostra. Assim, temos a lise da amostra ambiental, precipitação de polissacarídeos, remoção de inibidores e obtenção do DNA, que é, posteriormente, submetido a lavagens e filtrações.

Após a extração, a concentração do DNA foi medida no fluorímetro *Qubit 2.0*, utilizando o reagente *Qubit dsDNA HS Assay Kit* (Waltham, MA, EUA). A fluorescência medida pelo equipamento é consequência da ligação específica ao DNA, indicando a concentração da macromolécula, minimizando assim, os efeitos de possíveis contaminantes e de DNA degradado.

4.3. Ensaio de q-PCR

O estudo da presença do rDNA 16s, do gene codificador da integrase dos *integrons* da subclasse 1 e 2 e ARGs foi feito por meio de q-PCR. Um total de 15 marcadores genéticos foram pesquisados (Tabela 6). Os ARGs selecionados

conferem resistência as seguintes classes de antimicrobianos: glicopeptídeos (*vanA*), macrolídeos (*ermC*), quinolonas (*qnrB*), sulfonamidas (*sul1* e *sul2*), tetraciclina (*tetM*) e β -lactâmicos (*bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{NDM-1}*, *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}* e *bla_{VIM}*).

As reações foram conduzidas em termociclador *QuantStudio 1 Real-Time PCR Systems* (Thermo Fisher - Scientific, Waltham, MA, EUA) e analisadas com o auxílio do software *QuantStudio 3 and 5 Real-Time PCR System Software* (Thermo Fisher – Scientific) utilizando-se 1 μ L de DNA alvo, 10 μ L de SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fisher – Scientific) e iniciadores (Tabela 6) e água Milli-Q® estéril com o volume final da reação de 20 μ L. A concentração dos iniciadores em μ M foi de 0,2, exceto para o gene *intl1*, no qual a concentração utilizada foi 0,3. O programa de amplificação consistiu em um ciclo de 2 minutos a 95°C, seguido por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 60 segundos a 60°C. A seguir, foi determinada a curva de *melting* com rampa entre 60 e 95°C. Todos os testes foram realizados em duplicata.

Foi comprovada a especificidade da amplificação das reações por meio de análise das curvas de *melting* dos genes alvos em cada amostra de sedimento. Já a eficiência dos *primers* foi avaliada por meio de uma curva padrão na base 10 feita com amostras padrões obtidas de isolados bacterianos, sabidamente, portadores dos marcadores genéticos (Tabela 6) (BUSTIN *et al.*, 2009).

A extração do DNA dos controles bacterianos portadores dos marcadores genéticos foi feita pelo método de fervura, conforme descrito por OLSVIK e STROCKBINE, 1993, com algumas modificações. A concentração do DNA obtido foi medida no fluorímetro *Qubit 2.0*, utilizando o reagente *Qubit dsDNA HS Assay Kit*.

Tabela 6. Lista de iniciadores e amostras padrões utilizados nas q-PCR.

Marçador genético	Iniciadores (5'-3')	Tamanho do amplicon (pb)	Referência	Amostra padrão
rDNA 16s	F: TAC GGG AGG CAG CAG R: ATT ACC GCG GCT GCT GG	180	Muyzer <i>et al.</i> (1993)	* <i>Klebsiella pneumoniae</i>
int1	F: TGA AAG GTC TGG TCA TAC ATG TGA R: CAT TCC TGG CCG TGG TTC T	101	Skurnik <i>et al.</i> (2005)	* <i>Klebsiella pneumoniae</i>
int2	F: GTT ATT TTA TTG CTG GGA TTA GGC R: TTT TAC GCT GCT GTA TGG TGC	164	Luo <i>et al.</i> (2010)	* <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
vanA	F: CTG TGA GGT CGG TTG TGC G R: TTT GGT CCA CCT CGC CA	65	Rocha <i>et al.</i> (2020)	* <i>Enterococcus faecalis</i>
ermC	F: GGG GAT TTT ACC CTT GAA TTA GT R: TCT TTT AGC AAA CCC GTA TTC C	279	Jia <i>et al.</i> (2018)	** <i>Staphylococcus epidermidis</i>
qnrB	F: GGT ACA AAT ATG GCT CTG GCA C R: CTT TCA GCA TCG CAC GAC TAA	196	Jia <i>et al.</i> (2018)	** <i>Enterobacter cloacae</i>
su1	F: CGC ACC GGA AAC ATC GCT GCAC R: TGA AGT TCC GCC GCA AGG CTC G	162	Pei <i>et al.</i> (2006)	** <i>Enterobacter cloacae</i>
su2	F: TCC GGT GGA GGC CGG TAT CTG G R: CGG GAA TGC CAT CTG CCT TGA G	190	Pei <i>et al.</i> (2006)	** <i>Escherichia coli</i>
tetM	F: TTT ATC TGT ATC ACC GCT TCC G R: ACA ATC CGT CAC ATT CCA ACC	154	Jia <i>et al.</i> (2018)	** <i>Enterococcus faecalis</i>
bla_{KPC}	F: CAG CTC ATT CAA GGG CTT TC R: GGC GGC GTT ATC ACT GTA TT	196	Subirats <i>et al.</i> (2017)	* <i>Klebsiella pneumoniae</i>
bla_{NDM}	F: GATTGCGACTTATGCCAATG R: TCGATCCCAACGGTGATATT	189	Subirats <i>et al.</i> (2017)	* <i>Enterobacter cloacae</i>
bla_{NDM-1}	F: GGG GAT TGC GAC TTA TGC C R: CAG CCA CCA AAA GCG ATG	219	Jia <i>et al.</i> (2018)	** <i>Acinetobacter baumannii</i>
bla_{SHV}	F: CGC TTT CCC ATG ATG AGC ACC TTT R: TCC TGC TGG CGA TAG TGG ATC TTT	110	Xi <i>et al.</i> (2009)	* <i>Klebsiella pneumoniae</i>
bla_{TEM}	F: TTCCTGTTTTTGCTCACCCAG R: CTCAAGGATCTTACCGCTGTTG	113	Rocha <i>et al.</i> (2020)	* <i>Klebsiella pneumoniae</i>
bla_{VIM}	F: GCA CTT CTC GCG GAG ATT G R: CGA CGG TGA TGC GTA CGT T	135	Szekeres <i>et al.</i> (2017)	* <i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Origem: *Laboratório Especial de Microbiologia Clínica e Laboratório Alerta e Escola Paulista de Medicina, Universidade federal de São Paulo (UNIFESP); **Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios, ICB, UFMG.

4.4. Análise dos dados

A abundância absoluta, abundância relativa e prevalência dos marcadores genéticos nas estações chuvosa e seca de 2019 na BHRD foram avaliadas.

A curva padrão utilizada para avaliar a eficiência dos *primers* também foi usada para a quantificação da abundância absoluta do número de cópias dos marcadores genéticos detectados por grama de sedimento. O cálculo do número de cópias foi realizado conforme a Equação 1, na qual $X(g)$ é a quantidade de DNA em gramas (g), $6,022 \times 10^{23}$ moléculas/mol corresponde ao número de Avogadro, $N(pb)$ é o tamanho do DNA controle em pares de base (pb) e 660 g/mol corresponde ao peso molecular de 1 par de base de DNA dupla fita em Daltons.

$$\text{Número de cópias} = \frac{X(g) \times 6,022 \times 10^{23} \text{ moléculas/mol}}{N(pb) \times 660 \text{ g/mol}} \quad (1)$$

A abundância relativa foi feita pela normalização da abundância absoluta de *integrans* e ARGs encontrados em relação ao número de cópias do rDNA 16S, conforme descrito por Yan Zhang *et al.* (2018). Assim, a abundância relativa, em nº de cópias de *integrans* e ARG detectados por grama de sedimento foi calculada conforme a Equação 2. Para cada duplicata, foi calculada a média de abundância relativa. Posteriormente, esses valores foram avaliados estatisticamente segundo o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparações múltiplas de Mann-Whitney com correção de Bonferroni.

$$\text{Abundância relativa} = \frac{\text{Número de cópias de } \textit{integrans} \text{ e/ou ARGs}}{\text{Número de cópias do rDNA 16S}} \quad (2)$$

Já a prevalência foi calculada conforme a Equação 3.

$$\text{Prevalência (\%)} = \frac{\text{Ocorrência dos } \textit{integrans} \text{ e/ou ARGs}}{\text{Número total de amostras}} \quad (3)$$

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação da especificidade e eficiência das reações de amplificação

A avaliação da especificidade e eficiência dos iniciadores é crucial para a qualidade das reações de amplificação. Dessa forma, as curvas de *melting* dos controles e das amostras de sedimentos mostraram a especificidade do *primer*, com apenas uma temperatura de *melting* (T_m) para cada um dos *amplicons* dos marcadores genéticos estudados (Apêndices A e B). Pela análise da curva padrão utilizando os controles, as reações atingiram eficiência entre 75,7-140% (Apêndices A e B).

Com relação à curva padrão do *ermC*, não foi possível estabelecer mais que 3 pontos dentro da faixa de linearidade. A quantidade de pontos recomendável deve compreender 5 a 6 concentrações \log_{10} (BUSTIN *et al.*, 2009). Assim, foi possível detectar o gene, porém não houve a quantificação do mesmo (Apêndices A e B).

5.2. Abundância absoluta e abundância relativa dos marcadores genéticos na bacia hidrográfica do Rio Doce

5.2.1. Abundância absoluta e abundância relativa

Os Apêndices C e D evidenciam as abundâncias absolutas dos marcadores genéticos detectados na BHRD em fevereiro e julho de 2019, respectivamente. O *integron int12* e os ARGs *vanA*, *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{NDM-1}*, *bla_{SHV}* e *bla_{VIM}* não foram identificados.

Os Apêndices E e F mostram as abundâncias relativas de *int11*, *qnrB*, *su11*, *su12*, *tetM* e *bla_{TEM}* em fevereiro e julho de 2019, nessa ordem. A Tabela 7 e

Tabela 8 demonstram a média e o desvio padrão das abundâncias relativas destes marcadores nas estações chuvosa e seca de 2019. Dessa forma, foi verificado que a média da abundância relativa dos marcadores genéticos encontrados na estação chuvosa foi maior que na estação seca, exceto para o *tetM*, que foi detectado somente na estação seca.

Tabela 7. Média e desvio padrão das adundâncias relativas dos marcadores genéticos em fevereiro de 2019.

Estação chuvosa	<i>int1</i>	<i>qnrB</i>	<i>su1</i>	<i>su2</i>	<i>tetM</i>	<i>bla_{TEM}</i>
Média	-3,51	-2,27	-0,91	-2,21	-	-5,64
Desvio padrão	1,93	2,42	1,48	1,28	-	2,42

Tabela 8. Média e desvio padrão das adundâncias relativas dos marcadores genéticos em julho de 2019.

Estação seca	<i>int1</i>	<i>qnrB</i>	<i>su1</i>	<i>su2</i>	<i>tetM</i>	<i>bla_{TEM}</i>
Média	-4,89	-3,77	-2,63	-4,32	-6,50	-6,00
Desvio padrão	2,26	2,30	2,85	2,29	1,56	1,85

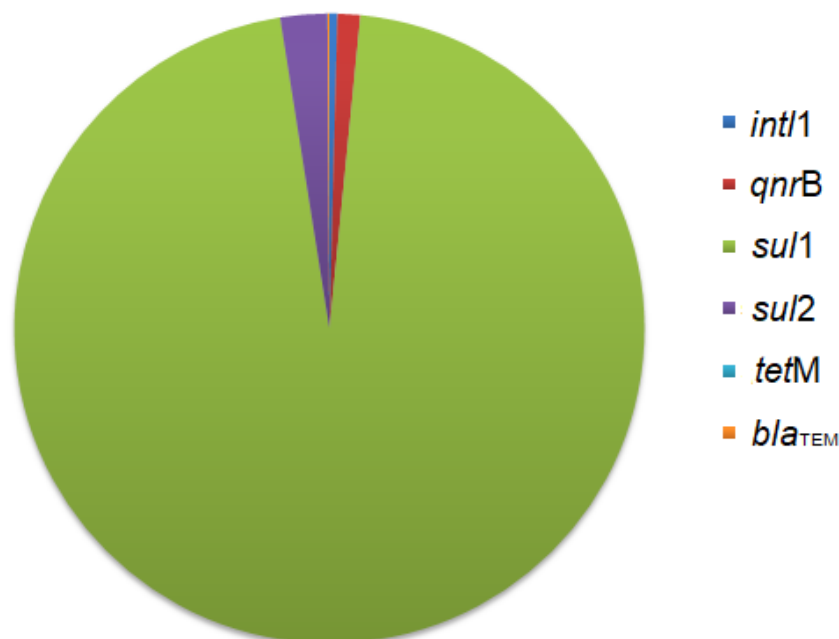
A Tabela 9 demonstra os valores *p* das comparações múltiplas par a par. Os valores destacados são significativos, ou seja, a dupla de genes e estação (identificada pelo cruzamento da coluna com a linha) é significativamente diferente entre si.

Tabela 9. Valores de *p* das comparações múltiplas par a par.

