



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA



LUCIMEIRE DE ÁVILA BARBOSA FONSECA

**DISTRIBUIÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA A
ANTIBIÓTICOS (GRAs) EM SISTEMA DE
TRATAMENTO DE EFLUENTES DE SUINOCULTURA**

OURO PRETO

2022

LUCIMEIRE DE ÁVILA BARBOSA FONSECA

**DISTRIBUIÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA A
ANTIBIÓTICOS (GRAs) EM SISTEMA DE
TRATAMENTO DE EFLUENTES DE SUINOCULTURA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso de Farmácia, da
Escola de Farmácia da Universidade
Federal de Ouro Preto (UFOP), como
requisito parcial para a obtenção do título
de bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Silvana de Queiroz
Silva

Coorientadora: Msc. Andressa Rezende
Pereira

OURO PRETO

2022

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

F676d Fonseca, Lucimeire de Ávila Barbosa.
Distribuição de genes de resistência a antibióticos (GRAs) em sistema de tratamento de efluentes de suinocultura.. [manuscrito] / Lucimeire de Ávila Barbosa Fonseca. - 2022.
64 f.: il.: color., gráf., tab.. + Equação.

Orientadora: Profa. Dra. Silvana de Queiroz Silva Silva.
Coorientadora: Ma. Andressa Rezende Pereira Pereira.
Monografia (Bacharelado). Universidade Federal de Ouro Preto.
Escola de Farmácia. Graduação em Farmácia .

1. Antibióticos. 2. Resíduos orgânicos como fertilizantes. 3. Suínos-
Fezes- Urina. I. Pereira, Andressa Rezende Pereira. II. Silva, Silvana de
Queiroz Silva. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 579

Bibliotecário(a) Responsável: Soraya Fernanda Ferreira e Souza - SIAPE: 1.763.787



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
REITORIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



FOLHA DE APROVAÇÃO

Lucimeire de Ávila Barbosa Fonseca

Distribuição de genes de resistência a antibióticos (GRAs) em sistema de tratamento de efluentes de suinocultura

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Farmacêutico Generalista.

Aprovada em 24 de Junho de 2022

Membros da banca

Profa. Dra. Silvana de Queiroz Silva - Orientadora - Universidade Federal de Ouro Preto
Msc. Andressa Rezende Pereira - Coorientadora - Universidade Federal de Ouro Preto
Prof. Dr. Luiz Fernando de Medeiros Teixeira - Universidade Federal de Ouro Preto
Profa. Dra. Aline Gomes de Oliveira Paranhos - Universidade Federal de Ouro Preto

Silvana de Queiroz Silva, orientadora do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 05/07/2022



Documento assinado eletronicamente por **Silvana de Queiroz Silva, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 05/07/2022, às 08:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0356961** e o código CRC **886E41C4**.

AGRADECIMENTOS

Concluir a graduação de farmácia é sem dúvidas uma das minhas maiores conquistas, foram tantos obstáculos, mas ao mesmo tempo tantos aprendizados que ao final tudo valeu a pena. Sou imensamente grata e fecho esse ciclo com sentimento de dever cumprido.

Agradeço a Deus, em primeiro lugar, por me dar força nas horas que achei que não teria, por cada pessoa que Ele colocou no meu caminho e por cuidar de mim em todos os momentos e detalhes.

Aos meus pais, Marcos e Lúcia, por todo amor e suporte nos momentos que mais precisei. Vocês são sem dúvidas, meu porto seguro e devo essa conquista a vocês, que não mediram esforços para eu chegar até aqui. Amo vocês!

À minha irmã, Lucimar e meu cunhado Maurício, que mesmo longe se fizeram presentes em todas as etapas, sempre me encorajando e sendo colo quando precisei, além de me presentear durante a graduação com minha amada afilhada, Betina.

Ao Gustavo, meu namorado e maior incentivador dos meus sonhos. Obrigada pelo companheirismo, pela compreensão e também por enxugar as minhas lágrimas sempre que precisei. Você é incrível. Amo você!

Às minhas companheiras de Ouro Preto, Mariana e Kênia, que caminharam comigo durante toda a graduação, compartilhando conquistas e sonhos. Tenho certeza que serão ótimas profissionais. E em especial a Lorrane, minha amiga de UFOP, de república, de rock, de estágio, de iniciação científica e de vida, sou muito grata pela nossa parceria e amizade. Vou levar vocês para a vida!

À minha segunda família, República Fruto Proibido, que me acolheu com muito amor e me proporcionou lindas amizades. Morar na Fruto sem dúvidas deixou estes anos de graduação mais engraçados e leves.

A minha orientadora e coorientadora, Silvana e Andressa, obrigada por toda paciência, conhecimentos transmitidos e por confiarem em mim;

E finalmente, a UFOP e à Escola de Farmácia pelo ensino de qualidade proporcionado.

A todos, os meus mais sinceros agradecimentos.

Muito obrigada!

RESUMO

O agronegócio brasileiro apresenta grande relevância no cenário mundial, com destaque para a produção animal, fazendo-se necessária a adoção de técnicas que visem assegurar a produtividade do setor. Assim, destaca-se a utilização de antibióticos como promotores de crescimento animal, tendo por objetivo prevenir doenças e aumentar a absorção de nutrientes. Muitas vezes estas substâncias não são totalmente absorvidas ou metabolizadas no organismo do animal, sendo excretadas na urina e fezes e conseqüentemente, estando presentes em resíduos e efluentes agroindustriais. A presença de antibióticos em efluentes pode ocasionar na aquisição de resistência a antibióticos, traduzida pela presença de GRAs. As unidades de tratamento de efluentes empregadas em fazendas de criação de suínos são projetadas para a remoção de matéria orgânica e nutrientes, sendo ainda pouco conhecida a remoção de genes de resistência a antibióticos. Perante este cenário, definiu-se como proposta do presente projeto quantificar GRAs em amostras de efluente bruto (EB) e tratado (ET), bem como em amostras de solo que receberam este efluente por meio do processo de fertirrigação (S1) e solo que não recebeu aplicação direta (S2). Foram monitorados os GRAs *blaTEM*, *ermB*, *qnrB*, *sulI* e *tetA*, bem como o gene indicador de mobilidade genética *intI1* e RNAr 16S. O gene *qnrB* foi o menos abundante em ambos os tipos de amostras, enquanto *ermB* foi o mais abundante no efluente. Para as amostras de solo, não houve um gene predominante. O sistema de tratamento não foi capaz de reduzir significativamente a proporção entre bactérias resistentes e bactérias totais, apesar de haver redução da abundância absoluta dos genes (cerca de 2 logs). Isso indica que o tratamento é seletivo, ou seja, reduz mais bactérias não-resistentes que bactérias resistentes. Nas amostras de solo, não houve diferença significativa entre S1 e S2, porém uma tendência de abundância relativa superior em S1 foi constatada para a maioria dos genes. Apenas o gene *blaTEM* apresentou maior abundância relativa em S2 que no solo fertirrigado diretamente com efluente tratado (S1), indicando que pode ter havido carreamento deste gene para a área ou devido a alguma característica particular de S2. Também foi observada diferença significativa entre a proporção de bactérias portadoras dos genes *blaTEM*, *ermB* e *tetA* entre ET e S1/S2. Logo, para esses genes, a prática de fertirrigação pode ser considerada benéfica na redução desta proporção.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estimativa da produção mundial de carnes de 2018 a 2028 (mil toneladas)	14
Figura 2 - Esquema simplificado de um biodigestor	17
Figura 3 - Representação esquemática do sistema de lagoa facultativa	18
Figura 4 - Representação dos diversos tipos de mecanismos de resistência a antimicrobianos por bactérias	22
Figura 5 - Representação ilustrativa da transferência horizontal de genes	26
Figura 6 - Sistema de tratamento em estudo	34
Figura 7 - Área de estudo da suinocultura estudada -----	36
Figura 8 - Variação das abundâncias relativas dos genes no efluente bruto (EB) e tratado (ET) nas seis campanhas amostrais	44
Figura 9 - Variação das abundâncias relativas dos genes no efluente tratado (ET), solo fertirrigado diretamente (S1) e solo sem fertirrigação direta (S2) para as quatro campanhas amostrais	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais genes de resistência a antibióticos.....	28
Tabela 2 - Quantificação de GRAs em amostras de efluente e estrume de suinocultura.....	29
Tabela 3- Estudos de monitoramento de GRAs em amostras de solo fertirrigado com dejetos suínos-----	33
Tabela 4 - Primers utilizados no presente estudo	37
Tabela 5 - Condições utilizadas no termociclador para PCR convencional	38
Tabela 6 - Condições utilizadas no equipamento de PCR em tempo real.....	39
Tabela 7 - Monitoramento de genes em amostras de efluente bruto (EB) e tratado (ET)	42
Tabela 8 - Monitoramento de genes em amostras de solo fertirrigado diretamente (S1) e solo sem aplicação direta (S2)	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	<i>Adenosine Triphosphate Binding Cassette</i>
BRAs	Bactérias Resistentes a antibióticos
Ct	Ciclo de Threshold
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DQO	Demanda Química de Oxigênio
EB	Efluente Bruto
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ET	Efluente Tratado
EUA	Estados Unidos da América
GRAs	Genes de Resistência a Antibióticos
LB	Luria Bertani
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MATE	<i>Multidrug And Toxic Efflux</i>
mRNA	RNA Mensageiro
MSF	<i>Major Facilitator Family</i>
NH ₃	Amônia
OMS	Organização Mundial da Saúde
PABA	Ácido p-aminobenzoico
pb	Pares de bases
PBP	Penicillin-Binding Proteins
PBS	Tampão de Fosfato Salino
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PIB	Produto Interno Bruto
PSF	Peste Suína Africana
qPCR	<i>Quantative Polymerase Chain Reaction</i>
RND	<i>Resistance-Nodulation-Division Family</i>
RNA _r	RNA Ribossomal
SMR	<i>Small Multidrug Resistance</i>
S1	Solo fertirrigado diretamente
S2	Solo sem fertirrigação direta