	<i>int1</i> Chuvosa	<i>bla_{TEM}</i> Chuvosa	<i>tetM</i> Chuvosa	<i>qnrB</i> Chuvosa	<i>su1</i> Chuvosa	<i>su2</i> Chuvosa	<i>int1</i> Seca	<i>bla_{TEM}</i> Seca	<i>tetM</i> Seca	<i>qnrB</i> Seca	<i>su1</i> Seca
<i>bla_{TEM}</i> Chuvosa	0,426										
<i>tetM</i> Chuvosa	0,000	1,000									
<i>qnrB</i> Chuvosa	1,000	0,044	0,000								
<i>su1</i> Chuvosa	0,014	0,001	0,000	0,263							
<i>su2</i> Chuvosa	1,000	0,063	0,000	1,000	0,230						
<i>int1</i> Seca	1,000	1,000	0,007	0,025	0,001	0,047					
<i>bla_{TEM}</i> Seca	0,045	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000				
<i>tetM</i> Seca	0,001	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,252	1,000			
<i>qnrB</i> Seca	1,000	0,967	0,000	1,000	0,025	1,000	1,000	0,120	0,007		
<i>su1</i> Seca	1,000	0,103	0,000	1,000	1,000	1,000	0,612	0,015	0,002	1,000	
<i>su2</i> Seca	1,000	1,000	0,001	0,277	0,002	0,326	1,000	0,750	0,042	1,000	1,000

De forma geral, o somatório dos valores da abundância relativa nas estações chuvosa e seca de 2019 foram: $8,55 \times 10^{-1}$ (*int1*), $2,45 \times 10^0$ (*qnrB*), $2,20 \times 10^2$ (*su1*), $5,04 \times 10^0$ (*su2*), $3,92 \times 10^{-2}$ (*tetM*) e $1,91 \times 10^{-2}$ (*bla_{TEM}*). Assim, o gene detectado em maior quantidade no ano de 2019 na BHRD foi o *su1*. A Figura 7 demonstra a abundância relativa total dos *integrans* e AGRs detectados na BHRD em 2019.

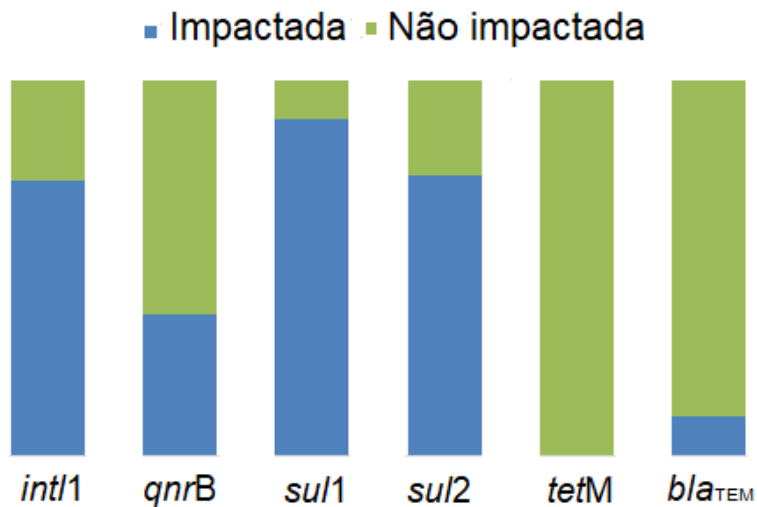
Figura 7. Abundância relativa total dos *integrans* e ARGs detectados na BHRD em 2019.



5.2.2. Abundância relativa nas sub-bacias impactada e não impactada

Para a sub-bacia impactada os valores totais da abundância relativa no ano de 2019 foram: $6,27 \times 10^{-1}$ (*int11*), $9,29 \times 10^{-1}$ (*qnrB*), $1,81 \times 10^2$ (*sul1*), $3,76 \times 10^0$ (*sul2*) e $2,05 \times 10^{-2}$ (*bla*_{TEM}). Já para a sub-bacia não impactada verificamos que abundância relativa total no ano de 2019 foi de $2,28 \times 10^{-1}$ (*int11*), $1,52 \times 10^0$ (*qnrB*), $2,09 \times 10^1$ (*sul1*), $1,28 \times 10^0$ (*sul2*), $3,92 \times 10^{-2}$ (*tetM*) e $1,71 \times 10^{-1}$ (*bla*_{TEM}). Portanto, os marcadores genéticos *int11*, *sul1* e *sul2* foram detectados em maior quantidade em número de cópias por grama de sedimento na sub-bacia impactada (Figura 8). Na sub-bacia não impactada verificamos uma maior quantidade dos marcadores genéticos *qnrB* e *bla*_{TEM}. Ademais, o gene *tetM* foi encontrado exclusivamente na sub-bacia não impactada (Figura 8).

Figura 8. Abundância relativa total dos *integrons* e ARGs detectados na sub-bacias impactada e não impactada .

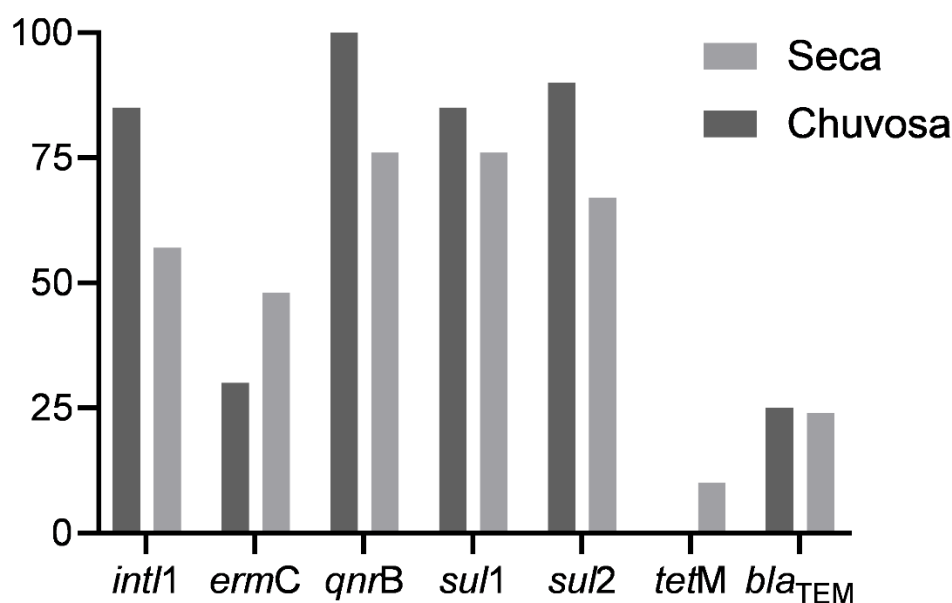


5.3. Prevalência dos *integrons* e genes de resistência a antimicrobianos

5.3.1. Prevalência dos *integrons* e genes de resistência a antimicrobianos nas estações chuvosa e seca

A Figura 9 ilustra a prevalência dos *integrons* e ARGs nas estações chuvosa e seca de 2019. Em fevereiro de 2019, a prevalência de *int1*, *ermC*, *qnrB*, *sul1*, *sul2* e *bla_{TEM}* foi 85%, 30%, 100%, 85%, 90% e 25%, respectivamente. Em julho de 2019, a prevalência de *int1*, *ermC*, *qnrB*, *sul1*, *sul2*, *tetM* e *bla_{TEM}* consistiram em 57%, 48%, 76%, 76%, 67%, 10% e 24%, nesta ordem. Assim, os genes que conferem resistência a quinolonas e sulfonamidas foram os mais prevalentes em ambas as amostragens.

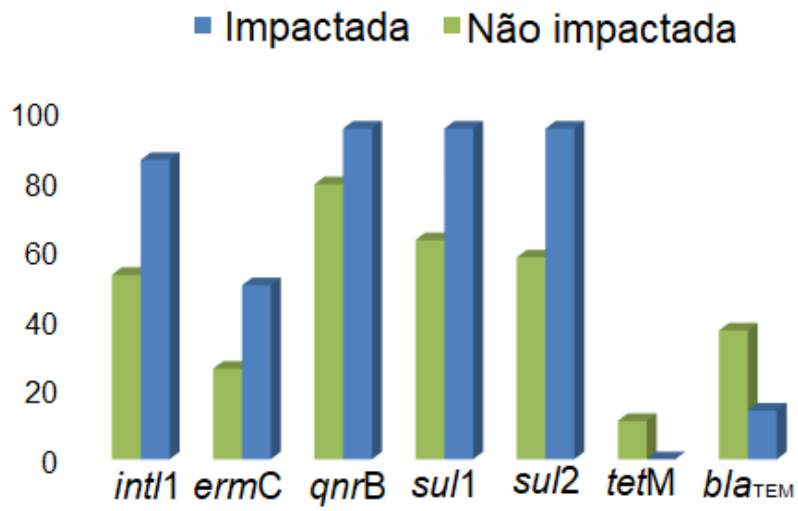
Figura 9. Prevalência dos *integrons* e ARGs detectados na BHRD nas estações chuvosa e seca de 2019.



5.3.2. Prevalência dos *integrons* e genes de resistência a antimicrobianos nas sub-bacias impactada e não impactada

A Figura 10 demonstra a prevalência de detecção dos *integrons* e ARGs nas sub-bacias da BHRD. Para sub-bacia impactada, a prevalência de *int11*, *ermC*, *qnrB*, *sul1*, *sul2* e *bla_{TEM}* foi de 86%, 50%, 95%, 95%, 95% e 14%, nesta ordem. Já na sub-bacia não impactada, a prevalência de *int11*, *ermC*, *qnrB*, *sul1*, *sul2*, *tetM* e *bla_{TEM}* foi de 53%, 26%, 79%, 63%, 58%, 11% e 37%, respectivamente. Portanto, a prevalência dos marcadores genéticos *int11*, *ermC*, *qnrB*, *sul1*, *sul2* foi maior na sub-bacia impactada. Já os genes *tetM* e *bla_{TEM}* foram detectados em uma maior quantidade de pontos localizados na sub-bacia não impactada, sendo que o *tetM* foi encontrado somente na sub-bacia não impactada.

Figura 10. Prevalência dos *integrans* e ARGs detectados nas sub-bacias impactada e não impactada em 2019.



6. DISCUSSÃO

Este trabalho verificou valores mais elevados para a média da abundância relativa e prevalência dos marcadores genéticos na estação chuvosa em relação à estação seca. Tal resultado está em consonância com o trabalho de Knapp *et al.* (2019), no qual os ARGs foram significativamente mais abundantes na estação chuvosa em relação à estação seca no Rio Almendares, localizado em Havana, Cuba. Os valores aumentados de ARGs na estação chuvosa podem estar associados com pluviosidade mais elevada nesse período, que permite um transporte mais eficaz de elementos a jusante em climas tropicais, com é o caso de Cuba e do Brasil.

Com relação ao *qnrB*, nosso estudo revelou uma alta prevalência do gene e quantificação do mesmo, com valores médios de abundância relativa de -2,27 e -3,77, nas estações chuvosa e seca, respectivamente. Este marcador genético confere resistência a fármacos pertencentes a classe das quinolonas e sua utilização é feita principalmente no tratamento de infecções do trato urinário ocasionadas por bastonetes Gram-negativos. Já foi averiguado que a maior parte dos antimicrobianos pertencentes a esta classe não é prontamente biodegradável no meio ambiente e são retidos em solos e sedimentos (MARTINEZ, 2009). Assim, as excretas não metabolizadas podem ocasionar a contaminação do ambiente aquático (MARENCO *et al.*, 1997; GIRIJAN *et al.*, 2020). Um estudo realizado por Marti *et al.* (2014) revelou que amostras bacterianas provenientes de sedimentos a jusante de uma estação de tratamento de efluentes apresentavam resistência a antimicrobianos pertencentes à classe das quinolonas e marcadores genéticos como o gene *qnrB*, sugerindo a persistência desses fármacos em águas residuais e superficiais.

Neste estudo os genes *sul1* e *sul2* foram prevalentes em ambas as amostragens. Em fevereiro de 2019, a média da abundância relativa foi de -0,91 (*sul1*) e -2,63 (*sul2*). Já em julho, a média da abundância relativa foi de -2,21 (*sul1*) e -4,32 (*sul2*). Tais resultados são pertinentes, visto que os fármacos dessa classe são altamente solúveis e amplamente utilizados no tratamento de pacientes na clínica médica e veterinária e também na produção animal (BEAN *et al.*, 2005; LAMSHOFT *et al.*, 2007). Logo, as sulfonamidas são persistentes no meio ambiente e os genes *sul* são propensos a serem os ARGs mais comumente encontrados.

Ainda, com relação à abundância dos genes *sul* em sedimentos, os resultados deste estudo para tal marcador genético foram averiguados também por

Su *et al.* (2014), que detectaram ARGs que conferem resistência a classe dos macrolídeos, sulfonamidas e tetraciclinas, com ênfase para a abundância do gene *su12* em sedimentos da bacia do Rio Dongjiang na China, nas estações seca e chuvosa, nos anos de 2008 e 2009, respectivamente. Ademais, uma pesquisa com sedimentos de baías pertencentes a área costeira do Mar da China Oriental realizado por Chen Jiayu *et al.* (2019) também evidenciou a presença do gene *su11*, com valores de abundância absoluta e abundância relativa superiores aos demais ARGs detectados.

A presença do *int1* na BHRD pode estar relacionada à atividade mineradora histórica na região, devido à sua importância na adaptação das bactérias a diferentes pressões ao longo do tempo (GILLINGS *et al.* 2015). Tal elemento abriga e expressa uma variedade de cassetes gênicos que codificam proteínas envolvidas em funções adaptativas diversas, proporcionando vantagens seletivas relevantes frente a diversas pressões ambientais, além de conferir fenótipo de resistência a antimicrobianos e propagar ARGs, em especial, os genes *sul* (CHEN HAIYANG *et al.*, 2019; HUA *et al.*, 2021). Ademais, a detecção simultânea de *int1* e metais em sedimentos já foi evidenciada por Pinto (2013) ao longo do Córrego da Mina, localizado no Quadrilátero Ferrífero, Bacia do Rio das Velhas.

No tocante à detecção de genes que conferem resistência a fármacos β -lactâmicos, este estudo detectou a presença do gene *bla_{TEM}*, com abundância média relativa de -5,64 e -6,00 em fevereiro e julho de 2019, respectivamente. Os genes *bla* conferem resistência a antimicrobianos dessa classe por meio da presença de enzimas que hidrolisam o anel β -lactâmico. Geralmente, tais genes são encontrados em microrganismos pertencentes a família Enterobacteriaceae. O gene *bla_{TEM}* já foi identificado em diversas matrizes ambientais, em especial, em sedimentos oriundos da China e da Índia (REDDY; DUBEY, 2019; OHORE *et al.*, 2020).

A presença de *tetM* apenas na estação seca de 2019 nos pontos ST01 e ST02, que se localizam no município de Conceição do Mato Dentro, pode estar relacionada a alguma particularidade ocorrida nesse período.

Em relação ao gene *ermC*, não foi possível estabelecer valores dentro da faixa de linearidade, porque é recomendável pelo menos 5 pontos de diluições da amostra padrão para as análises de regressão linear (BUSTIN *et al.*, 2009; BURD, 2010). Assim, foi possível detectar o gene mas não quantificá-lo.

Os dados averiguados neste trabalho constataram uma maior prevalência, variedade e quantidade de marcadores genéticos detectados na sub-bacia impactada,

quando comparada à sub-bacia não impactada. Por serem sub-bacias da BHRD e devido a inexistência de estudos anteriores ao colapso da barragem de Fundão, não podemos afirmar que o impacto da onda de rejeitos relacionados a este desastre possa estar relacionado ao incremento de *integrons* e ARGs na região, em especial, na sub-bacia do Rio Piranga, que foi imediatamente atingida. Dessa forma, o que pressumimos é que tal acontecimento possa ter promovido o aumento do *status* de resistência a antimicrobianos na BHRD, pois a contaminação ambiental gerada pelos resíduos de mineração funcionou como uma pressão de seleção, aumentando as respostas adaptativas que alteram a fisiologia celular bacteriana (SUADOLNIK *et al.* 2022).

Os dados averiguados neste estudo para os marcadores genéticos já foram relatados em outras pesquisas recentes com matrizes ambientais brasileiras (FURLAN; STEHLING, 2017; NASCIMENTO *et al.*, 2017). Assim, Gomes *et al.* (2022) demonstraram que amostras bacterianas provenientes de água e sedimentos do Rio João Leite em Góias abrigavam o genes *intl1*, *ermC*, *sul2* e *tetM*. Ademais, um estudo realizado por Furlan *et al.* (2020), com amostras de água, sedimento e solos coletados após 30 dias do rompimento da barragem de Brumadinho, evidenciaram a presença dos ARGs *qnrB*, *sul1* e *bla_{TEM}* em todas as amostras ambientais, sendo que *sul1* apresentou a maior concentração total com relação ao número de cópias.

Pensando-se no contexto ambiental global, resultados semelhantes ao deste trabalho já foram obtidos por Kumar *et al.* (2020) para águas residuais do Sri Lanka e de uma cidade da Índia Ocidental, que constatou a prevalência dos genes *qnrB* e *sul1* em amostras de efluentes. Outro estudo, conduzido por Chen *et al.* (2020) com sedimentos coletados em localidades receptoras de efluentes de estações de tratamentos pertencentes a baía de Hangzho na China, verificou a presença do gene *intl1* e sua correlação significativa com genes *sul* e *dfr*. Ademais, Dong *et al.* (2019), em seu trabalho com sedimentos e águas de áreas urbanas da cidade de Pequim, verificaram uma correlação positiva entre *intl1* e os ARGs *sul1*, *bla_{TEM}* e *tetX*.

Por fim, explicar a não detecção do *intl2* e dos ARGs *vanA*, *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{NDM-1}*, *bla_{SHV}* e *bla_{VIM}* nos sedimentos da BHRD é uma tarefa complicada. Isso porque a ocorrência dos ARGs pode variar conforme as condições ambientais e, ainda, diferentes ecossistemas possuem características únicas com relação à presença e disseminação de ARGs.

7. CONCLUSÕES

Nosso estudo teve por objetivo a detecção de *integrons* e genes de resistência a antimicrobianos (AGRs) em sedimentos da Bacia Hidrográfica do Rio Doce (BHRD). O gene codificador da integrase subclasse 1 (*intl1*) juntamente com os AGRs *qnrB*, *sul1*, *sul2* e *bla_{TEM}* foram detectados em maior quantidade na BHRD em fevereiro 2019. O mesmo período também apresentou uma maior prevalência de detecção do *intl1*, *ermC*, *qnrB*, *sul1*, *sul2* e *bla_{TEM}* quando comparado a julho de 2019. Com relação as sub-bacias da BHRD, a sub-bacia impactada apresentou uma maior prevalência, variedade e quantidade de marcadores genéticos detectados quando comparada a sub-bacia não impactada.

A abundância relativa dos AGRs *sul1*, *sul2* e *qnrB* foram as maiores em número de cópias do gene por grama de sedimento. Assim, estes ARGs juntamente com o *intl1* podem ser dispersados mais facilmente em sedimentos que outros, principalmente em períodos chuvosos, devido à alta pluviosidade desse período em climas tropicais.

Estudos como este contribuem para o reconhecimento do ambiente aquático enquanto reservatório natural de *integrons* e AGRs. Independentemente do desastre da barragem de Fundão, estudos sistemáticos e periódicos de determinação de *integrons* e AGRs em ambientes naturais tornam-se uma importante ferramenta para à integração entre saúde humana, zoonoses e meio ambiente.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS - ANA. Encarte Especial sobre a Bacia do Rio Doce: Rompimento da Barragem em Mariana/MG. Brasília, 2016. Disponível em: https://arquivos.ana.gov.br/RioDoce/EncarteRioDoce_22_03_2016v2.pdf. Acesso em 17 jun. 2020.

AGUINAGA, O. E. *et al.* The association of microbial activity with Fe, S and trace element distribution in sediment cores within a natural wetland polluted by acid mine drainage. **Chemosphere**, v. 231, p. 432-441, 2019.

AGUIRRE, A. A. Wild canids as sentinels of ecological health: A conservation medicine perspective. **Parasites and Vectors**, v. 2, p. 1-8, 2009.

AIRES, U. R. V. *et al.* Changes in land use and land cover as a result of the failure of a mining tailings dam in Mariana, MG, Brazil. **Land Use Policy**, v. 70, p. 63-70, 2018.

ALLEN, H. K. *et al.* Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p.251-259, 2010.

ALMEIDA, C. A. *et al.* Characterization and evaluation of sorption potential of the iron mine waste after Samarco dam disaster in Doce River basin – Brazil. **Chemosphere**, v. 209, p. 411-420, 2018.

ANDERSSON, D. I.; HUGHES, D. Persistence of antibiotic resistance in bacterial populations. **Federation of European Microbiological Societies - Microbiology Reviews**, v. 35, p. 901-911, 2011.

ANTONELLI, P. *et al.* Genes conferring resistance to critically important antimicrobials in *Salmonella enterica* isolated from animals and food: A systematic review of the literature, 2013–2017. **Research in Veterinary Science**, v. 126, p. 59-67, 2019.

ANUSHA, P.; NATARAJAN, D. Bioremediation potency of multi metal tolerant native bacteria *Bacillus cereus* isolated from bauxite mines, kolli hills, Tamilnadu- A lab to land approach. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 25, p. 1-9, 2020.

AUGUET, O. *et al.* Sewers as potential reservoirs of antibiotic resistance. **Science of the Total Environment**, v. 605-606, p. 1047-1054, 2017.

BAKER-AUSTIN, C. *et al.* Co-selection of antibiotic and metal resistance. **Trends in Microbiology**, v. 14, n. 4, p. 176-182, 2006.

BALBIN, M. M. *et al.* Antimicrobial resistance and virulence factors profile of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* isolated from different environments exposed to anthropogenic activity. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 22, p. 578-583, 2020.

BALESTRIN, D. *et al.* Phytosociological study to define restoration measures in a mined area in Minas Gerais, Brazil. **Ecological Engineering**, v. 135, p. 8–16, 2019.

BEAN, D. C. *et al.* Resistance among *Escherichia coli* to sulphonamides and other antimicrobials now little used in man. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, p. 962-964, 2005.

BENVENISTE, R.; DAVIES, J. Aminoglycoside antibiotic-inactivating enzymes in actinomycetes similar to those present in clinical isolates of antibiotic-resistant bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 70, n. 8, p. 2276-2280, 1973.

BEN, Y. *et al.* Human health risk assessment of antibiotic resistance associated with antibiotic residues in the environment: A review. **Environmental Research**, v. 169, p. 483-493, 2019.

BELLO, A.; DINGLE, T. C. What's That Resistance Mechanism? Understanding Genetic Determinants of Gram-Negative Bacterial Resistance. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 40, n. 20, p. 165-174, 2018.

BONECKER, A. C. T. *et al.* Larval fish assemblages of the coastal area affected by the tailings of the collapsed dam in southeast Brazil. **Regional Studies in Marine Science**, v. 32, p. 1-10, 2019.

BORBA, R. P. *et al.* Arsenic in Water and Sediment in the Iron Quadrangle, State of Minas Gerais, Brazil. **Revista Brasileira de Geociências**, v. 30, p. 558-561, 2000.

BOTELHO, J.; SCHULENBURG, H. The role of integrative and conjugative elements in antibiotic resistance evolution. **Trends in Microbiology**, v. 29, n. 1, p. 8-18, 2021.

BOTTINO, F. *et al.* Influence of the residue from an iron mining dam in the growth of two macrophyte species. **Chemosphere**, v. 186, p. 488-494, 2017.

BRASIL (2010), LEI Nº 12.334, DE 20 DE SETEMBRO DE 2010. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2010/lei/l12334.htm> Acesso em: 8 de nov. 2022.

BUELOW, E.; PLOY, MARIE-CECILE; DAGOT, C. Role of pollution on the selection of antibiotic resistance and bacterial pathogens in the environment. **Current Opinion in Microbiology**, v. 64, p. 117-124, 2021.

BURD, E. M. Validation of laboratory-developed molecular assays for infectious diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 3, p. 550-576, 2010.

BURRITT, R. L.; CHRIST, K. L. Water risk in mining: Analysis of the Samarco dam failure. **Journal of Cleaner Production**, v. 178, p. 196-205, 2018.

BURRUS, V. Mechanisms of stabilization of integrative and conjugative elements. **Current Opinion in Microbiology**, v. 38, p. 44-50, 2017.

BUSTIN, S. A. *et al.* The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. 2009. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009.

CARMO, F. F. *et al.* Fundão tailings dam failures: the environment tragedy of the largest technological disaster of Brazilian mining in global context. **Perspectives in Ecology and Conservation**, v. 15, p. 145-151, 2017.

CARVALHO, P. S. L.; MESQUITA, P. P. D.; ARAÚJO, E. D. G. Sustentabilidade da siderurgia brasileira: eficiência energética e competitividade. **BNDES Setorial**, v. 41, p. 181-236, 2016.

CHAMOSA L. S. *et al.* Lateral antimicrobial resistance genetic transfer is active in the open environment. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1-12, 2017.

CHEN, HAIYANG. *et al.* Characterization and source-tracking of antibiotic resistomes in the sediments of a peri-urban river. **Science of the Total Environment**, v. 679, p. 88-96, 2019.

CHEN, JIAYU. *et al.* Bacterial heavy-metal and antibiotic resistance genes in a copper tailing dam area in northern China. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1-12, 2019.

CHEN, J. *et al.* Occurrence and distribution of antibiotic resistance genes in the coastal sediments of effluent-receiving areas of WWTPs, China. **Bioresource Technology Reports**, v. 11, p. 1-7, 2020.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 30th ed. CLSI supplement M100, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2020.

COELHO, E. *et al.* Resistant fungi isolated from contaminated uranium mine in Brazil shows a high capacity to uptake uranium from water. **Chemosphere**, v. 248, p. 1-9, 2020.

COLLIER, C. A. *et al.* Effects of anthropic actions and forest areas on a neotropical aquatic ecosystem. **Science of the Total Environment**, v. 691, p. 367-377, 2019.

CONSÓRCIO ECOPLAN - LUME. Plano integrado de recursos hídricos da bacia hidrográfica do Rio Doce e planos de ações para as unidades de planejamento e gestão de recursos hídricos no âmbito da bacia do Rio Doce, 2010. Disponível em: <<https://www.cbhdoce.org.br/pirh-parh-pap/pirh>>. Acesso em: 28 maio de 2022.

CORDEIRO, M. C. *et al.* Insights on the freshwater microbiomes metabolic changes associated with the world's largest mining disaster. **Science of the Total Environment**, v. 654, p. 1209-1217, 2019.

COSTA, P. S. *et al.* Draft genome sequence of *Micrococcus* sp. strain MS-AsIII-49, an arsenate-reducing isolate from tropical metal-rich sediment. **Genome Announcements**, v. 3, n. 2, p. 1-2, 2015.

CROFTS, T. S.; GASPARRINI, A. J.; DANTAS, G. Next-generation approaches to understand and combat the antibiotic resistome. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, p. 422-434, 2017.

CRUZ, F. V. S. *et al.* Does Samarco's spilled mud impair the growth of native trees of the Atlantic Rainforest? **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 189, p. 1-12, 2020.

CYCON, M.; MROZIK, A.; PIOTROWSKA-SEGET, Z. Antibiotics in the soil environment-degradation and their impact on microbial activity and diversity. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1-45, 2019.

DAVIES, J.; DAVIES D. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74, p. 417-433, 2010.

DAVILA, R. B. *et al.* Heavy metals in iron ore tailings and floodplain soils affected by the Samarco dam collapse in Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 709, p. 1-11, 2020.

DEAN, A. P. *et al.* Metabolic adaptation of a *Chlamydomonas acidophila* strain isolated from acid mine drainage ponds with low eukaryotic diversity. **Science of the Total Environment**, v. 647, p. 75-87, 2019.