Tn	<i>Transposons</i>
tRNA	RNA Transportador
UE	União Europeia
USDA	Departamento de Agricultura dos Estados Unidos
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	ii
RESUMO	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS	v
SUMÁRIO	ix
1. INTRODUÇÃO	10
2. JUSTIFICATIVA	11
3. OBJETIVOS	12
3.1 Objetivo Geral	12
3.2 Objetivos Específicos	12
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
4.1 Dados de Produção de Carne Suína	13
4.2 Tecnologias de Tratamento de Efluente de Suinocultura	15
4.3 Uso de Antibióticos	20
4.4 Mecanismos de Resistência	21
<i>4.4.1 Alteração da Permeabilidade</i>	<i>22</i>
<i>4.4.2 Alteração do Local/ Sítio Alvo de Ação</i>	<i>23</i>
<i>4.4.3 Bombas de Efluxo</i>	<i>23</i>
<i>4.4.4 Mecanismo Enzimático</i>	<i>24</i>
4.5 Aquisição de resistência a antimicrobianos	25
4.6 Quantificação de GRAs em Efluentes/Estrume Suíno	28
4.7 Quantificação de GRAs em solos que receberam efluente/estrume suíno	31
5. MATERIAIS E MÉTODOS	34
5.1 Amostras de efluente	34
5.2 Amostras de solo	35

5.3	Quantificação dos Elementos Genéticos	36
5.3.1	<i>Preparo das Amostras.....</i>	36
5.3.2	<i>Extração de DNA</i>	36
5.3.3	<i>PCR convencional.....</i>	37
5.3.4	<i>PCR em Tempo Real</i>	38
5.4	Análise Estatística.....	41
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
6.1	Abundância absoluta dos genes no efluente	42
6.2	Comparação entre as abundâncias de genes do efluente bruto e tratado	
43		
6.3	Abundância absoluta dos genes no solo	46
6.4	Comparação entre as abundâncias de genes do efluente tratado e solo	
47		
7.	CONCLUSÃO.....	51
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, tem se verificado o destaque do Brasil no *ranking* mundial de produção e exportação de carnes, sendo que em 2019, o país foi o maior exportador de carne de frango e o quarto maior exportador de carne suína (EMBRAPA, 2020). Para garantir essa elevada produção, o uso de antibióticos tanto para fins terapêuticos, controle e prevenção de doenças, quanto como promotores de crescimento, tem sido uma das práticas adotadas. Atualmente no Brasil a adição de antibióticos na ração e água dos animais para promoção de crescimento vem sendo restringida (MAPA, 2020a), devido à crescente preocupação mundial com a disseminação de resistência bacteriana a estas substâncias (OMS, 2015).

O uso de antibióticos acarreta numa série de efeitos em animais, seres humanos e ao meio ambiente, destacando-se a seleção de bactérias resistentes a antibióticos (BRAs) que carregam genes de resistência a antibióticos, que podem ser disseminados a partir da disposição final de efluentes ou estrume, oriundos da criação de animais (ZHU et al., 2013; FANG et al., 2015; LUO et al., 2017; CHENG et al., 2018).

Sabe-se que vários GRAs já foram detectados tanto em efluentes brutos de suinocultura como em efluentes tratados (JINDAL et al., 2006; GRAVES et al., 2011; WANG et al., 2012; ZHANG et al., 2013; TAO et al., 2014; AGGA et al., 2015; HUANG et al., 2015; WAN; CHOU, 2015; HUANG et al., 2017; PARK et al., 2018). Uma prática comum nas granjas de suinocultura é o emprego dos efluentes tratados como fertilizante nas plantações (BARROS et al., 2019). Assim, pode ocorrer a disseminação destes genes para outros compartimentos ambientais, como solo, córregos etc.

Na literatura brasileira, verifica-se a ausência de estudos de investigação da disseminação de GRAs em granjas de suinocultura. Assim sendo, objetivou-se no presente trabalho quantificar cinco GRAs e o elemento móvel *intI1* em um sistema de tratamento de efluentes suínos, localizado no estado de Minas Gerais. Adicionalmente, o solo no qual este efluente é aplicado também foi monitorado com relação à dinâmica de GRAs.

2. JUSTIFICATIVA

A utilização de antibióticos na agroindústria, seja para fins terapêuticos ou como promotores de crescimento, acarreta na disseminação destes compostos no meio ambiente por meio da aplicação de efluentes/estrume, gerados no confinamento animal, como fertilizantes em áreas agrícolas.

Na granja em estudo foi detectado no efluente bruto e no efluente tratado o antibiótico norfloxacino, do grupo das fluoroquinolonas, sugerindo que a granja faz o uso de antibióticos nos animais.

O uso intensivo de antibióticos está relacionado com o aumento de bactérias resistentes e, conseqüentemente à disseminação de genes de resistência a antibióticos, sendo essa uma questão de saúde pública global (ZHU et al., 2013). Destaca-se que a seleção de BRAs, contendo GRAs, e a possibilidade destas bactérias de infectar os seres humanos é especialmente importante do ponto de vista clínico, pois torna o tratamento de infecções mais lento, o que pode ser fatal no ambiente hospitalar (CHANDER et al., 2007).

A dinâmica de GRAs em sistemas de tratamento de efluentes suínos utilizando unidades como os biodigestores e lagoas facultativas, frequentemente empregadas no Brasil, bem como em solos fertirrigados com o efluente tratado, ainda é pouco conhecida. Assim, o monitoramento destes é de suma importância, perante a possibilidade de disseminação de genes de resistência a antibióticos no meio ambiente.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O presente trabalho tem por objetivo geral quantificar elementos genéticos de resistência a antibióticos em amostras de efluente suíno bruto e tratado, bem como em amostras de solo fertirrigado com este efluente, após tratamento.

3.2 Objetivos Específicos

- Quantificar os GRAs *blaTEM*, *ermB*, *qnrB*, *sulI* e *tetA*, bem como o elemento móvel *intI1* e o gene das bactérias totais RNAr 16S, no efluente suíno bruto e tratado;
- Quantificar estes mesmos genes em amostras de solo que receberam o efluente tratado como fertilizante;
- Quantificar estes mesmos genes em amostras de solo sem fertirrigação.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Dados de Produção de Carne Suína

O consumo e produção de carne suína mundial têm aumentado substancialmente ao longo dos anos. Tal fato se deu após 1978, no qual a carne suína fixou-se como a mais significativa fonte de proteína animal do mundo. De acordo com Gonçalves e Palmeira (2006), ocorreu um grande avanço na técnica e no modelo de coordenação das atividades suínolas nos últimos tempos, entre provedores de insumos, produtores rurais, agroindústrias, atacado, varejo e consumidores. No âmbito da criação, tal atividade passou a ser realizada por meio de cadeias de produção, examinando a atividade de forma econômica (CHÁVEZ; MOREIRA; DUARTE, 2016).

Neste momento, o Brasil se encontra como o quarto maior produtor mundial de carne suína, no qual em 2021 chegou à ordem de 4,325 milhões de toneladas, de acordo com dados da EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). A China ocupa a posição de maior produtor de proteína suína no mundo, chegando à produção de 48,850 milhões de toneladas. Em seguida, tem-se a União Europeia (UE) com 23,680 milhões de toneladas e os Estados Unidos da América (EUA), com 12,568 milhões de toneladas (EMBRAPA, 2022).

O USDA (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos), baseado em projeções, previu um aumento de 3,5% na produção de suínos para 2020 no Brasil, estimulada por exportações recordes de suínos e pela expansão da demanda doméstica. Já para o consumo doméstico em 2020, o órgão americano estimou um total de 3,1 milhões de toneladas consumidas.

O rebanho suíno da região Sul do Brasil detém a maior representação numérica, econômica e tecnológica, tendo em vista a influência europeia na criação de suínos. É nesta região que se localiza o maior número de indústrias, grande parte delas, dotadas de tecnologia de ponta (SEBRAE, 2008). Segundo o USDA, o Brasil apresenta o quarto maior rebanho suíno mundial. A Região Sul concentrou quase metade de todo esse efetivo, 49,7%. Sendo o estado de Santa Catarina responsável por 19,2% da totalidade nacional, em seguida o Paraná com 16,6% e o Rio Grande do Sul com 13,8%. Fora do Sul, o estado de Minas Gerais ganhou notoriedade com 12,7% (IBGE, 2019).

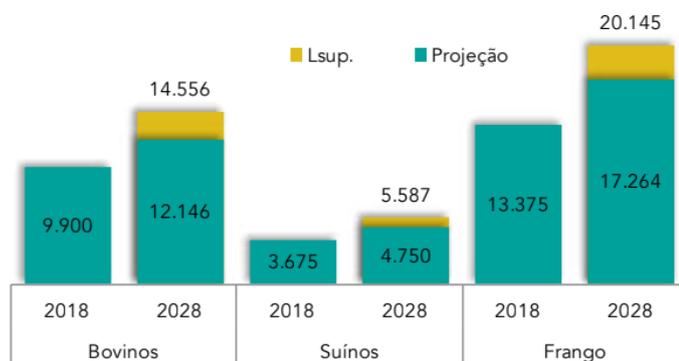
Desde 1990, a produção brasileira de suínos vem sofrendo alterações significativas. Devido ao processo de globalização da economia e com a grande abertura dos mercados, a

indústria brasileira e o setor de agronegócios precisaram se especializar para conseguir maior competitividade em relação às empresas exteriores. Com isso, a produção de suínos começou, mesmo que lentamente, a aderir à profissionalização do setor (SOUZA et al., 2018).

A suinocultura é responsável pela maior oferta de proteína animal. Isso é sustentado por dados que confirmam que a produção total de carne suína representou quase 38% do total de carnes produzidas no mundo, no ano de 2015. As aves foram responsáveis por 35% e a carne bovina por 21% (SEBRAE, 2016).