DE MENEZES, A.; CLIPSON, N.; DOYLE, E. Comparative metatranscriptomics reveals widespread community responses during phenanthrene degradation in soil. **Environmental Microbiology**, v. 14, p. 2577-2588, 2012.

DESTOUMIEUX-GARZÓN, D. *et al.* The One Health Concept: 10 Years Old and a Long Road Ahead. **Frontiers in Veterinary Science**, v.5, p. 1-13, 2018.

DIAS, C. P. **Análise da presença de bactérias resistentes a antimicrobianos em sistema de tratamento de dejetos de suinocultura.** Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Ouro Preto. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental - PROAMB. Ouro Preto, p. 87. 2018.

DONG, P. *et al.* Occurrence of antibiotic resistance genes and bacterial pathogens in water and sediment in urban recreational water. **Journal of Environmental Sciences**, v. 77, p. 65-74, 2019.

DROPA, M. **Disseminação da resistência a antimicrobianos em cepas clínicas e ambientais de *Enterobacteriaceae*: identificação e mapeamento do ambiente genético de genes codificadores de ESBL.** Tese de doutorado. Universidade de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública. São Paulo, 2012.

FERNANDES, G. W. *et al.* Deep into the mud: ecological and socio-economic impacts of the dam breach in Mariana, Brazil. **Natureza e Conservação**, v. 14, p. 35–45, 2016.

FERNANDO, W. A. M. *et al.* Challenges and opportunities in the removal of sulphate ions in contaminated mine water: A review. **Minerals Engineering**, v. 117, p. 74-90, 2018.

FERNANDEZ-CALVINO, D.; BAATH, E. Co-selection for antibiotic tolerance in Cu-polluted soil is detected at higher Cu-concentrations than increased Cu-tolerance. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 57, p. 953–956, 2013.

FORSBERG, Kevin J. *et al.* Bacterial phylogeny structures soil resistomes across habitats. **Nature**, v. 509, p. 612-616, 2014.

FROST, L. S. *et al.* Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 722-732, 2005.

FURLAN, J. P. R.; STEHLING, E. G. High-level of resistance to β -lactam and presence of β -lactamases encoding genes in *Ochrobactrum* sp. and *Achromobacter* sp. isolated from soil. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 11, p. 133-137, 2017.

FURLAN, J. P. R. *et al.* Occurrence and abundance of clinically relevant antimicrobial resistance genes in environmental samples after the Brumadinho dam disaster, Brazil. **Science of The Total Environment**, v. 726, p. 1-11, 2020.

FURLAN, J. P. R.; STEHLING, E. G. High-level of resistance to β -lactam and presence of β -lactamases encoding genes in *Ochrobactrum* sp. and *Achromobacter* sp. isolated from soil. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 11, p. 133-137, 2017.

GARCIA-ALVAREZ, L. *et al.* Working across the veterinary and human health sectors. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, p. 37-49, 2012.

GHALY, T. M. *et al.* The peril and promise of integrons: beyond antibiotic resistance. **Trends in Microbiology**, v. 28, n. 6, p. 455-464, 2020.

GHALY, T. M. *et al.* The natural history of integrons. **Microorganisms**, v. 9, p. 1-12, 2021.

GILLINGS, M. R. *et al.* Using the class 1 integron-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution. **The International Society for Microbial Ecology (ISME) Journal**, v. 9, p. 1269-1279, 2015.

GILLINGS, M. R. Evolutionary consequences of antibiotic use for the resistome, mobilome and microbial pangenome. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 1-10, 2013.

GIRIJAN, S. K. *et al.* Investigating the impact of hospital antibiotic usage on aquatic environment and aquaculture systems: A molecular study of quinolone resistance in *Escherichia coli*. **Science of the Total Environment**, v. 748, p. 1-13, 2020.

Google Earth disponível [online] na Internet via [www. URL, https://www.google.com.br/intl/pt-BR/earth/](http://www.google.com.br/intl/pt-BR/earth/). Acesso em 13 julho, 2022.

GOMES, L. E. O. *et al.* The impacts of the Samarco mine tailing spill on the Rio Doce estuary, Eastern Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 120, p. 28-36, 2017.

GOMES, R. P. *et al.* Gene resistance profile and multidrug-resistant bacteria isolated from a stream in midwestern Brazil. **Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management**, v. 18, p. 1-11, 2022.

GOERING, R. V. *et al.* **Microbiologia Médica de Mims**. 5ª edição, Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

GRAPHPAD PRISM. **GraphPad Prism Version 6.00**. GraphPad Software.

HAN, Y. S. *et al.* Geochemical and eco-toxicological characteristics of stream water and its sediments affected by acid mine drainage. **Catena**, v. 148, p. 52-59, 2017.

HATJE, V. *et al.* The environmental impacts of one of the largest tailing dam failures worldwide. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1-13, 2017.

HESSE, E. *et al.* Ecological selection of siderophore-producing microbial taxa in response to heavy metal contamination. **Ecology Letters**, v. 21, p. 117-127, 2018.

HOLMES, A. H. *et al.* Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. **The Lancet**, v. 387, p. 176-187, 2016.

HOU, D. *et al.* Spatial variation of sediment bacterial community in an acid mine drainage contaminated area and surrounding river basin. **Journal of Environmental Management**, v. 251, p. 1-7, 2019.

HU, Y. *et al.* Annual trends and health risks of antibiotics and antibiotic resistance genes in a drinking water source in East China. **Science of the Total Environment**, v. 791, p. 1-9, 2021.

INSTITUTO MINEIRO DE GESTÃO DE ÁGUAS - IGAM. Encarte especial sobre a qualidade das águas do Rio Doce após 4 anos de rompimento da barragem de Fundão 2015-2019. Belo Horizonte, 2019. Disponível em: <<http://www.repositorioigam.meioambiente.mg.gov.br/handle/123456789/3215>>. Acesso em: 20 maio. 2022.

IMRAN, M.; DAS, K. R.; NAIK, M. M. Co-selection of multi-antibiotic resistance in bacterial pathogens in metal and microplastic contaminated environments: An emerging health threat. **Chemosphere**, v. 215, p. 846-857, 2019.

JIA, J. *et al.* Occurrence and distribution of antibiotics and antibiotic resistance genes in Ba River, China. **Science of the Total Environment**, v. 642, p. 1136-1144, 2018.

JIA, Y. *et al.* Species-specific bioaccumulation and correlated health risk of arsenic compounds in freshwater fish from a typical mine-impacted river. **Science of the Total Environment**, v. 625, p. 600-607, 2018.

JING, R.; YAN, Y. Metagenomic analysis reveals antibiotic resistance genes in the bovine rumen. **Microbial Pathogenesis**, v. 149, p. 1-7, 2020.

KNAPP, C. W. *et al.* Relationship between antibiotic resistance genes and metals in residential soil samples from Western Australia. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, p. 2484-2494, 2017.

KNAPP, C. W. *et al.* Seasonal variations in antibiotic resistance gene transport in the Almendares River, Havana, Cuba. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 1-11, 2012.

KUMAR, M. *et al.* Treatment enhances the prevalence of antibiotic-resistant bacteria and antibiotic resistance genes in the wastewater of Sri Lanka, and India. **Environmental Research**, v. 183, p. 1-11, 2020.

LAMSHOFT, M. *et al.* Metabolism of ^{14}C -labelled and non-labelled sulfadiazine after administration to pigs. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 388, p. 1733-1745, 2007.

LIU, JIAN-LI *et al.* Metagenomic exploration of multi-resistance genes linked to microbial attributes in active nonferrous metal (loid) tailings. **Environmental Pollution**, v. 273, p. 1-11, 2021.

LOPES, C. A. *et al.* Toxic and essential metals in *Narcine brasiliensis* (Elasmobranchii: Narcinidae): A baseline ecotoxicological study in the Southeast Atlantic and preliminary maternal transfer implications. **Marine Pollution Bulletin**, v. 149, p. 1-10, 2019.

LU, J. *et al.* Both silver ions and silver nanoparticles facilitate the horizontal transfer of plasmid-mediated antibiotic resistance genes. **Water Research**, v. 169, p. 1-11, 2020.

LUO, Y. I. *et al.* Trends in antibiotic resistance genes occurrence in the Haihe River, China. **Environmental Science and Technology**, v. 44, n. 19, p. 7220-7225, 2010.

MACDONALD, S. E. Forest restoration following surface mining disturbance: challenges and solutions. **New Forests**, v. 46, p. 703-732, 2015.

MARENGO, J. R. *et al.* Aerobic biodegradation of (^{14}C)-Sarafloxacin hydrochloride in soil. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 16, n. 3, p. 462-471, 1997.

MARTINEZ, J. L. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. **Environmental Pollution**, v. 157, p. 2893-2902, 2009.

MARQUES, C. R. Bio-rescue of marine environments: On the track of microbially-based metal/metalloid remediation. **Science of the Total Environment**, v. 565, p. 165-180, 2016.

MARTI, E. *et al.* Abundance of antibiotic resistance genes and bacterial community composition in wild freshwater fish species. **Chemosphere**, v. 196, p. 115-119, 2018.

MARTI, E. *et al.* Characterization of ciprofloxacin-resistant isolates from a wastewater treatment plant and its receiving river. **Water Research**, v. 61, p. 67-76, 2014.

MARTÍNEZ, J. L.; COQUE, T. M.; BAQUERO, F. What is a resistance gene? Ranking risk in resistomes. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, p. 116-123, 2015.

MATHERS, A. J.; PEIRANO, G.; PITOUT, J. D. D. The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p. 565-591, 2015.

MATSCHULLAT, J. *et al.* Long-term environmental impact of arsenic-dispersion in Minas Gerais, Brazil. **Trace Metals and other Contaminants in the Environment**, v. 9, p. 365-382, 2007.

MAZEL, D. Integrons: agents of bacterial evolution. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, p. 608-620, 2006.

McGIVERN, B. B. *et al.* Novel class 1 integron harboring antibiotic resistance genes in wastewater-derived bacteria as revealed by functional metagenomics. **Plasmid**, v. 114, p. 1-7, 2021.

MELLO, J. W. V.; DUARTE, H. A.; LADEIRA, A. C. Q. Origem e Controle do Fenômeno Drenagem Ácida de Mina. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, n. 8, p. 24-29, 2014.

MILAKOVIC, M. *et al.* Pollution from azithromycin-manufacturing promotes macrolide-resistance gene propagation and induces spatial and seasonal bacterial community shifts in receiving river sediments. **Environment International**, v. 123, p. 501-511, 2019.

MITTAL, P. *et al.* Metagenome of a polluted river reveals a reservoir of metabolic and antibiotic resistance genes. **Environmental Microbiome**, v. 14, n. 5, p. 1-12, 2019.

MOHAPATRA, B. R. *et al.* Tracking the prokaryotic diversity in acid mine drainage-contaminated environments: a review of molecular methods. **Minerals Engineering**, v. 24, p. 709-718, 2011.

MORGENSTERN, N. R. *et al.* 2016. Fundão Tailings Dam Review Panel - Report on the Immediate Causes of the Failure of the Fundão Dam. 2016. Disponível em: <<https://pedlowski.files.wordpress.com/2016/08/fundao-finalreport.pdf>>. Acesso em: 20 maio de 2022.

MUYZER, G.; ELLEN C. W.; UITIERLINDEN, A. G. Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S Rrna. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 695-700, 1993.

NASCIMENTO, T. *et al.* International high-risk clones of *Klebsiella pneumoniae* KPC-2/CC258 and *Escherichia coli* CTX-M-15/CC10 in urban lake waters. **Science of the Total Environment**, v. 598, p. 910-915, 2017.

O'Neill J. Review on Antimicrobial Resistance. Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. Reino Unido, 2014. Disponível em: <https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations_1.pdf>. Acesso em: 17 abr. 2022.

OHORE, O. E. *et al.* Distribution and relationship between antimicrobial resistance genes and heavy metals in surface sediments of Taihu Lake, China. **Journal of Environmental Sciences**, v. 77, p. 323-335, 2019.

OHORE, O. E. *et al.* Profiles of ARGs and their relationships with antibiotics, metals and environmental parameters in vertical sediment layers of three lakes in China. **Journal of Environmental Management**, v. 255, p. 1-12, 2020.

OLSVIK, O.; STROCKBINE, N. A. PCR detection of heat-stable, heat-labile, and Shiga-like toxin genes in *Escherichia coli*. **Diagnostic Molecular Microbiology Principles and Applications**, p.271-276, 1993.

- PAL, C. *et al.* Co-occurrence of resistance genes to antibiotics, biocides and metals reveals novel insights into their co-selection potential. **BMC Genomics**, v. 16, p. 1-14, 2015.
- PEI, R. *et al.* Effect of river landscape on the sediment concentrations of antibiotics and corresponding antibiotic resistance genes (ARG). **Water Research**, v. 40, p. 2427-2435, 2006.
- PINTO, C. O. Pesquisa de integron classe 1 e cassete gênico em *Escherichia coli* recuperadas de indivíduos sadios e infectados e em DNA de sedimento contaminado por arsênio. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais. Programa de Pós-Graduação em Genética. Belo Horizonte, 2013.
- POOLE, K. At the Nexus of Antibiotics and Metals: The Impact of Cu and Zn on Antibiotic Activity and Resistance. **Trends in Microbiology**, v. 25, n. 10, p. 820-832, 2017.
- PRADO, I. G. O. *et al.* Revegetation process increases the diversity of total and arbuscular mycorrhizal fungi in areas affected by the Fundão dam failure in Mariana, Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 141, p. 84-95, 2019.
- QUEIROZ, H. M. *et al.* The Samarco mine tailing disaster: A possible time-bomb for heavy metals contamination? **Science of the Total Environment**, v. 637-638, p. 498-506, 2018.
- QUINTELA-BALUJA, M. *et al.* Dynamics of integron structures across a wastewater network—Implications to resistance gene transfer. **Water Research**, v. 206, p. 1-10, 2021.
- RANOTKAR, S. *et al.* Vancomycin-resistant enterococci: Troublemaker of the 21st century. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 2, p. 205-212, 2014.
- REDDY, B.; DUBEY, S. K. River Ganges water as reservoir of microbes with antibiotic and metal ion resistance genes: High throughput metagenomic approach. **Environmental Pollution**, v. 246, p. 443-451, 2019.
- REIS, M. P. *et al.* Characterizing a riverine microbiome impacted by extreme disturbance caused by a mining sludge tsunami. **Chemosphere**, v. 253, p. 1-15, 2020.
- REZENDE, P. S. *et al.* Arsenic and mercury mobility in Brazilian sediments from the São Francisco River Basin. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n.5, p. 910-918, 2011.
- REZENDE, V. L. A mineração em Minas Gerais: uma análise de sua expansão e os impactos ambientais e sociais causados por décadas de exploração. **Sociedade e Natureza**, v. 28, p. 375-384, 2016.
- ROCHA, J. *et al.* Inter-laboratory calibration of quantitative analyses of antibiotic resistance genes. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 8, p. 1-6, 2020.