As projeções para a produção de carne no Brasil indicam crescimento para próximos anos. Entre as variedades de carnes, a suína e a de frango devem crescer anualmente 2,6%. Já a bovina deve crescer um pouco menos, com um crescimento projetado de 1,9% ao ano. A seguir, na Figura 1, são apresentados dados da estimativa da produção global de proteína animal do ano de 2018 a 2028 (MAPA, 2018).

Figura 1 - Estimativa da produção mundial de carnes de 2018 a 2028 (mil toneladas)



Fonte: MAPA (2018)

No âmbito social, estimativas apontam que a criação de suínos gerou aproximadamente 35 mil empregos diretos, e cerca de 130 mil pessoas se beneficiaram de alguma forma, proporcionando uma massa salarial de R\$ 3,34 bilhões no ano de 2015. Destes 35 mil empregos, a maior parte foi advinda das atividades operacionais de produção de suínos, compondo 92% do total de empregos gerados. Já as atividades administrativas relacionadas às granjas geraram 2,8 mil postos de trabalhos (SEBRAE, 2016).

O plantel reprodutivo brasileiro foi de 1.720.255 matrizes, tendo produzido 39.263.964 suínos para abate em 2015. Esse volume, quando se observam as várias etapas de produção e consumo, fez com que o Produto Interno Bruto (PIB) da suinocultura no Brasil somasse cerca de R\$ 62,537 bilhões neste ano (SEBRAE, 2016).

Já em relação ao consumo per capita, com base em dados para 2015 da National Pork Board (2016), os maiores consumidores de carne suína são China/Hong Kong/Macau e União Europeia, ambos com consumo ligeiramente superior a 40 kg por ano. Para efeito de comparação, o consumo nos Estados Unidos é de 29,2 kg por ano, perante 21,2 kg por ano na Rússia e 15,1 kg por ano no Brasil (GUIMARÃES et al., 2017).

4.2 Tecnologias de Tratamento de Efluente de Suinocultura

A suinocultura gera uma alta carga de efluentes que são liberados no meio ambiente, fazendo com que esta atividade seja caracterizada como de alto impacto ambiental. Porém, existem várias tecnologias e sistemas de tratamento que possuem a capacidade de reduzir os níveis dos poluentes dos efluentes da suinocultura (SANTOS; DAYMERLE; CAMPOS, 2014).

Dentre tais sistemas e tecnologias de tratamentos, podem ser citadas as camas sobrepostas, esterqueiras, compostagem, biodigestores e lagoas facultativas, sendo estas duas últimas empregadas na granja em análise no presente trabalho.

A técnica de camas sobrepostas iniciou-se como alternativa à redução da quantidade dos efluentes produzidos por granjas, que diretamente diminui a poluição ambiental (SANTOS; MYERLE; CAMPOS, 2014). O princípio consiste num revestimento do piso da granja por material poroso, como maravalha e cascas de arroz, com altura média de 0,5 m que absorve o efluente de suinocultura, diminuindo seu volume, e facilitando seu manejo (KUNZ; STEINMETZ; BORTOLI, 2010).

Neste sistema, não há a necessidade de investimentos para tratar o efluente, além da necessidade de remoção do material dos galpões, se apresentando assim como uma interessante alternativa para pequenas propriedades (MAPA, 2016). Segundo Paulo et al. (2009), as camas sobrepostas evitam a higienização frequente das baias, diminuindo o consumo de água e a emissão de amônia (NH₃) quando comparado com o piso de concreto, além de facilitar o processo de degradação da matéria orgânica.

As esterqueiras se apresentam como outra possibilidade tecnológica simples, mas que, se utilizada de forma correta e seguindo orientações, mostra-se eficiente na diminuição do potencial poluidor dos efluentes da suinocultura, tanto quanto as outras (SANTOS; MAYERLE; CAMPOS, 2014). Recomenda-se que o tempo de armazenamento, para uma correta estabilização da matéria orgânica e inativação de BRAs, seja de cerca de 120 dias, sendo

tal exigência passível de alterações de acordo com as legislações estaduais (KUNZ; HIGARASHI; OLIVEIRA, 2005).

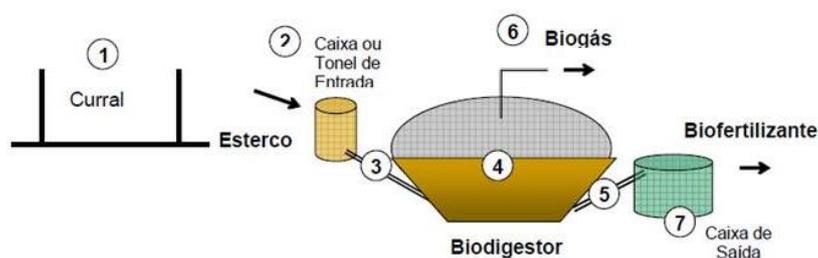
É de extrema importância que as esterqueiras tenham profundidade mínima de 2,5 m, pois, durante o armazenamento, o efluente sofre a degradação anaeróbica, logo, pode haver a liberação de gases que geram odores, principalmente nos meses de verão, quando o aumento da temperatura ambiente favorece a atividade biológica e a volatilização de gases (KUNZ; HIGARASHI; OLIVEIRA, 2005). Após a permanência nas esterqueiras, os efluentes de suinocultura geralmente são usados como fertilizante (SANTOS; MAYERLE; CAMPOS, 2014).

A compostagem é conceituada como a decomposição biológica e a estabilização das substâncias em ambientes adequados, como presença de bactérias termofílicas, na qual são capazes de produzir calor, elevando as temperaturas, dando origem então a um produto final estável e sem prejuízos quando liberados no meio ambiente (FILHO et al., 2013). Por gerar um produto final estável e seco, torna-se possível sua fácil estocagem e seu transporte para outras localidades, tornando esta técnica uma interessante possibilidade para situações onde há pouca área disponível para a distribuição dos efluentes líquidos (MAPA, 2016). A compostagem pode ser feita a partir de duas formas, uma com estruturas simples de alvenaria com manejo das leiras de forma manual (OLIVEIRA, 2004), ou sem intervenções humanas, usando revolvedores para a biomassa (OLIVEIRA et al., 2011).

A digestão anaeróbia, processo que ocorre nos biodigestores, é outra alternativa tecnológica para gerenciar os efluentes suínos. A matéria orgânica presente nos efluentes/resíduos sofre degradação anaeróbia, gerando como produtos finais o digestato, que pode ser usado como biofertilizante, e biogás, este último quando encaminhado para fins de geração de energia e calor, pode agregar valor a este resíduo (PERDOMO et al., 2003; MAPA, 2016).

Existem vários modelos de biodigestores e cada vez mais incentivos direcionados ao aprimoramento e adaptação destes equipamentos, visando aumentar a eficiência e reduzir os custos dos equipamentos (KUNZ; HIGARASHI; OLIVEIRA, 2005). Na Figura 2, é mostrado um esquema simplificado dos itens necessários para o funcionamento de um biodigestor.

Figura 2 - Esquema simplificado de um biodigestor



Fonte: Torres, Pedrosa e Moura (2012)

Analisando o esquema, observa-se que no número 1, localiza-se o curral ou depósito de efluente/estrupe. O efluente ali gerado segue em direção ao tonel de entrada, representado por 2, no qual é misturado com água, caso tenha baixa diluição. No número 3, tem-se a tubulação de entrada e no interior do biodigestor de fato, (número 4), ocorre à digestão anaeróbia, no qual a mistura permanece por tempo suficiente para acontecer tal processo, com a produção final de biofertilizante e do biogás. O biodigestor é revestido por uma manta plástica que aprisiona os gases gerados e normalmente o biogás é encaminhado até a tubulação de saída do gás, representada como o número 6. O efluente depois de tratado é encaminhado para a tubulação de saída, representado pelo número 5, onde o material líquido é encaminhado para a caixa de saída (número 7), onde fica armazenado para então ser usado como biofertilizante (TORRES; PEDROSA; MOURA, 2012) ou pode seguir para outros tratamentos.

Em 1908, a Índia foi o primeiro país a construir e instalar o biodigestor. Na década de 1950, a China deu início à implantação de biodigestores no país, resultando em 1992 num total de aproximadamente 7,2 milhões de equipamentos (ANDRADE et al., 2002). No Brasil, esta técnica surgiu na década de oitenta e ainda hoje é amplamente utilizada, visto que, os biodigestores são arquitetados e construídos de acordo com o volume de efluentes suínos que cada granja produz diariamente (COELHO et al., 2006; MAPA, 2016). No entanto, o efluente estabilizado após digestão anaeróbia ainda apresenta alta carga poluidora, não podendo ser lançado no meio ambiente, sendo esta, uma das maiores limitações da tecnologia (KUNZ; HIGARASHI; OLIVEIRA, 2005).

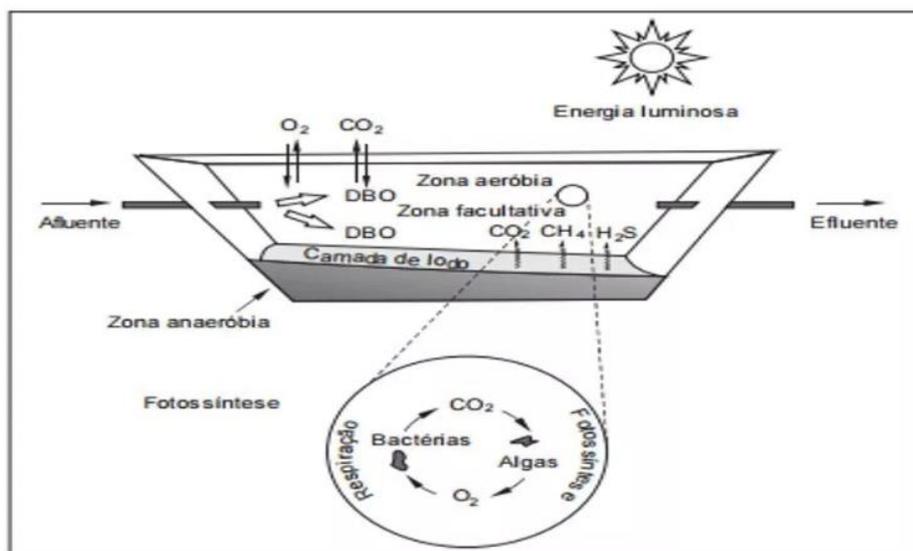
Como possibilidade de refinamento do tratamento dos efluentes suínos gerados, têm-se as lagoas de estabilização (MEDRI et al., 2007). Mesmo que para a sua implantação sejam necessárias grandes áreas disponíveis, os bons resultados quanto à remoção de matéria orgânica

e sólidos e baixos custos financeiros para sua construção, apontam esta tecnologia como uma inteligente alternativa (SILVA et al., 2009).

A lagoa facultativa é uma das variantes mais simples das lagoas de estabilização. Estas lagoas necessitam de poucos processos, sendo grande parte natural, sem a necessidade de nenhum equipamento, pois sua construção se baseia na movimentação de terra, preparação de taludes e impermeabilização do solo (VON SPERLING, 2002; 2005).

Neste sistema, o efluente entra por uma extremidade da lagoa e, ao final do processo, sai na extremidade oposta. Esta etapa se estende por longos períodos, normalmente superior a 20 dias, até que os processos naturais aconteçam e a matéria orgânica seja estabilizada pelos agentes biológicos. Estes mecanismos acontecem em zonas chamadas de aeróbicas, facultativas e anaeróbicas, como apresentado na Figura 3.

Figura 3 - Representação esquemática do sistema de lagoa facultativa



Fonte: von Sperling (1997)

A matéria orgânica suspensa (Demanda Bioquímica de Oxigênio- DBO particulada) tende a sedimentar, formando o lodo de fundo, que em seguida será decomposto por microrganismos anaeróbios, liberando gases, como o carbônico e metano, e formando, além disso, uma fração não biodegradável que continuará no fundo (VON SPERLING, 2002; 2005).

Já a matéria orgânica dissolvida (DBO solúvel), juntamente com a matéria orgânica em suspensão de pequenas dimensões (DBO finamente particulada), não sedimentarão, permanecendo assim dispersa na massa líquida. Na camada mais superficial, têm-se a zona aeróbia, no qual, a matéria orgânica é oxidada por meio da respiração aeróbia, em presença de

oxigênio, que é suprido por meio da fotossíntese das algas, provocando assim um equilíbrio entre o consumo e a produção de oxigênio e gás carbônico (VON SPERLING, 2002; 2005).

Como a fotossíntese só ocorre durante o dia, é necessário que nas lagoas facultativas estejam presentes várias espécies de bactérias responsáveis pela estabilização da matéria orgânica e que sejam capazes de sobreviver tanto na presença, quanto na ausência de oxigênio. Em situações de ausência de oxigênio livre, são utilizados outros aceptores de elétrons como nitratos e sulfatos e esta zona que poderá ou não, conter oxigênio, é chamada de zona facultativa (VON SPERLING, 2002). Este processo faz com que ocorra a melhora nos valores da DBO, Demanda Química do Oxigênio (DQO), NH_4^+ , sólidos totais e sólidos sedimentáveis (OLIVEIRA et al., 1993).

Atividades como a suinocultura devem adotar algum tipo de tratamento, independente de qual seja, antes dos efluentes suínos serem lançados no meio ambiente. Vale ressaltar que o lançamento de efluentes é regido por legislações federais, estaduais e até mesmo municipais. A lei de maior importância no âmbito federal é a Resolução CONAMA nº 430 de 13 de maio de 2011, criada para alterar e complementar a Resolução nº 357 de 18 de março de 2005, ambas com o objetivo de estabelecer as condições e padrões seguros para o lançamento de efluentes (ITO; GUIMARÃES; AMARAL, 2016; BRASIL, 2011) em corpos d'água. No estado de Minas Gerais, a Deliberação Normativa COPAM nº 01 de 2008 possui o mesmo papel (MINAS GERAIS, 2008).

A Resolução CONAMA nº 430/2011 estabelece que o lançamento de efluentes em geral não deve causar poluição ou contaminação das águas superficiais e subterrâneas, precisando para isso, seguir algumas condições pré-estabelecidas. A remoção mínima de 60% de DBO é uma das principais determinações da legislação federal. No âmbito estadual, é estipulado limite máximo de DBO de 60 mg L^{-1} ou tratamento com eficiência mínima de 75% de remoção desse parâmetro. Além disso, diferentemente do padrão federal, a lei estadual estabelece o limite máximo de Demanda Química de Oxigênio de 180 mg L^{-1} ou 70% de eficiência de remoção do mesmo. Percebe-se que a legislação estadual é mais restritiva que a federal.

Apesar de recorrente, o uso de efluente tratado de suinocultura ainda não é uma prática regulamentada no Brasil, contando apenas a Instrução Normativa nº 11 de 2014 no estado de Santa Catarina, que sugere algumas recomendações para a aplicação de efluente suíno como fertilizante e para o monitoramento do solo adubado, contemplando apenas nutrientes como fósforo e nitrogênio (FATMA, 2014).

4.3 Uso de Antibióticos

O uso de antimicrobianos na suinocultura pode ser classificado de acordo com as formas de aplicação dos produtos (SANTOS et al., 2009). O uso terapêutico tem por objetivo o tratamento de infecções bacterianas pré-existentes, através da medicação de animais doentes. O uso metafilático refere-se ao tratamento apenas após o surgimento de sinais clínicos de alguma infecção em um determinado animal do lote, na qual, este animal tem potencial de transmissão aos demais animais desse grupo. Já o uso profilático dá-se a partir do momento em que se reconhece a chance de determinado animal desenvolver a doença, buscando evitar o surgimento de sinais clínicos. E por fim, o uso aditivo na qual se adiciona o antimicrobiano na alimentação como forma de ganho de peso e com o objetivo de melhorar a conversão alimentar dos animais (SOBESTIANSKY; BARCELLOS, 2007).

Alguns fármacos com finalidade de aditivos adicionados à alimentação de animais foram proibidos no Brasil, entre eles avoparcina, cloranfenicol, nitrofuranos, anfenicois, tetraciclina, β -lactâmicos (penicilinas e cefalosporinas), quinolonas, sulfonamidas sistêmicas, espiramicina, eritromicina (MAPA, 2020a). Os antibióticos tilosina, lincomicina e tiamulina, são os mais recentemente proibidos pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA, atendendo a recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS) para prevenção da resistência aos antimicrobianos (MAPA, 2020b).

Entretanto, os principais princípios ativos dos antimicrobianos utilizados como promotores de crescimento para suínos ou pró-nutrientes, disponíveis no mercado são a avilamicina, colistina, ou compostos sintéticos químicos, tais como, o olanquidox, ácido 3-nitro, nitrovin, halquinol e ácido arsanílico (BRUMANO; GATTÁS, 2009).

Os antibióticos da classe dos macrolídeos são usados com grande frequência no tratamento de infecções bacterianas humanas, estabilização da flora intestinal no período de desmame e também na agricultura. Como exemplo tem-se a tilosina, que atualmente se tornou proibido para uso na promoção de crescimento, mas que foi usado frequentemente para este fim (WANG et al., 2005). Estimativas apontam que nos EUA, as indústrias suínas usam mais de 83.000 kg do antibiótico tetraciclina e 25.000 kg de tilosina como promotores de crescimento por ano (APLEY et al., 2012).

Apesar da comprovada capacidade de melhorar o desempenho de suínos, o uso de antimicrobianos como promotores do crescimento vem sendo progressivamente restringido, pois tem sido considerada uma conduta de elevado potencial para a seleção de bactérias

resistentes a antibióticos, devido à exposição desses organismos aos antimicrobianos no trato intestinal ou no próprio resíduo animal (GRAVES et al., 2011). Sabe-se que até 95 % dos ingredientes ativos administrados aos animais podem ser integralmente eliminados nas fezes e urina sem sofrer qualquer metabolização no trato digestivo animal (SARMAH; MEYER; BOXALL, 2006). E mesmo que grande parte seja metabolizada, alguns dos produtos de degradação excretados podem permanecer bioativos (REGITANO; LEAL, 2010).

4.4 Mecanismos de Resistência

De acordo com sua ação, os antibióticos podem ser classificados como bactericidas ou bacteriostáticos. Ou seja, conseguem eliminar diretamente os microrganismos ou inibir o crescimento e a multiplicação de tais, respectivamente. Os agentes antimicrobianos podem ser classificados de acordo com o principal mecanismo de ação para a eliminação da bactéria resistente. Podendo atuar de 5 formas diferentes: 1) inibição da síntese de proteínas; 2) inibição da síntese de folato 3) interferência na síntese de ácido nucléico 4) inibição da síntese da parede celular 5) desestabilização da membrana da célula bacteriana (NOGUEIRA et al., 2016).

Compreender os mecanismos nos quais as bactérias conseguem resistir ao potencial bactericida ou bacteriostático dos antimicrobianos é imprescindível para que os desenvolvimentos de novos meios sejam criados, a fim de potencializar a eficácia e diminuir o desenvolvimento da resistência aos antibióticos, que é hoje, considerado um dos maiores problemas na saúde pública (NOGUEIRA et al. 2016).