SZEKERES, E. *et al.* Abundance of antibiotics, antibiotic resistance genes and bacterial community composition in wastewater effluents from different Romanian hospitals. **Environmental Pollution**, v. 225, p. 304-315, 2017.

SANDOVAL-QUINTANA, E.; LAUGA, B.; CAGNON, C. Environmental integrons: the dark side of the integron world. **Trends in Microbiology**, v. xx, n. xx, p. 1-3, 2022.

SANDERSON, H. *et al.* Comparison of biochemical and genotypic speciation methods for vancomycin-resistant enterococci isolated from urban wastewater treatment plants. **Journal of Microbiological Methods**, v. 161, p. 102-110, 2019.

SEGURA, F. R. *et al.* Potential risks of the residue from Samarco's mine dam burst (Bento Rodrigues, Brazil). **Environmental Pollution**, v. 218, p. 813-825, 2016.

SEMEDO-LEMSADDEK, T. *et al.* Otter fecal enterococci as general indicators of antimicrobial resistance dissemination in aquatic environments. **Ecological Indicators**, v. 85, p. 1113-1120, 2018.

SHARMA, B.; DANGI, A. K.; SHUKLA, P. Contemporary enzyme based technologies for bioremediation: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 210, p. 10-22, 2018.

SIDRACH-CARDONA, R. *et al.* Prevalence of antibiotic-resistant fecal bacteria in a river impacted by both an antibiotic production plant and urban treated discharges. **Science of the Total Environment**, v. 488-489, p. 220-227, 2014.

SKURNIK, D. *et al.* Integron-associated antibiotic resistance and phylogenetic grouping of *Escherichia coli* isolates from healthy subjects free of recent antibiotic exposure. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 7, p. 3062-65, 2005.

SMUCKER, N. J.; DRERUP, S. A.; VIS, M. L. Roles of benthic algae in the structure, function, and assessment of stream ecosystems affected by acid mine drainage. **Journal of Phycology**, v. 50, p. 425-436, 2014.

SOUZA, I. E. M. *et al.* A contaminação por arsênio nos solos e nas águas subterrâneas no Estado de Minas Gerais, Brasil: fontes, riscos à saúde, estratégias de mitigação. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 5, p. 1-13, 2022.

SUBIRATS, J. *et al.* Real-time PCR assays for the detection and quantification of carbapenemase genes (*bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, and *bla_{OXA-48}*) in environmental samples. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, p. 6710-6714, 2017.

STALDER, T. *et al.* Integron involvement in environmental spread of antibiotic resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 1-14, 2012.

STALDER, T. *et al.* Linking the resistome and plasmidome to the microbiome. **The International Society for Microbial Ecology (ISME) Journal**, v. 13, p. 2437-2446, 2019.

SUHADOLNIK, M. L. S. *et al.* Spatiotemporal dynamics of the resistome and virulome of riverine microbiomes disturbed by a mining mud tsunami. **Science of The Total Environment**, v. 806, p. 1-16, 2022.

SUN, Z.; HU, Y.; CHENG, H. Public health risk of toxic metal(loid) pollution to the population living near an abandoned small-scale polymetallic mine. **Science of the Total Environment**, v. 718, p. 1-13, 2020.

TAVARES, W. **Antibióticos e quimioterápicos para o clínico**. 3ª edição, São Paulo: Atheneu, 2014.

TEIXEIRA, M. C. *et al.* Arsenic contamination assessment in Brazil – Past, present and future concerns: A historical and critical review. **Science of the Total Environment**, v. 730, p. 1-21, 2020.

THOMPSON, F. *et al.* Severe impacts of the Brumadinho dam failure (Minas Gerais, Brazil) on the water quality of the Paraopeba River. **Science of the Total Environment**, v. 705, p. 1-6, 2020.

VAREJÃO, E. V. V. *et al.* Arsenic and trace metals in river water and sediments from the southeast portion of the Iron Quadrangle, Brazil. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 172, p. 631-642, 2011.

VIEIRA, C. K. *et al.* Microbiome of a revegetated iron-mining site and pristine ecosystems from the Brazilian Cerrado. **Applied Soil Ecology**, v. 131, p. 55-65, 2018a.

VIEIRA, C. K. *et al.* Morphological and molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in revegetated iron-mining site has the same magnitude of adjacent pristine ecosystems. **Journal of Environmental Sciences**, v. 67, p. 330-343, 2018b.

VRANAKIS, I. *et al.* Proteome studies of bacterial antibiotic resistance mechanisms. **Journal of Proteomics**, v. 97, p. 88-99, 2014.

WEBER, A. A. *et al.* Effects of metal contamination on liver in two fish species from a highly impacted neotropical river: A case study of the Fundão dam, Brazil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 190, p. 1-9, 2020.

WRIGHT, M. S. *et al.* Influence of industrial contamination on mobile genetic elements: class 1 integron abundance and gene cassette structure in aquatic bacterial communities. **The International Society for Microbial Ecology (ISME) Journal**, v. 2, p. 417-428, 2008.

WENDLANDT, S. *et al.* The diversity of antimicrobial resistance genes among staphylococci of animal origin. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, p. 338-349, 2013.

WOZNIAK, R. A. F.; WALDOR, M. K. Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 552-563, 2010.

XI, C. *et al.* Prevalence of antibiotic resistance in drinking water treatment and distribution systems. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 17, p. 5714-5718, 2009.

YAN, BO *et al.* Leachability characteristic of heavy metals and associated health risk study in typical copper mining-impacted sediments. **Chemosphere**, v. 239, p. 1-11, 2020.

YAN, CHANGCHUN *et al.* Deciphering the toxic effects of metals in gold mining area: microbial community tolerance mechanism and change of antibiotic resistance genes. **Environmental Research**, v. 189, p. 1-8, 2020a.

YAN CHANGCHUN *et al.* Integrating high-throughput sequencing and metagenome analysis to reveal the characteristic and resistance mechanism of microbial community in metal contaminated sediments. **Science of the Total Environment**, v. 707, p. 1-11, 2020b.

ZHANG, YAN. *et al.* Cell-free DNA: a neglected source for antibiotic resistance genes spreading from WWTPs. **Environmental Science and Technology**, v. 52, p. 248-257, 2018.

ZHANG, YE. *et al.* Sub-inhibitory concentrations of heavy metals facilitate the horizontal transfer of plasmid-mediated antibiotic resistance genes in water environment. **Environmental Pollution**, v. 237, p. 74-82, 2018.

ZHANG, X. *et al.* Acid mine drainage affects the diversity and metal resistance gene profile of sediment bacterial community along a river. **Chemosphere**, v. 217, p. 790-799, 2019.

ZHANG, HANYAN *et al.* Bioremediation of co-contaminated soil with heavy metals and pesticides: Influence factors, mechanisms and evaluation methods. **Chemical Engineering Journal**, v. 398, p. 1-19, 2020.

ZHANG, MENGLU *et al.* Co-selection and stability of bacterial antibiotic resistance by arsenic pollution accidents in source water. **Environment International**, v. 135, p. 1-11, 2020.

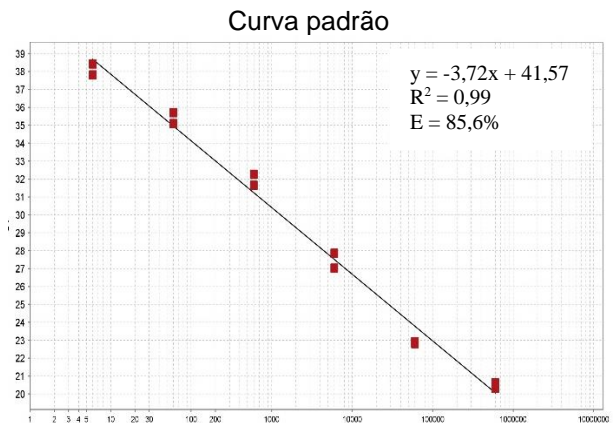
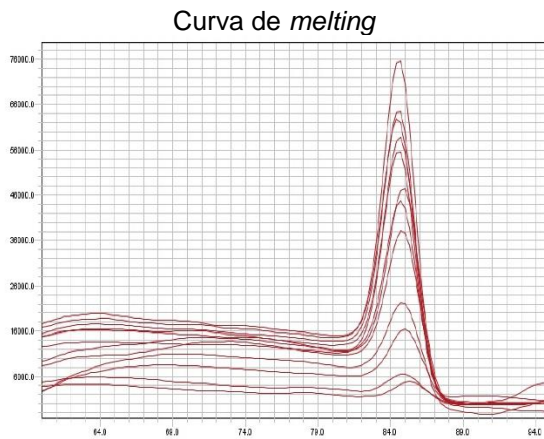
ZHAO, Y. *et al.* Evidence for co-selection of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements in metal polluted urban soils. **Science of the Total Environment**, v. 656, p. 512-520, 2019.

ZOU, HAI-YAN *et al.* Antibiotic resistance genes in surface water and groundwater from mining affected environments. **Science of the Total Environment**, v. 772, p. 1-10, 2021.

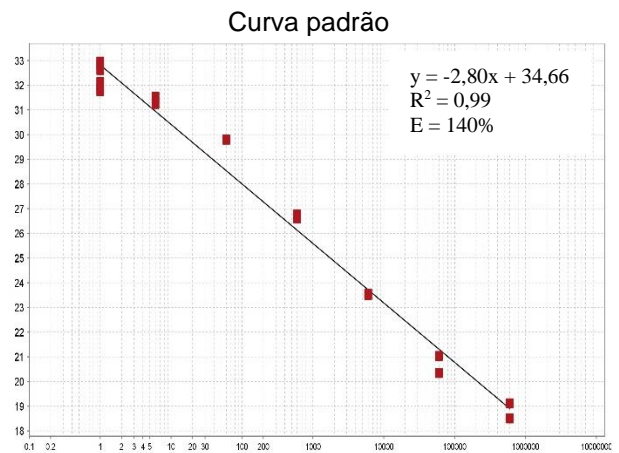
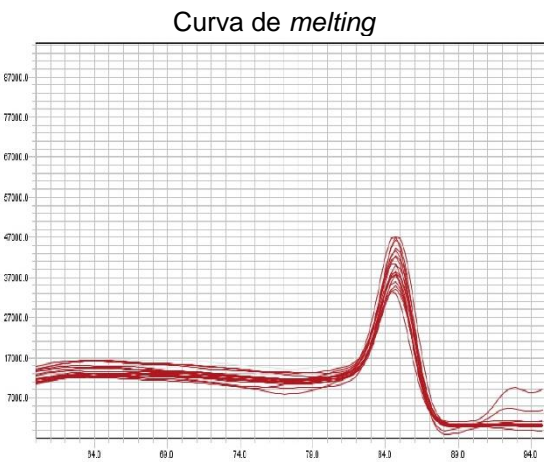
9. APÊNDICES

Apêndice A - Curva de *melting* e curva padrão para rDNA 16s(A), *int1*(B), *int2*(C), *vanA*(D), *ermC*(E), *qnrB*(F), *su1*(G), *su2*(H), *tetM*(I), *bla_{KPC}*(J), *bla_{NDM}*(K), *bla_{NDM-1}*(L), *bla_{SHV}*(M), *bla_{TEM}*(N) e *bla_{VIM}*(O).