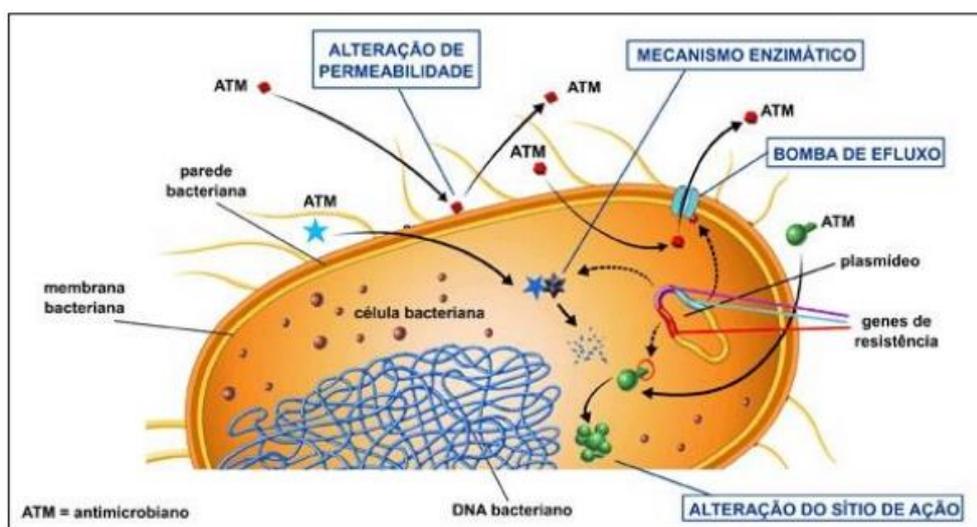
A capacidade que alguns microrganismos têm de impedir que os antimicrobianos ajam contra eles, é conhecida como resistência antimicrobiana. Esse poder faz com que, o tratamento com os antimicrobianos se torne ineficaz e, conseqüentemente as BRAs se tornem capazes de disseminar-se pela população humana (World Health Organization - WHO, 2020).

Para o desenvolvimento da resistência, pode haver determinantes cromossômicos, como mutações e ampliações gênicas, e os extra-cromossômicos, como plasmídeos e elementos genéticos da bactéria, como transpósons, cassetes gênicos e íntegrans. Para que a disseminação da resistência ocorra é necessário que os genes de resistência se disseminem, e este processo pode ocorrer através de vários mecanismos como a transformação, conjugação e transdução (RANG et al., 2016).

Existem até o momento quatro mecanismos bioquímicos que permitem o desenvolvimento da resistência antimicrobiana. Estes são: i) alteração da permeabilidade da

membrana, que impede ou dificulta a penetração do antibiótico na célula; (ii) alteração do sítio alvo do antibiótico; (iii) superexpressão de bombas de efluxo; (iv) produção de enzimas que degradam ou inativam o antibiótico (COSTA; SILVA JÚNIOR; 2017; CROSFTS; GASPARRINI; DANTAS, 2017). Estes mecanismos podem acontecer juntos ou isoladamente e estão representados na Figura 4.

Figura 4 - Representação dos diversos tipos de mecanismos de resistência a antimicrobianos por bactérias



Fonte: ANVISA (2020)

4.4.1 Alteração da Permeabilidade

Os fármacos podem penetrar nas membranas e paredes celulares através das porinas, que são canais hidrofílicos existentes principalmente nas membranas de compostos hidrofílicos (DIZIDC; SUSKOVIC; KOS, 2008; DELCOUR, 2008).

Neste tipo de resistência, quaisquer modificações, como diminuições da expressão de porinas, expressão de uma variante de porina mais seletiva ou estruturalmente, provocam uma redução da permeabilidade da membrana e parede celular, impedindo que drogas antibacterianas tenham acesso a sítios alvos no interior da célula (CROSFTS; GASPARRINI; DANTAS, 2017). Antibióticos dos grupos β -lactâmicos, fluoroquinolonas e tetraciclina penetram em bactérias gram-negativas por meio das porinas, logo, qualquer modificação nessa estrutura provocará uma diminuição nas concentrações do fármaco no interior da bactéria (PAULA, 2016).

4.4.2 Alteração do Local/ Sítio Alvo de Ação

A resistência baseada na alteração do local de ação caracteriza-se pela diminuição ou ausência da afinidade do antibiótico ao local de ação, seja por alteração da estrutura do peptidoglicano, interferência na síntese de proteínas ou de DNA (BAPTISTA, 2013; FLUIT; VISSER; SCHIMITZ, 2001). A aquisição de um gene codificador, capaz de modificar o alvo original é o principal mecanismo envolvido neste tipo de resistência (CUNHA, 2014).

Antibióticos como β -lactâmicos e glicopeptídeos agem de acordo com este mecanismo (DZIDIC; SUSKOVIC; KOS, 2008). Os β -lactâmicos agem inibindo enzimas do tipo PBPs, impedindo a estruturação da parede bacteriana, levando a morte das bactérias (PALZKILL, 2013). Logo, quaisquer modificações nestas PBPs, como a substituição de aminoácidos, que promove a diminuição da afinidade entre antibacteriano e as PBPs e aquisição de novas PBPs, levam a resistência aos antibióticos β -lactâmicos (BARROCAS, 2016).

4.4.3 Bombas de Efluxo

As bombas de efluxo são proteínas de membrana, capazes de direcionar o antibiótico para o meio extracelular (COSTA; SILVA JUNIOR, 2017). Este mecanismo pode afetar todos os grupos de antibióticos, mas mostra-se uma maior eficácia nos antibióticos macrolídeos, como a eritromicina, tetraciclinas e fluoroquinolonas, pois estes inibem a síntese de proteínas e de ácidos nucleicos como o DNA (DIZIDIC; SUSKOVIC; KOS, 2008).

A bomba de efluxo de sódio e potássio, mantém o equilíbrio das células com a manutenção das concentrações de íons, através da captura de íons de sódio do plasma e posterior transporte para o meio extra celular, assim como a captura de íons de potássio do meio extracelular e transporte para o meio intracelular (ZUGNO, 2004).

As bombas de efluxo são encontradas em bactérias gram-positivas, gram-negativas e organismos eucariotos. Elas podem ser específicas a determinado substrato ou apenas a componentes semelhantes (AZEVEDO, 2014). Podem também ser divididas em famílias de acordo com a sequência de aminoácidos ou pela semelhança nos mecanismos, sendo predominantes em diferentes tipos de bactérias. De acordo com Azevedo (2014) existem diversos tipos de bombas de efluxo dentro de cada família bacteriana, tendo especificidades diferentes á determinados antimicrobianos (PAULA, 2016).

Alguns dos tipos de bombas de efluxo incluem cinco classes de transportadores, como *Major Facilitator Family* (MFS), *Multidrug And Toxic Efflux* (MATE), *Resistance-Nodulation-*

Division Family (RND), Small Multidrug Resistance (SMR), Adenosine Triphosphate Binding Cassette (ABC) (DZIDIC; SUSKOVIC; KOS, 2008).

4.4.4 Mecanismo Enzimático

O mecanismo enzimático se dá devido à inativação do fármaco a partir do momento que a bactéria produz enzimas que degradam ou inativam o antibiótico. Estas enzimas podem atuar através de hidrólise, transferência de um grupo ou processo redox (DZIDIC; SUSKOVIC; KOS, 2008).

A β -lactamase é o exemplo mais conhecido deste mecanismo agindo por hidrólise. Estas enzimas foram reportadas pela primeira vez na década de 1940 em extratos de *Bacillus coli* (atualmente nomeados de *Escherichia coli*) (ABRAHAM; CHAIN, 1940). Tais enzimas são capazes de hidrolisar o anel β -lactâmico presente em antibióticos como as penicilinas, através do rompimento das ligações ésteres e amidas. Devido à quebra do anel, a ligação entre este e as PBPs fica comprometida, ocasionando portando, a inibição da síntese da parede celular bacteriana. (BERTONCHELI; HÖRNER, 2008; BUSH; JACOBY, 2010).

Os antibióticos aminoglicosídeos, anfenicóis, fosfomicina, estreptograminas e macrolídeos são os grupos mais afetados pelo mecanismo enzimático através da transferência de grupos, por enzimas transferases, capazes de transferir grupos como o adenilil, fosforil ou acetil aos antibióticos (DZIDIC; SUSKOVIC; KOS, 2008; BAPTISTA, 2013). Por ser uma reação irreversível, o antibacteriano modificado, devido à mudança resultante em sua estrutura química, torna-se incapaz de ligar-se ao sítio alvo (KUMAR; VARELA, 2013).

Há ainda, a inativação do antibiótico por meio de processos de oxidação ou redução, induzido pelos microrganismos (BAPTISTA, 2013). A inativação da tetraciclina ocorre pela oxidação mediada pela enzima TetX. Neste processo, ocorre a monohidroxilação da tetraciclina na posição 1A, de forma a romper a ligação do magnésio, essencial a ação bacteriostática (FLUIT; VISSER; SCHMITZ, 2001).

O uso pela bactéria de um ou de vários dos quatro mecanismos simultaneamente, acarreta em uma terapia antimicrobiana ineficaz, visto que, podem atingir até mesmo os antibióticos mais potentes, independente da sua classe (CUNHA, 2014; COSTA; SILVA JUNIOR, 2017).

4.5 Aquisição de resistência a antimicrobianos

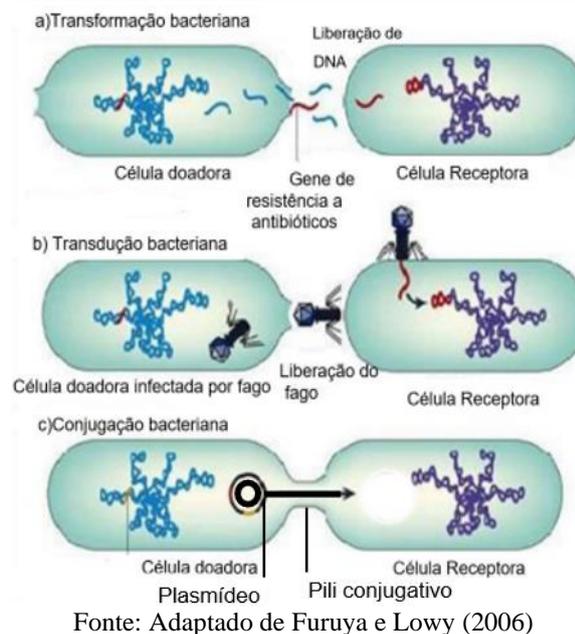
Concomitantemente ao uso excessivo de antimicrobianos, há também uma pressão seletiva sob as bactérias favorecendo um ambiente adequado para que estas apresentem mecanismos de resistência aos antibióticos (EL KHAL, 2016).