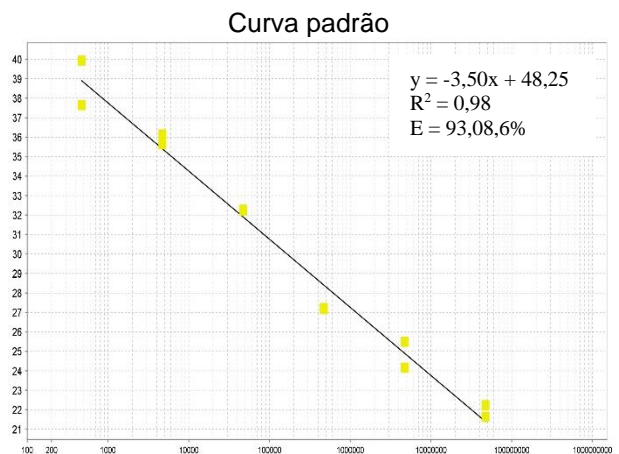
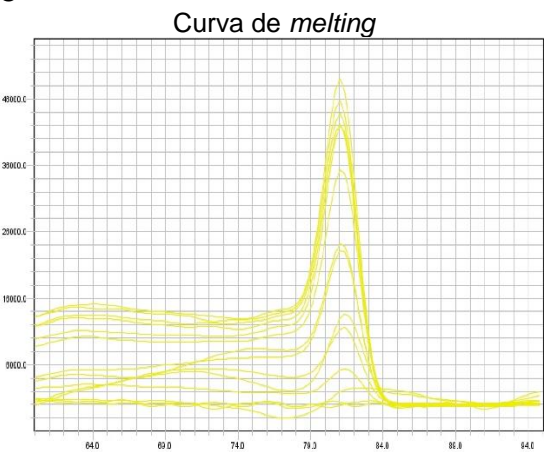
A



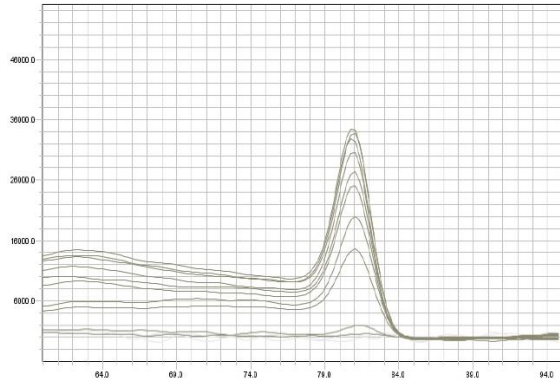
B



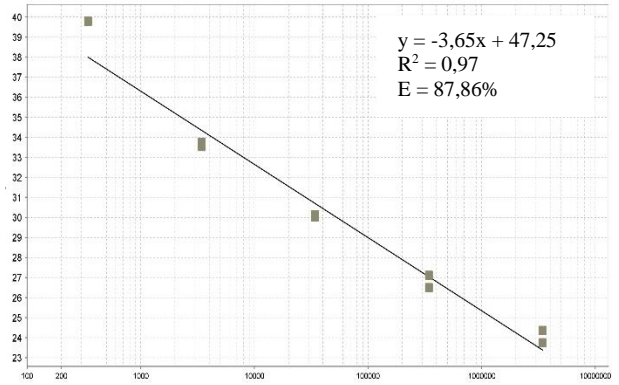
C



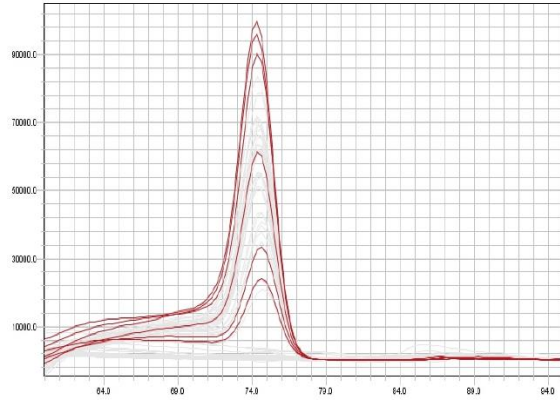
D

Curva de *melting*

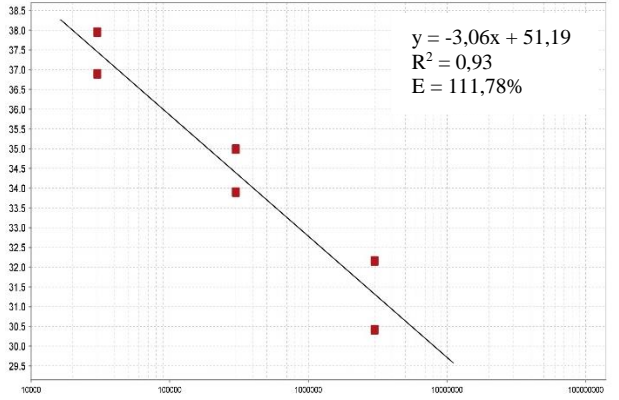
Curva padrão



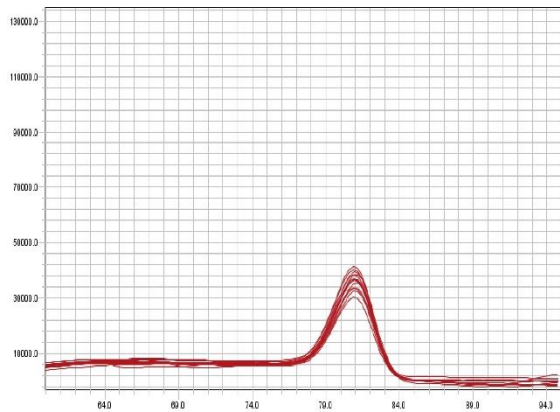
E

Curva de *melting*

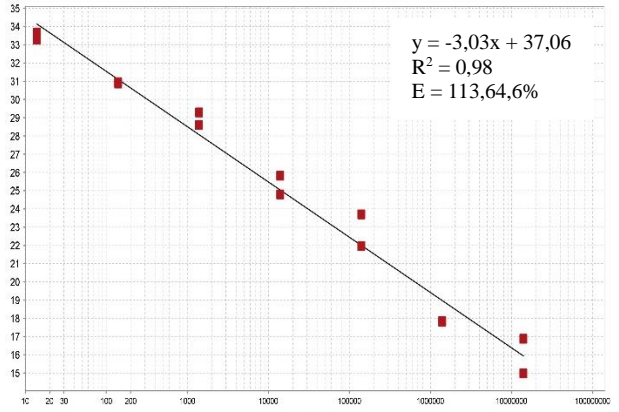
Curva padrão



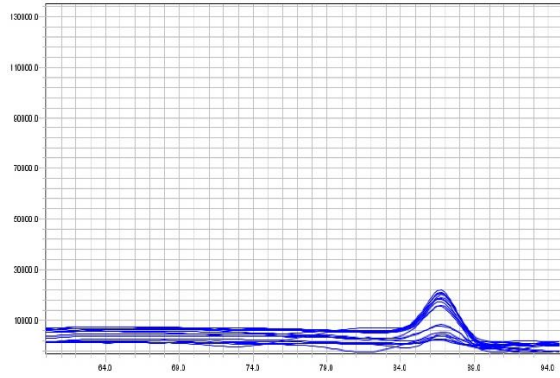
F

Curva de *melting*

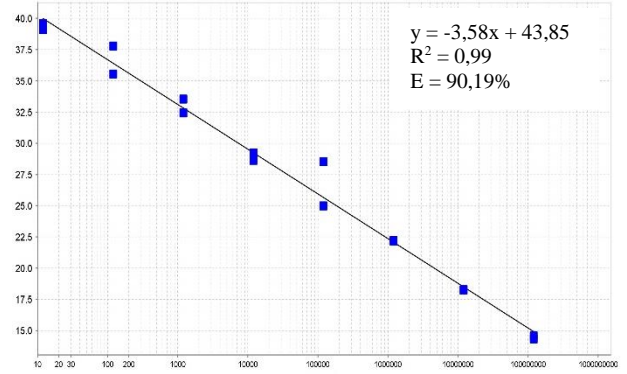
Curva padrão



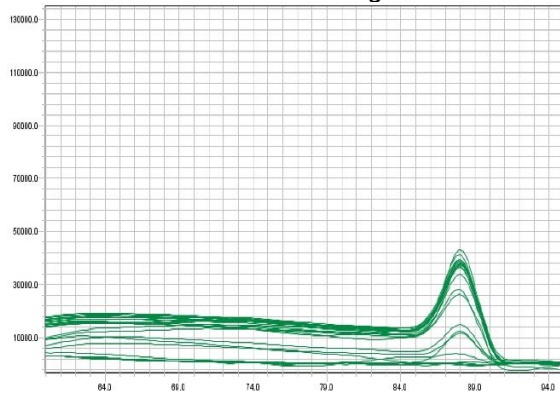
G

Curva de *melting*

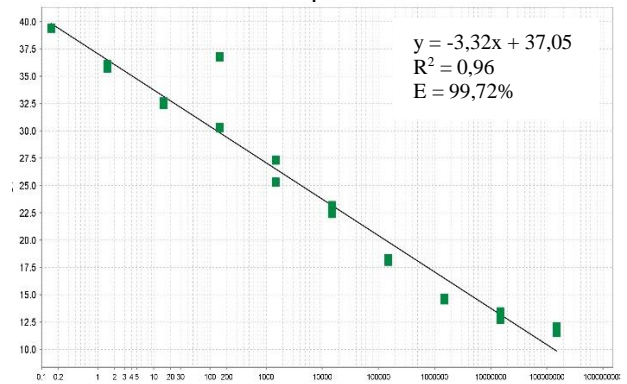
Curva padrão



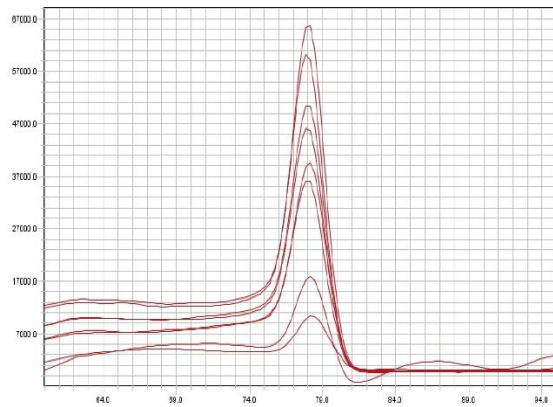
H

Curva de *melting*

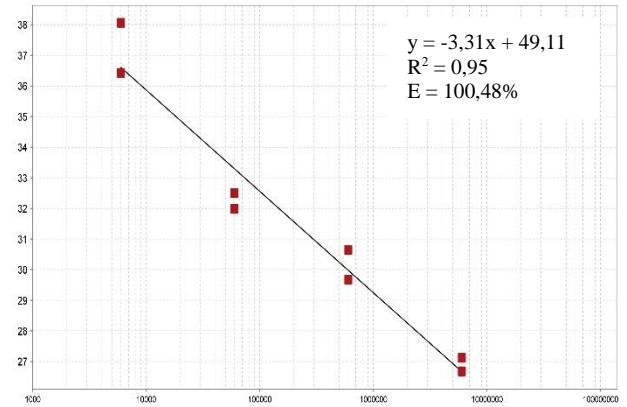
Curva padrão



I

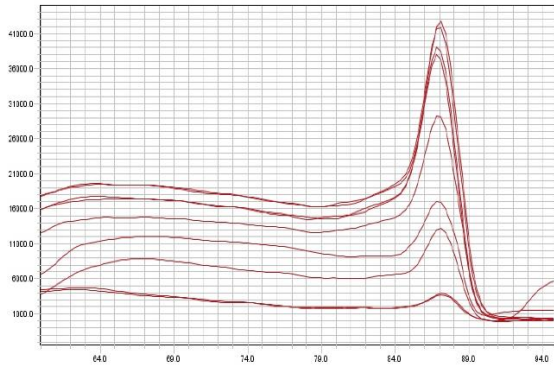
Curva de *melting*

Curva padrão

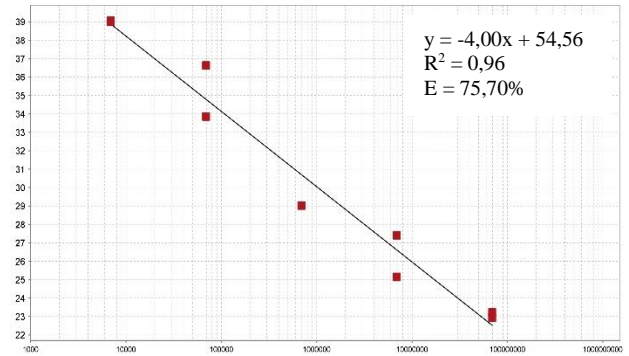


J

Curva de *melting*

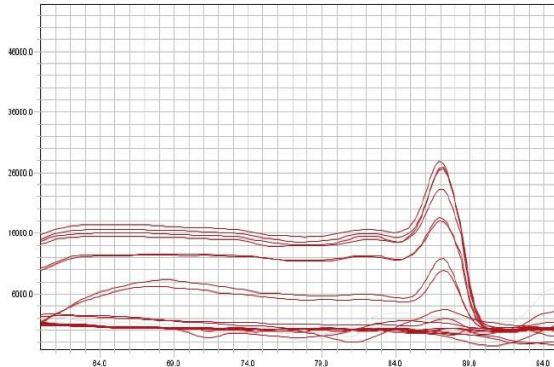


Curva padrão

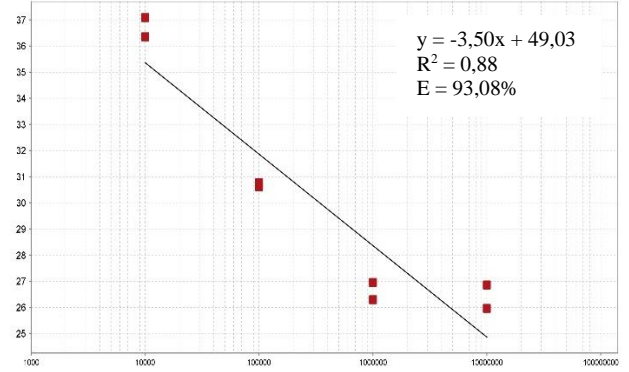


K

Curva de *melting*

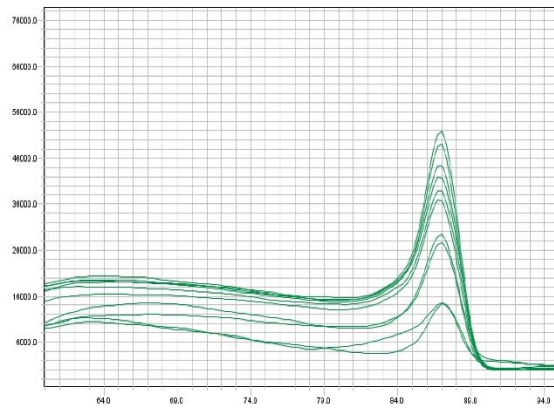


Curva padrão

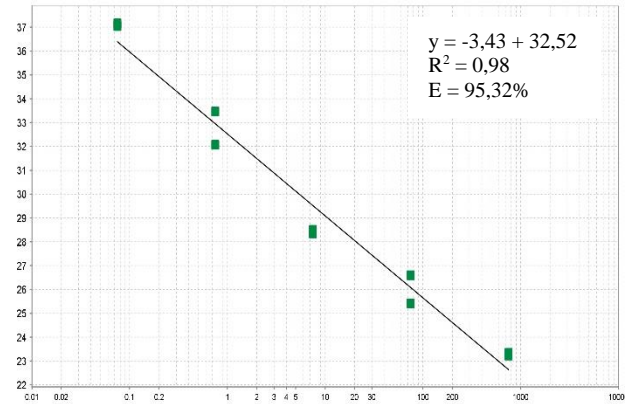


L

Curva de *melting*

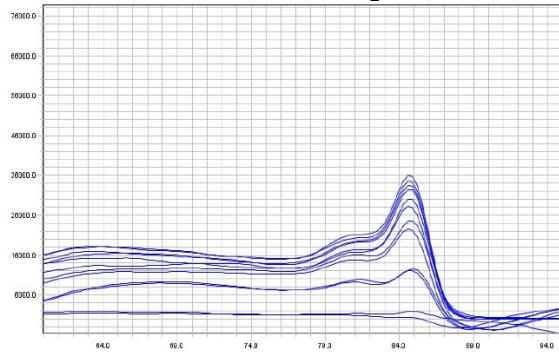


Curva padrão

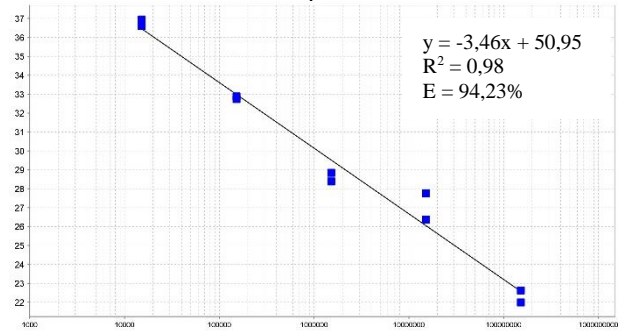


M

Curva de melting

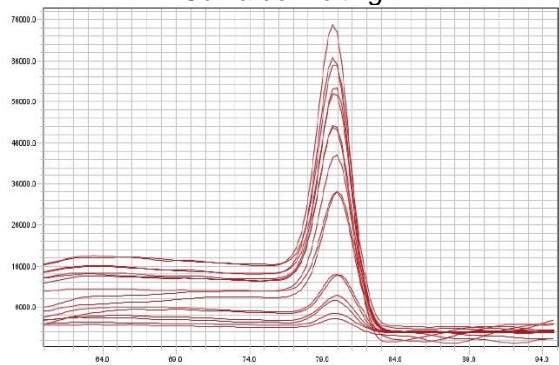


Curva padrão

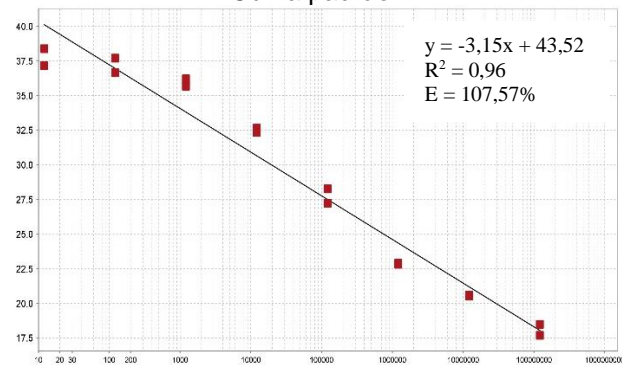


N

Curva de melting

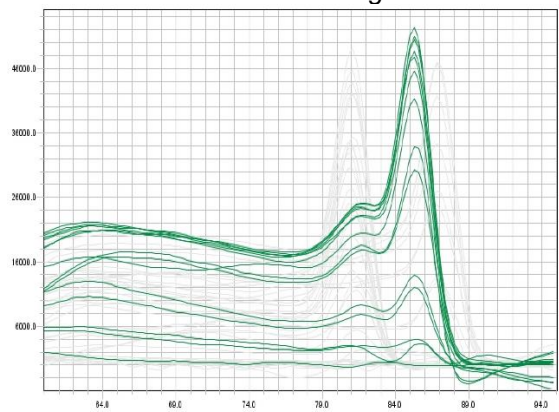


Curva padrão

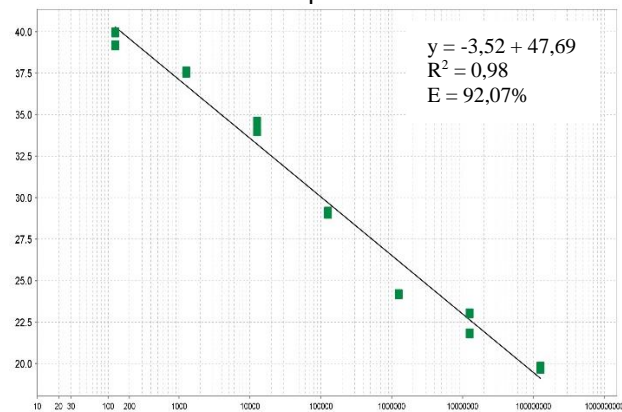


O

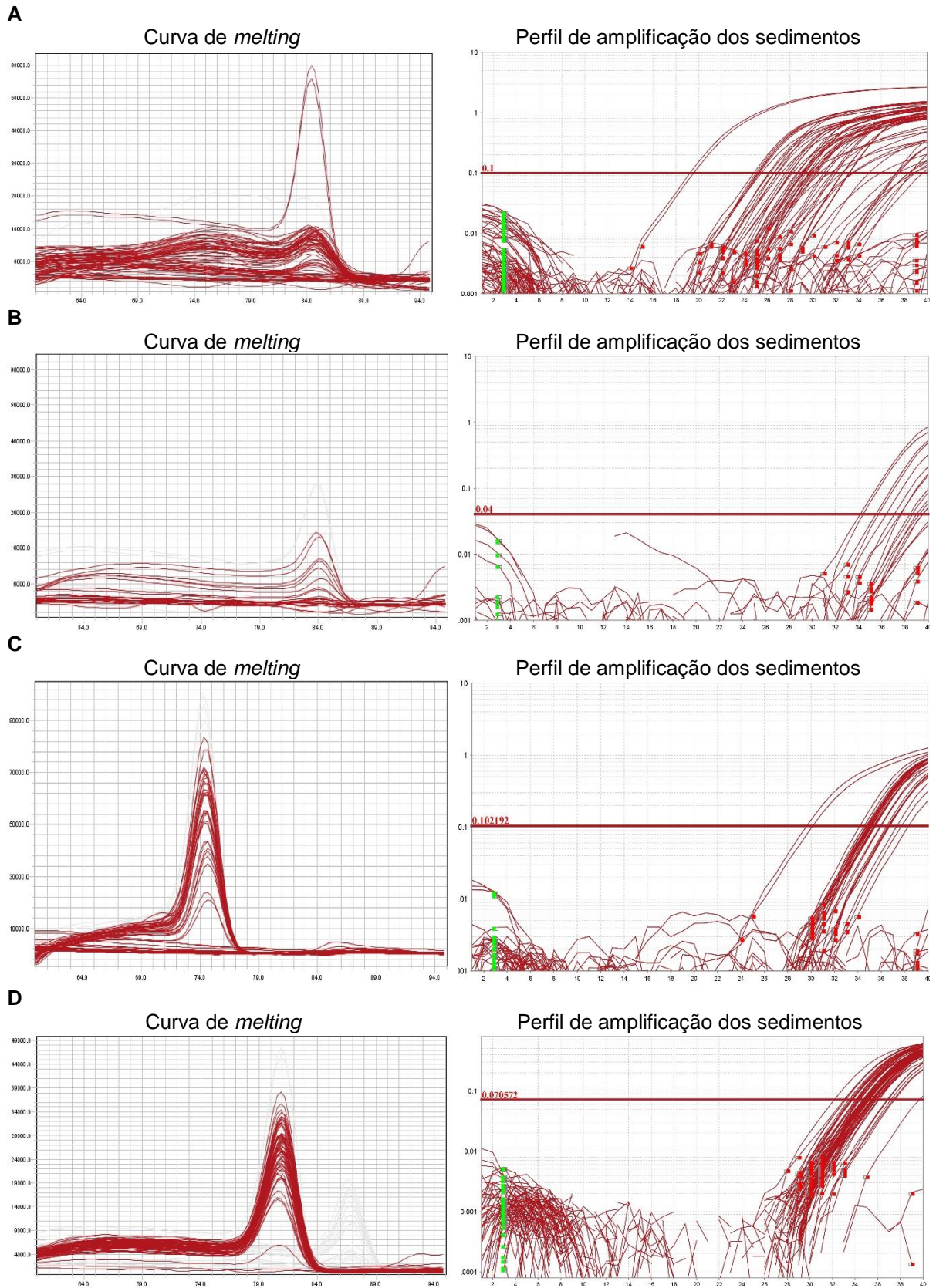
Curva de melting



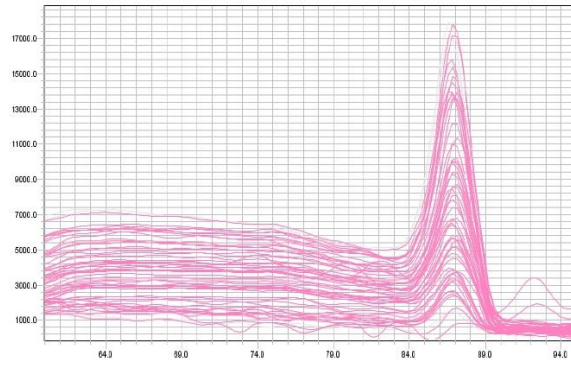
Curva padrão



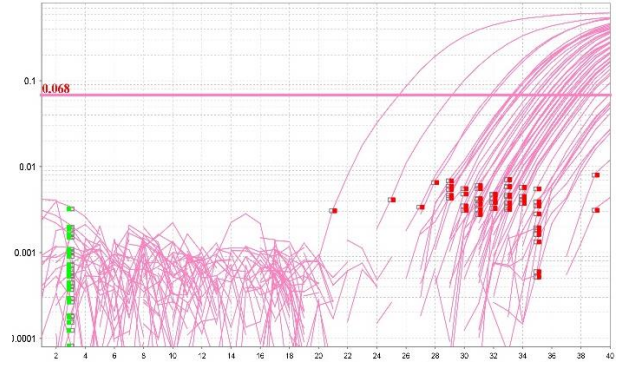
Apêndice B – Curva de *melting* e perfil de amplificação dos sedimentos para rDNA 16s(A), *int1*(B), *ermC*(C), *qnrB*(D), *sul1*(E), *sul2*(F), *tetM*(G) e *bla_{TEM}*(H).