As bactérias podem expressar tais mecanismos de resistência, por meio de mutações em genes cromossômicos e extracromossômicos ou através da transferência horizontal de genes, chamada também de resistência adquirida. Também pode haver uma resistência fisiológica, na qual há a formação de biofilmes (COSTA; SILVA JUNIOR, 2017).

A primeira forma de resistência, também chamada de natural ou intrínseca está relacionada às características genéticas herdadas, transmitidas verticalmente e sem modificações (VERDI et al., 2016). A presença ou ausência do alvo para a ação da droga é o que determina este tipo de resistência, logo, a adequada identificação da bactéria permite uma escolha do antimicrobiano de forma mais eficaz, observando os mecanismos de ação dos mesmos, diminuindo, portanto, os riscos relacionados ao tratamento terapêutico (CUNHA, 2014).

Em contrapartida, a resistência adquirida se faz por meio de microrganismos que anteriormente eram sensíveis a determinado antibiótico, mas que, ao adquirir novas características torna-se resistente ao fármaco. Eventos como mutações de genes reguladores ou estruturais ou ainda pela aquisição de genes provocam a existência destas novas características, que antes, não eram presentes nas células procriadoras. Estes genes podem ser incorporados por veículos genéticos móveis ou por mecanismos de transferência horizontal, como a transformação, transdução, conjugação (Figura 5) (VERDI, 2016; OLIVEIRA et al., 2014; COAN, 2014) e ainda por transposição (DZIDIC; SUSKOVIC; KOS, 2008; BAPTISTA, 2013).

Figura 5 - Representação ilustrativa da transferência horizontal de genes



A transformação se dá quando ocorre a lise celular de determinado microrganismo e, conseqüentemente, seu material genético fica exposto no meio externo, sendo alvo de outras bactérias que podem incorporar, com o auxílio de enzimas de restrição e outras proteínas, o DNA livre no seu próprio genoma, no material cromossômico ou em plasmídeo (CUNHA, 2014). Quando este DNA livre é incorporado e contém o gene de resistência, a bactéria receptora do DNA se torna resistente a determinado antibiótico (LIMA; BENJAMIN; SANTOS, 2017).

A transdução envolve a presença de bacteriófagos, que através do transporte de pequenas porções de DNA da bactéria destruída anteriormente, protege a sua integridade das nucleases existentes no meio, atuando, portanto, como vetores de DNA (PAULA, 2016; MAYER, 2012). Quando o bacteriófago infectar uma nova bactéria, a porção do DNA transportada será incorporada no DNA da bactéria recém-infectada (DIZIDC; SUSKOVIC; KOS, 2008; BAPTISTA, 2013).

No processo de conjugação, há a participação de plasmídeos, que se constitui como uma porção de DNA extracromossômico que contém genes que permitem a sua replicação autônoma e transferência para outras células (PAULA, 2016; MAYER, 2012). O plasmídeo, portanto, faz a mediação da transferência do material genético de uma célula para outra, usando o pili conjugativo, podendo ocorrer entre células da mesma espécie ou de espécies diferentes (PAULA, 2016).

O processo de transferência genética que resulta da interação entre bactérias diferentes e que atuam por muitas vezes por meio do mecanismo de conjugação, é chamado de transposição. Neste, os fragmentos de DNA são nomeados como *transposons* (Tn) e estes se incorporam em um genoma, plasmídeo ou cromossomo, por meio de recombinação. Neste processo tem-se que a mobilidade apresentada é devido à ausência de homologia entre os DNA's recombinantes (MAYER, 2012; NEIHARDT, 2004; BAPTISTA, 2013)

Por fim, na resistência fisiológica há a formação de biofilmes, que são colônias de microrganismos que estão irreversivelmente ligados a um substrato ou interligados entre si, associados a uma matriz extracelular polissacarídica (SCHIESARI JUNIOR et al., 2015). Estes biofilmes envolvem inicialmente uma adesão primária de células microbianas a uma superfície com uma película condicionadora. Logo depois, há a formação das microcolônias e por fim, a síntese da matriz extracelular (COSTA; SILVA JUNIOR, 2017).

Geralmente nos cromossomos, podem ser encontrados genes que codificam os mecanismos de resistência, porém, alguns estudos atuais apontaram a presença destes genes em plasmídeos, o que se torna uma preocupação, visto que podem disseminar-se rapidamente para outras bactérias relevantes (BLAIR et al., 2015). Na Tabela 1, são apresentados genes de resistência a antibióticos que são comumente analisados em estudos de propagação de GRAs no ambiente, além do antibiótico associado, seu mecanismo de resistência e exemplos de genes.

Outra forma de transferência de genes e elementos genéticos móveis se dá através dos *integrons*, que são elementos genéticos capazes de integrar ou mobilizar cassetes gênicos por mecanismos de recombinação sítio-específico. O *integron* está frequentemente presente em bactérias Gram-negativas, associados a diferentes elementos móveis, como sequências de inserção, *transposons* e plasmídeos. Embora diversas classes de *integrons* já tenham sido descritas, o íntegron de classe 1 se destaca por sua associação à resistência aos antimicrobianos (ANVISA, 2020a).

Tabela 1 - Principais genes de resistência a antibióticos

Tipo de gene	Antibiótico associado	Mecanismo de resistência	Exemplos de genes
<i>tet</i>	Tetraciclina	Mecanismo enzimático	<i>tetX</i>
		Proteção do alvo do antibiótico	<i>tetM, tetW</i>
		Bomba de efluxo	<i>tetA, tetB, tetC, tetD, tetK, tetL, tetV, tetY</i>
<i>erm</i>	Eritromicina	Alteração do alvo do antibiótico	<i>ermA, ermB, ermC</i>
<i>ere</i>		Mecanismo enzimático	<i>ereA, ereB</i>
<i>sul</i>	Sulfonamidas	Alteração do alvo do antibiótico	<i>sul1, sul2, sul3</i>
<i>bla</i> , <i>aad</i> <i>aac</i> <i>str</i> <i>aph</i>	Beta-lactâmicos	Mecanismo enzimático	<i>blaTEM, blaA, blaB, bla1</i>
<i>mex</i> <i>emr</i>		Mecanismo enzimático	<i>aadA, aac6I, aac2IC, aph6ID, aph33IB, mexY, mexE, mexH, emrE, emrD</i>
<i>lnu</i>	Lincosamida	Mecanismo enzimático	<i>lnuA, lnuB</i>
<i>mph</i>	Macrolídeos	Mecanismo enzimático	<i>mphA, mphB</i>
<i>msr</i> <i>mef</i> <i>ole</i>	Macrolídeos-Lincosamida-Estreptogamina B	Proteção do alvo do antibiótico	<i>msrA, msrB, msrC, msrE, mefA, oleB</i>
<i>van</i>	Vancomicina	Alteração do alvo do antibiótico	<i>vanA, vanB, vanC</i>
<i>dfr</i>	Trimetoprima	Alteração do alvo do antibiótico	<i>dfrA1, dfrA5</i>
<i>mec</i>	Meticilina	Alteração do alvo do antibiótico	<i>mecA, mecR1</i>
<i>qac</i>	Fluoroquinolonas	Bomba de efluxo	<i>qacA, qacB</i>
<i>qnr</i>	Quinolonas	Proteção do alvo do antibiótico	<i>qnrA, qnrB</i>
<i>mcr</i>	Colistina	Proteção do alvo do antibiótico	<i>mcr-1</i>

Fonte: Adaptado de Pereira et al. (2021)

4.6 Quantificação de GRAs em Efluentes/Estrume Suíno

Como já citado, a suinocultura é uma atividade que demanda um alto consumo de água, acarretando grandes volumes de efluentes que contêm matéria orgânica e nutrientes, e o uso de antibióticos para promover o crescimento dos suínos acarreta a excreção de tais compostos no ambiente e contribuem na propagação de genes de resistência a antibióticos. Foram encontrados inúmeros estudos na bibliografia internacional em relação a quantificação de genes de

resistência a antibióticos em amostras de efluente de suinocultura. Estes dados são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Quantificação de GRAs em amostras de efluente e estrume de suinocultura