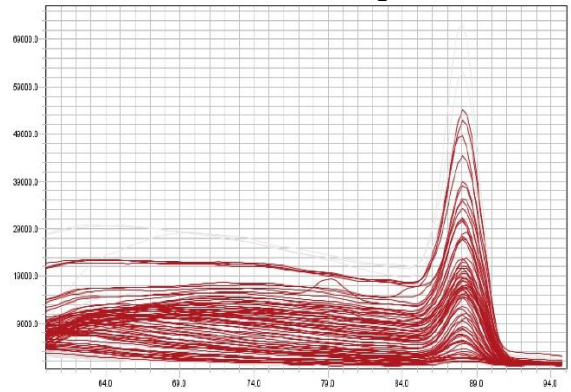
E

Curva de *melting*

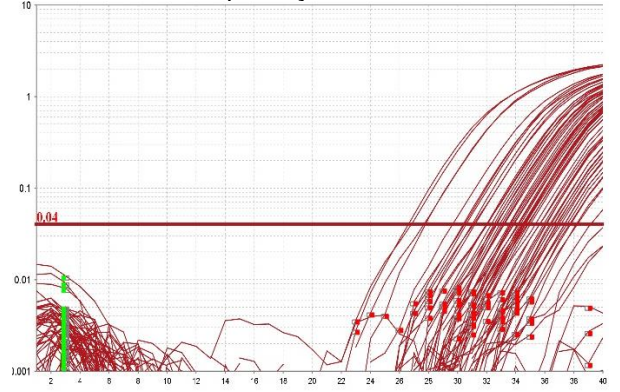
Perfil de amplificação dos sedimentos



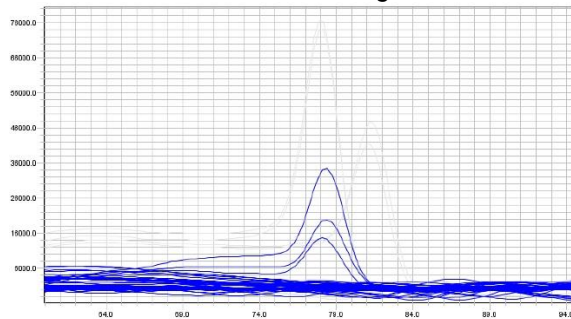
F

Curva de *melting*

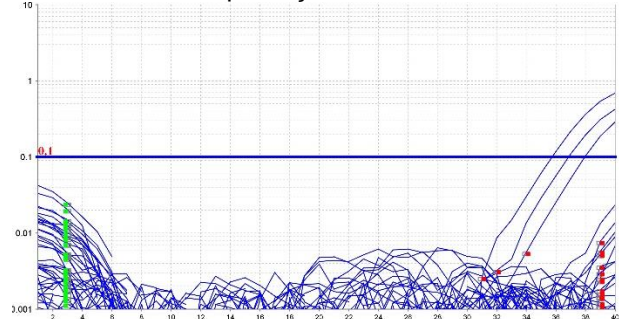
Perfil de amplificação dos sedimentos



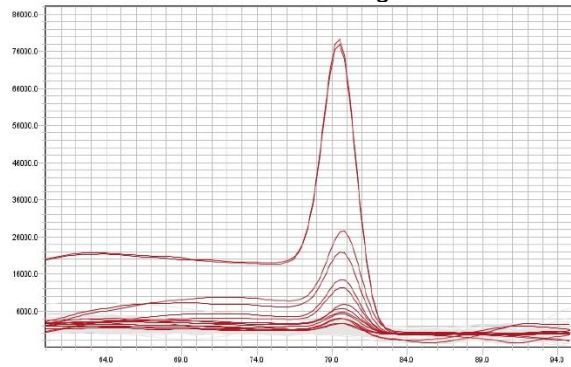
G

Curva de *melting*

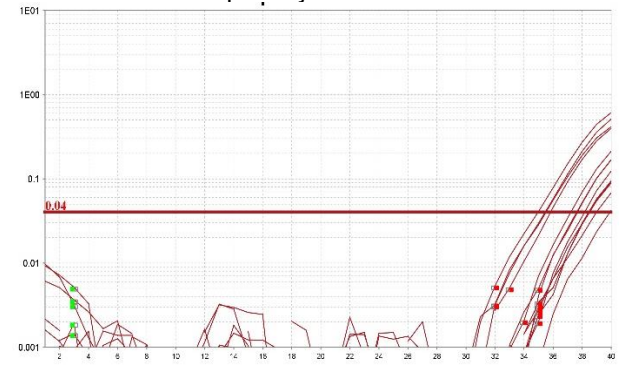
Perfil de amplificação dos sedimentos



H

Curva de *melting*

Perfil de amplificação dos sedimentos



Apêndice C - Detecção e abundância absoluta dos marcadores genéticos na BHRD em fevereiro de 2019 (nº de cópias/g).

<i>FEV</i>	<i>rDNA16s</i>	<i>Int1</i>	<i>Int2</i>	<i>vanA</i>	<i>ermC</i>	<i>qnrB</i>	<i>sul1</i>	<i>sul2</i>	<i>tetM</i>	<i>bla_{KPC}</i>	<i>bla_{NDM}</i>	<i>bla_{NDM-1}</i>	<i>bla_{SHV}</i>	<i>bla_{TEM}</i>	<i>bla_{VIM}</i>
PI01	3,92×10 ³	5,38×10 ²	-	-	-	5,57×10 ¹	1,37×10 ⁵	5,06×10 ³	-	-	-	-	-	-	-
PI02	7,22×10 ⁴	1,54×10 ¹	-	-	-	5,41×10 ¹	2,71×10 ³	2,92×10 ¹	-	-	-	-	-	-	-
PI03	4,40×10 ⁴	4,98×10 ¹	-	-	-	2,63×10 ¹	9,09×10 ³	4,96×10 ²	-	-	-	-	-	-	-
PI04	8,03×10 ³	6,10×10 ¹	-	-	-	2,39×10 ¹	1,05×10 ²	1,34×10 ¹	-	-	-	-	-	-	-
PI05	1,22×10 ⁵	4,98×10 ¹	-	-	-	1,07×10 ¹	8,72×10 ²	4,48×10 ¹	-	-	-	-	-	-	-
PI06	8,36×10 ³	2,72×10 ⁰	-	-	-	3,09×10 ¹	1,42×10 ²	2,12×10 ¹	-	-	-	-	-	-	-
PI07	1,04×10 ⁴	1,07×10 ⁰	-	-	-	8,28×10 ¹	9,27×10 ¹	4,95×10 ¹	-	-	-	-	-	1,38×10 ²	-
PI08	1,76×10 ²	2,98×10 ⁰	-	-	-	5,06×10 ¹	2,13×10 ⁴	3,03×10 ²	-	-	-	-	-	-	-
PI09	1,77×10 ⁴	5,96×10 ⁻¹	-	-	-	2,40×10 ¹	3,77×10 ³	1,74×10 ²	-	-	-	-	-	-	-
PI10	8,42×10 ²	6,15×10 ⁻¹	-	-	-	1,63×10 ¹	2,71×10 ³	4,53×10 ¹	-	-	-	-	-	-	-
PI11	2,22×10 ⁴	8,89×10 ⁻²	-	-	6,34×10 ⁵	8,13×10 ¹	2,28×10 ²	7,76×10 ¹	-	-	-	-	-	-	-
ST01	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
ST02	3,76×10 ⁰	8,35×10 ⁰	-	-	8,43×10 ⁵	3,74×10 ¹	1,49×10 ³	15,35×10 ¹	-	-	-	-	-	1,61×10 ²	-
ST03	3,43×10 ⁰	1,72×10 ²	-	-	6,47×10 ⁵	4,69×10 ¹	5,14×10 ¹	9,61×10 ¹	-	-	-	-	-	1,28×10 ²	-
ST04	4,26×10 ⁰	9,84×10 ¹	-	-	4,68×10 ⁵	4,07×10 ¹	-	7,63×10 ⁰	-	-	-	-	-	1,80×10 ²	-
ST05	2,90×10 ⁰	8,21×10 ¹	-	-	4,31×10 ⁵	2,78×10 ¹	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ST06	2,86×10 ⁰	-	-	-	6,53×10 ⁵	1,93×10 ¹	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ST07	3,65×10 ⁰	1,87×10 ²	-	-	-	6,00×10 ¹	4,08×10 ²	1,61×10 ¹	-	-	-	-	-	3,57×10 ²	-
ST08	4,65×10 ⁰	2,25×10 ¹	-	-	-	2,23×10 ¹	1,51×10 ²	8,21×10 ¹	-	-	-	-	-	-	-
ST09	1,40×10 ⁰	-	-	-	-	2,12×10 ¹	4,48×10 ²	3,16×10 ¹	-	-	-	-	-	-	-
ST10	4,34×10 ⁵	-	-	-	-	8,35×10 ¹	1,86×10 ²	3,88×10 ¹	-	-	-	-	-	-	-

NC: não coletado.

Apêndice E - Abundância relativa dos marcadores genéticos na BHRD em fevereiro de 2019 (nº de cópias/g).

<i>FEV</i>	<i>Int1</i>	<i>Int2</i>	<i>vanA</i>	<i>ermC</i>	<i>qnrB</i>	<i>sul1</i>	<i>sul2</i>	<i>tetM</i>	<i>bla_{KPC}</i>	<i>bla_{NDM}</i>	<i>bla_{NDM-1}</i>	<i>bla_{SHV}</i>	<i>bla_{TEM}</i>	<i>bla_{VIM}</i>
PI01	1,37×10 ⁻¹	-	-	-	1,42×10 ⁻²	3,48×10 ¹	1,29×10 ⁰	-	-	-	-	-	-	-
PI02	2,14×10 ⁻⁴	-	-	-	7,49×10 ⁻⁴	3,76×10 ⁻²	4,04×10 ⁻⁴	-	-	-	-	-	-	-
PI03	1,13×10 ⁻³	-	-	-	5,99×10 ⁻⁴	2,07×10 ⁻¹	1,13×10 ⁻²	-	-	-	-	-	-	-
PI04	7,60×10 ⁻⁵	-	-	-	2,97×10 ⁻³	1,31×10 ⁻²	1,67×10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-
PI05	4,08×10 ⁻⁴	-	-	-	8,78×10 ⁻⁵	7,14×10 ⁻³	3,67×10 ⁻⁴	-	-	-	-	-	-	-
PI06	3,25×10 ⁻⁴	-	-	-	3,69×10 ⁻³	1,70×10 ⁻²	2,54×10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-
PI07	1,03×10 ⁻⁴	-	-	-	7,97×10 ⁻³	8,91×10 ⁻³	4,76×10 ⁻³	-	-	-	-	-	1,33×10 ⁻²	-
PI08	1,69×10 ⁻²	-	-	-	2,88×10 ⁻¹	1,21×10 ²	1,72×10 ⁰	-	-	-	-	-	-	-
PI09	3,37×10 ⁻⁵	-	-	-	1,36×10 ⁻³	2,13×10 ⁻¹	9,85×10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-
PI10	7,31×10 ⁻⁴	-	-	-	1,93×10 ⁻²	3,23×10 ⁰	5,39×10 ⁻²	-	-	-	-	-	-	-
PI11	4,00×10 ⁻⁶	-	-	-	3,66×10 ⁻³	1,03×10 ⁻²	3,50×10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-
ST01	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
ST02	1,44×10 ⁻³	-	-	-	6,46×10 ⁻³	2,58×10 ⁻¹	9,25×10 ⁻³	-	-	-	-	-	2,78×10 ⁻²	-
ST03	6,36×10 ⁻²	-	-	-	1,73×10 ⁻²	1,90×10 ⁻²	3,55×10 ⁻⁴	-	-	-	-	-	4,72×10 ⁻²	-
ST04	5,46×10 ⁻³	-	-	-	2,26×10 ⁻³	-	4,24×10 ⁻⁴	-	-	-	-	-	1,00×10 ⁻²	-
ST05	1,03×10 ⁻¹	-	-	-	3,51×10 ⁻²	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ST06	-	-	-	-	2,66×10 ⁻²	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ST07	4,21×10 ⁻²	-	-	-	1,35×10 ⁻²	9,18×10 ⁻²	3,62×10 ⁻³	-	-	-	-	-	8,05×10 ⁻²	-
ST08	5,02×10 ⁻⁴	-	-	-	4,99×10 ⁻⁴	3,38×10 ⁻²	1,84×10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-
ST09	-	-	-	-	8,46×10 ⁻¹	1,79×10 ¹	1,26×10 ⁰	-	-	-	-	-	-	-
ST10	-	-	-	-	1,92×10 ⁻⁴	4,28×10 ⁻⁴	8,94×10 ⁻⁵	-	-	-	-	-	-	-
Média	2,20×10 ⁻²	-	-	-	6,45×10 ⁻²	1,05×10 ¹	2,43×10 ⁻¹	-	-	-	-	-	3,58×10 ⁻²	-

Apêndice F – Abundância relativa dos marcadores genéticos na BHRD em julho de 2019 (nº de cópias/g).

<i>JULHO</i>	<i>Int1</i>	<i>Int2</i>	<i>vanA</i>	<i>ermC</i>	<i>qnrB</i>	<i>su1</i>	<i>su2</i>	<i>tetM</i>	<i>blaKPC</i>	<i>blaNDM</i>	<i>blaNDM-1</i>	<i>blaSHV</i>	<i>blaTEM</i>	<i>blaVIM</i>
PI01	3,80×10 ⁻⁶	-	-	-	4,39×10 ⁻⁵	2,75×10 ⁻¹	2,27×10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-
PI02	1,03×10 ⁻³	-	-	-	3,29×10 ⁻³	7,15×10 ⁻¹	3,27×10 ⁻²	-	-	-	-	-	-	-
PI03	-	-	-	-	9,03×10 ⁻⁶	1,53×10 ⁻⁴	1,73×10 ⁻⁶	-	-	-	-	-	-	-
PI04	4,00×10 ⁻¹	-	-	-	2,20×10 ⁻¹	2,61×10 ⁰	3,11×10 ⁻²	-	-	-	-	-	-	-
PI05	6,07×10 ⁻⁶	-	-	-	2,37×10 ⁻⁴	1,81×10 ⁻²	1,26×10 ⁻⁴	-	-	-	-	-	1,81×10 ⁻³	-
PI06	-	-	-	-	3,33×10 ⁻¹	1,68×10 ¹	5,72×10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-	-
PI07	4,60×10 ⁻⁴	-	-	-	2,54×10 ⁻³	6,12×10 ⁻³	2,15×10 ⁻⁴	-	-	-	-	-	-	-
PI08	6,35×10 ⁻²	-	-	-	1,77×10 ⁻²	2,43×10 ⁻¹	2,09×10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-
PI09	4,44×10 ⁻³	-	-	-	3,98×10 ⁻³	2,81×10 ⁻¹	8,98×10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-
PI10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PI11	9,30×10 ⁻⁵	-	-	-	4,21×10 ⁻³	6,36×10 ⁻¹	1,66×10 ⁻²	-	-	-	-	-	5,43×10 ⁻³	-
ST01	1,93×10 ⁻⁶	-	-	-	1,30×10 ⁻⁵	5,72×10 ⁻⁴	2,17×10 ⁻⁵	2,06×10 ⁻²	-	-	-	-	1,10×10 ⁻³	-
ST02	4,93×10 ⁻⁵	-	-	-	4,17×10 ⁻⁵	4,92×10 ⁻⁴	-	1,23×10 ⁻²	-	-	-	-	2,67×10 ⁻⁴	-
ST03	-	-	-	-	7,82×10 ⁻⁵	7,23×10 ⁻⁴	6,00×10 ⁻⁵	-	-	-	-	-	3,65×10 ⁻³	-
ST04	8,66×10 ⁻³	-	-	-	4,79×10 ⁻²	5,65×10 ⁻¹	1,16×10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-
ST05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ST06	2,53×10 ⁻³	-	-	-	2,98×10 ⁻⁴	4,98×10 ⁻³	6,67×10 ⁻⁵	-	-	-	-	-	-	-
ST07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ST08	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ST09	-	-	-	-	5,22×10 ⁻¹	2,01×10 ⁰	-	-	-	-	-	-	-	-
ST10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Média	4,01×10 ⁻²	-	-	-	7,32×10 ⁻²	1,51×10 ⁰	4,77×10 ⁻²	1,64×10 ⁻²	-	-	-	-	2,45×10 ⁻³	-