Amostra ambiental	País	Gene de resistência detectado	Concentração	Referência
Efluente	Canadá	<i>tetO</i>	2,9 a 3,2 logs cópias mL ⁻¹	Frey et al. (2015)
Efluente	China	<i>tetG, tetM, tetX, ermB, ermF, ereA, mefA, intI1</i>	-0,9 a -0,5 logs cópias RNAr 16S ⁻¹	Sui et al. (2017)
Efluente	EUA	<i>tetM, tetQ, tetW</i>	0,4 a 0,6 logs cópias RNAr 16S ⁻¹	Couch et al. (2018)
Efluente	China	<i>mcr-1</i>	-5 a -2,3 logs cópias RNAr 16S ⁻¹	Xia et al. (2019)
Estrume	EUA	<i>tetA/C, tetG</i>	5 a 9 logs cópias g ⁻¹	Yu et al. (2005)
Estrume	EUA	<i>ermA, ermB, ermC, ermF, ermT, ermX</i>	1 a 5 logs cópias RNAr 16S ⁻¹	Chen et al. (2007)
Estrume	Alemanha	<i>tetM, tetO, tetB</i>	6,8 a 8,6 logs cópias g ⁻¹	Hölzel et al. (2010)
Estrume	EUA	<i>tetQ, tetX, ermB, ermF</i>	-4 a 1 logs cópias RNAr 16S ⁻¹	Joy et al. (2013)
Estrume	EUA	<i>ermB, ermC, ermF</i>	-1 a 0 logs cópias RNAr 16S ⁻¹	Luby, Moorman e Soupir (2016)
Estrume	China	<i>ermB, ermF, ermQ, ermT, ermX, sul1, sul2, tetC, tetX, int11, int12</i>	-1 a 0 logs cópias RNAr 16S ⁻¹	Zhang et al. (2018)
Estrume	China	<i>aac, aad, acr, amp, aph, bac, bla, cph, dfr, erm, erer, mef, mph, msr, qac, tet, tnp, van, int1</i>	-8 a -0,4 logs cópias RNAr 16S ⁻¹	Lu e Lu (2019)
Estrume	Bélgica	<i>tetB, tetL, tetM, tetO, tetQ, tetW, ermB, ermF, sul2</i>	-4,2 a -0,8 logs cópias RNAr 16S ⁻¹	Van den Meersche et al. (2019)
Estrume	Itália	<i>tetA, qnrS, mcr-1, ermB</i>	-1,7 a -1,3 logs cópias RNAr 16S ⁻¹	Petrin et al. (2019)
Estrume	China	<i>tetC, tetG, tetM, tetQ, tetX, sul1, sul2, aac, ermB, ermQ</i>	-4 a 0 logs cópias RNAr 16S ⁻¹	Qian et al. (2019)
Estrume	China	<i>tetW, tetO, tetM, sul1, sul2, ermF</i>	0 a 0,5 logs cópias RNAr 16S ⁻¹	Wang et al. (2019)
Estrume	China	<i>ermB, ermF, ermT, qnrS, acc(6')-Ib, tetM, tetO, tetQ, tetW</i>	6 a 11 logs cópias g ⁻¹	Wen et al. (2019)
Estrume	China	<i>mcr-1</i>	-4 a -1,7 logs cópias RNAr 16S ⁻¹	Xia et al. (2019)
Estrume	China	<i>sul1, sul2, ermB, ermF, ereA, mefA, blaCTX-M, blaTEM, tetM, tetG, tetX, mcr-1, int11</i>	-1 a -0,3 logs cópias RNAr 16S ⁻¹	Zhang et al. (2019)
Estrume	China	<i>tetG, tetM, tetX, ermB, ermF, sul1, sul2, blaCTX-M, blaTEM, mcr-1, int11, IncQ oriT, IncWrepA</i>	-8 a -1 logs cópias RNAr 16S ⁻¹	Zhang et al. (2019b)
Estrume	China	<i>dfrA7, gryA, ermX, ermQ, ermF, sul1, sul2, tetX, tetW, tetM, tetC</i>	-6 a -2 logs cópias RNAr 16S ⁻¹	Bao et al. (2020)
Estrume	China	<i>blaTEM, ermB, int11, qnrS, sul1, sul3, tetH, tetO, tetW</i>	8 a 10 logs cópias g ⁻¹	Chang et al. (2020)

Adaptado de Pereira et al. (2021)

É possível concluir observando os dados da Tabela 2, que uma vasta gama de genes de resistência a antibióticos é monitorada, sendo que os genes *tet* (tetraciclinas), *erm* (eritromicina), *sul* (sulfonamidas) e *intI*, responsável pela mobilidade de cassetes resistentes a

antibióticos em *integrans* e não-específico, foram os frequentemente detectados nos estudos (PEREIRA et al., 2021).

Em relação à abundância relativa de GRAs na qual é feita a normalização da quantidade de genes por amostra em função da quantidade de bactérias, determinada pela quantificação do gene RNAr 16S, presentes nessa mesma amostra, observaram-se valores na faixa de -8 a 5 logs de cópias de GRAs por cópias de RNAr 16S (CHEN et al., 2007; LU; LU, 2019; ZHANG et al., 2019b). Já à abundância absoluta, na qual a quantidade GRAs é apresentada em função da quantidade de amostra – mL ou g, foram fornecidos estudos com resultados na faixa de 5 a 11 logs de cópias de GRAs por g de estrume (YU et al., 2005; WEN et al., 2019), enquanto que no único estudo de Frey et al. (2015) o resultado da quantificação absoluta em amostras líquidas foi de 2,9 a 3,2 logs cópias mL⁻¹ do gene *tetO*.

Sui et al (2017) com o objetivo de verificar se o clima e a pluviosidade influenciam na composição do efluente de suinocultura em relação a quantidade de GRAs, elaborou uma análise, na qual monitorou o efluente bruto de duas fazendas em meses de inverno e verão. Sui et al. (2017) obtiveram resultados que indicaram que a maioria dos genes analisados é significativamente mais abundante no inverno do que no verão, assim como a abundância de bactérias. Os autores justificam essa diferença pelo fato de que no inverno o uso de antibióticos para a prevenção de doenças aumenta, devido ao clima frio. Já o aumento de bactérias totais pode ser justificado pela menor diluição dos efluentes devido a diminuição da frequência de lavagem das baias.

Hölzel et al. (2010) ressaltam que no intestino dos animais ocorre a primeira seleção de bactérias, porém, assim que entram em contato com o antibiótico presente no estrume, o ambiente pode se transformar em um ambiente propício para a manutenção e aumento da resistência. Sui et al. (2017) também resalta que fatores como alimentação, quantidade de antibióticos utilizada e os níveis de transferência de resistência já existentes podem causar uma abundância de GRAs. Chang et al. (2020) destacam que a variação da abundância de GRAs depende fortemente da sucessão da comunidade microbiana, assim como, fatores ambientais.

Xia et al. (2019) observando a correlação da concentração do antibiótico colistina com a abundância do gene *mcr-I*, puderam perceber que a presença dessa substância exerce influência no aumento do gene em questão, mas que, em altas concentrações de colistina, o antibiótico pode exibir funções bactericidas, ao invés de manter ou induzir a resistência nas bactérias. O mesmo pode ocorrer quando a colistina se apresenta em concentrações são muito baixas, podendo exercer pressão seletiva não significativa (XIA et al., 2019).

A relação entre a diversidade de elementos genéticos móveis, especialmente *intI1* e *intI2*, e a diversidade de GRAs já foi analisada em diversos estudos, sendo constatada a correlação extremamente significativa entre a abundância relativa desses elementos e a abundância relativa de GRAs, mostrando que estes, desempenham importantes papéis na transferência horizontal de genes de resistência (LU; LU, 2019; WANG et al., 2019).

O estrume bruto está presente na maioria dos estudos de monitoramento de GRAs em amostras de efluentes suínos, e ainda são encontrados poucos trabalhos de quantificação em amostras líquidas (efluente). Observa-se que grande parte dos estudos existentes foram desenvolvidos na China, destacando, portando, a necessidade de estudos como estes em outros países, como Brasil, que lideram o *ranking* mundial de produção de carne.

Em um levantamento bibliográfico realizado por Pereira et al. (2021), observou-se que os tratamentos de efluentes suínos apresentam desempenho variável como relação à remoção de GRAs. Os autores observaram que os genes *sul* e *intI* foram mais persistentes, principalmente na tecnologia de compostagem. Em contraste, os genes *tet* e *bla* foram os GRAs mais reduzidos pelas técnicas relatadas, chegando até uma redução de 4 logs (PEREIRA et al., 2021).

Dessa forma, a disposição do efluente, mesmo que tratado, em solos agrícolas pode ser uma porta de entrada para a introdução dos genes de resistência aos antibióticos no meio ambiente.

4.7 Quantificação de GRAs em solos que receberam efluente/estrupe suíno

O emprego do esterco animal ou efluente no solo é uma prática comum campos agrícolas, funcionando como fertilizante orgânico para aumentar a produção das culturas, trazendo efetivas vantagens, uma vez que esta adubação orgânica melhora as características do solo favorecendo o crescimento das plantas (CANESIN; CORREA, 2006). Além disso, a adubação orgânica é capaz de fornecer nutrientes essenciais como nitrogênio e fósforo, dispensando a prática de adubação mineral (MELO, et al., 2009).

No entanto, os componentes desses resíduos podem ser carregados para as águas superficiais e subterrâneas, devido ao escoamento e infiltração (CAMPAGNOLO et al., 2002; DONG; REDDY, 2010). Assim, a aplicação de efluente suíno, mesmo que tratado pode carrear grande número de genes de resistência a antibióticos, que podem indicar um possível perigo à saúde dos seres humanos e do meio ambiente.

Na literatura, diversos autores investigaram a presença de GRAs no solo com e sem a adição de estrume suíno, como mostra a Tabela 3. Os genes de resistência a antibióticos *tet*, *sul*, *bla* e *erm*, além do elemento móvel *intI*, foram os mais estudados. Com relação à aplicação de efluente líquido, há uma escassez de dados.

De acordo com o levantamento, os genes que codificam os mecanismos de resistência a tetraciclina (*tetA*, *tetM*, *tetO*, *tetG*, *tetW* dentre outros), tiveram suas abundâncias relativas incrementadas, no geral, em cerca de 1 log após a aplicação de estrume suíno no solo (PENG et al., 2017; GUO et al., 2018; DUAN et al., 2019; WU et al., 2019; VAN DEN MEERSCHE et al., 2020).

As abundâncias relativas dos genes que conferem resistência às sulfonamidas (*sul1*, *sul2*) também parecem seguir tendência semelhante dos genes *tet* (PENG et al., 2017; GUO et al., 2018; DUAN et al., 2019; WU et al., 2019; MILLER et al., 2020; VAN DEN MEERSCHE et al., 2020). Porém, Han et al. (2021) observaram uma redução da abundância dos genes *sul1* e *sul2* após aplicação do efluente no solo.

Os genes *erm* e *bla*, associados à resistência a macrolídeos (eritromicina) e beta-lactâmicos, respectivamente, também foram enriquecidos em geral, após adição de efluente ao solo, quando comparados ao solo controle (PENG et al., 2017; DUAN et al., 2019; WU et al., 2019; MILLER et al., 2020; VAN DEN MEERSCHE et al., 2020). O gene *intI1*, apesar de não conferir resistência, está associado à possibilidade de mobilidade genética, funcionando como uma espécie de indicador da dinâmica de GRAs. Neste levantamento, também foi observado o incremento desse gene na maioria dos estudos (DUAN et al., 2019; WU et al., 2019; MILLER et al., 2020), o que indica que a prática de aplicação de efluente suíno no solo pode ocasionar na disseminação de GRAs para outros compartimentos ambientais.

Tabela 3 – Estudos de monitoramento de GRAs em amostras de solo fertirrigado com dejetos suínos

Tipo de amostra	Genes monitorados	Abundância relativa		Referência
		log nº cópias gene (nº cópias RNAr 16S) ⁻¹		
		(1)	(2)	
Solo sem aplicação de esterco (1)	<i>tetA</i>	1: -3	2: -3	
Solo com aplicação de esterco (2)	<i>tetG</i>	1: -3	2: -2	Guo et al. (2018)
	<i>tetM</i>	1: -4	2: -4	
	<i>tetO</i>	1: -4	2: -3	
	<i>tetW</i>	1: -5	2: -4	
	<i>sul1</i>	1: -3	2: -3	
	<i>sul2</i>	1: -3	2: -2	
Solo sem aplicação de esterco (1)	<i>tetB</i>	1: -8	2: -5	
Solo com aplicação de esterco (2)	<i>tetM</i>	1: -5	2: -4	Van den Meersche et al. (2020)
	<i>tetO</i>	1: -4	2: -4	
	<i>tetQ</i>	1: -6	2: -5	
	<i>tetW</i>	1: -5	2: -4	
	<i>ermB</i>	1: -5	2: -4	
	<i>ermF</i>	1: -6	2: -4	
	<i>sul2</i>	1: -5	2: -3	
Solo sem aplicação de esterco (1)	<i>sul 1</i>	1: -1	2: -3	
Solo com aplicação de esterco (2)	<i>sul 2</i>	1: -1	2: -2	Han et al. (2021)
Solo sem aplicação de esterco (1)	<i>blaTEM</i>	1: -4	2: 0	
Solo com aplicação de esterco (2)	<i>sul2</i>	1: -4	2: -2	Peng et al. (2017)
	<i>sul1</i>	1: -4	2: -1	
	<i>tetG</i>	1: -4	2: -2	
	<i>tetZ</i>	1: -3	2: -2	
Solo sem aplicação de esterco (1)	<i>IntI1</i>	1: Não detectado	2: -1	
Solo com aplicação de esterco (2)	<i>ermB</i>	1: Não detectado	2: 0	Duan et al. (2019)
	<i>sul2</i>	1: Não detectado	2: -1	
	<i>sul1</i>	1: Não detectado	2: 1	
	<i>tetX</i>	1: Não detectado	2: -1	
	<i>tetG</i>	1: Não detectado	2: 0	
Solo sem aplicação de esterco (1)	<i>intI1</i>	1: -3	2: -4	
Solo com aplicação de esterco (2)	<i>sul1</i>	1: -2	2: -6	Miller et al. (2020)
	<i>ermB</i>	1: -2	2: -3	
Solo sem aplicação de esterco (1)	<i>blaTEM</i>	1: Não detectado	2: -2	
Solo com aplicação de esterco (2)	<i>tetX</i>	1: -3	2: -3	Wu et al. (2019)
	<i>tetW</i>	1: -3	2: -3	
	<i>tetA</i>	1: -3	2: -3	
	<i>sul2</i>	1: Não detectado	2: -3	
	<i>intI1</i>	1: -3	2: -2	

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Amostras de efluente

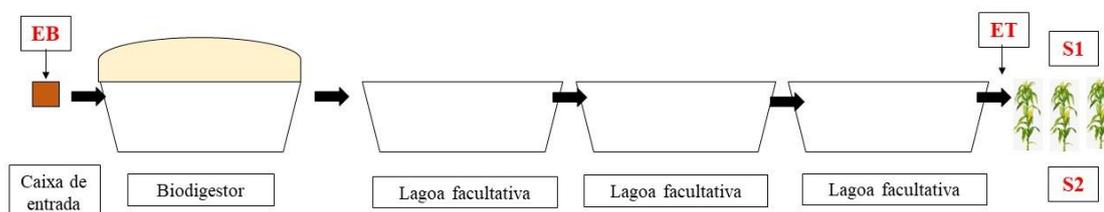
A coleta das amostras de efluentes de suinocultura foi feita em uma granja de ciclo completo, na qual possui todas as fases de criação (gestação, maternidade, creche, recria e terminação), totalizando aproximadamente 450 matrizes e que possui cerca de 20 funcionários. Tal granja localiza-se no estado de Minas Gerais.

Na gestão dos resíduos animais e efluentes gerados na granja, é feita inicialmente a raspagem das fezes dos animais e estas são depositadas em uma esterqueira. A junção da água de lavagem dos galpões, resquícios das fezes dos animais, urina, restos de ração, compõem o efluente, que é drenado, juntamente com o efluente sanitário gerado no escritório, banheiros e refeitório, e direcionado ao sistema de tratamento.

O sistema de tratamento adotado nesta granja é composto por um biodigestor seguido de três lagoas em série (facultativa – facultativa – facultativa) como apresentado na Figura 6. O efluente tratado é usado como biofertilizante em plantações de milho de 45 hectares, localizada na própria fazenda. Este é aplicado várias vezes ao dia, sem periodicidade definida. O tempo total de retenção hidráulica do efluente no sistema é de cerca de 120 dias, tratando-se de uma vazão de efluente de aproximadamente 50.000 L dia⁻¹.

A granja possui cerca de 20 funcionários, que geram o efluente sanitário que compõem o efluente bruto da granja, tendo em vista a vazão de efluente da granja, sugere-se que o efluente sanitário gere um impacto pequeno tendo em vista o grande volume de efluente animal gerado.

Figura 6 - Sistema de tratamento em estudo



Inicialmente, para o monitoramento da eficiência do tratamento do efluente suíno, foram feitas seis campanhas amostrais nos meses de março, maio, agosto, setembro, novembro de 2019 e janeiro de 2020. Em cada campanha de amostragem, foram coletadas duas amostras referentes à fase líquida, sendo a primeira na entrada do biodigestor e a segunda na saída da

última lagoa, correspondendo ao efluente suíno *in natura* (EB) e tratado (ET), respectivamente. As coletas foram feitas durante o período de um ano iniciando sempre às 9h da manhã com o auxílio de um amostrador automático VST Portable Vacuum Samplers (Manning Environmental) nas quais a cada 10 minutos eram coletados 300 mL de efluente, até totalizar 1 L de amostra. Em seguida, a amostra de efluente era armazenada em frascos âmbar, previamente lavados com ácido nítrico e mantidos em gelo, até que os procedimentos de preparo e análise em laboratório fossem executados.

Adicionalmente, para futuras comparações com as abundâncias dos genes no solo, foram coletadas mais três amostras de ET, referentes aos meses de agosto de 2020, março e abril de 2021.

5.2 Amostras de solo

Para avaliar a influência da aplicação do efluente tratado no solo, foram realizadas quatro coletas (janeiro e agosto de 2020, março e abril de 2021). Em cada campanha, eram coletadas aproximadamente 250 g de solo que recebeu aplicação direta do efluente de suinocultura tratado, e este será chamado de solo 1 (S1), ao longo de 10 cm de profundidade, em cinco pontos aleatórios nas áreas de estudo. Este solo coletado recebia diretamente o efluente tratado logo após a passagem pela última lagoa facultativa que compunha o sistema de tratamento adotado na granja.

Além disso, para realizar a comparação, cinco réplicas do solo que não recebeu aplicação direta do efluente foram coletadas, chamadas de solo 2 (S2), foram recolhidas. No entanto, é importante ressaltar que existe a possibilidade de carreamento do efluente por escoamento superficial para S2, devido à declividade da plantação.

A área do solo não fertirrigado localiza-se próxima a entrada do empreendimento, fração inferior do terreno, em contraste com a área que recebe o efluente tratado que se localiza na porção superior do terreno, conforme Figura 7. Há na propriedade um açude abaixo da área não fertirrigada diretamente, distante cerca de 290 metros da área de fertirrigação. Na área inferior ao açude há um córrego afluente do Córrego do Falhado, que deságua no rio Piranga (CAETANO, 2022).

Figura 7- Área de estudo da suinocultura estudada



Fonte: CAETANO (2022)

5.3 Quantificação dos Elementos Genéticos

5.3.1 Preparo das Amostras

As amostras de efluente (EB e ET) foram inicialmente lavadas, adicionando-se 50 mL de cada amostra em tubos de polipropileno graduado de fundo cônico com capacidade de 50mL, seguida pela centrifugação a 4500 rpm durante 10 min. Posteriormente, o sobrenadante formado foi descartado e logo depois adicionou-se 10 mL de solução Tampão de Fosfato Salino – PBS (140 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, 3 mM KCl, pH 7,2). Tais amostras foram levadas novamente a centrífuga por 10 min e velocidade de 4500 rpm, descartando-se o sobrenadante ao final do processo. O sedimento foi retirado e preservado a -20°C para os posteriores procedimentos. Já as amostras de solo (S1 e S2) foram armazenadas diretamente -20°C para os posteriores procedimentos.

5.3.2 Extração de DNA

Tanto o sedimento obtido das amostras de efluente quanto as amostras de solo foram submetidas para a extração de DNA com o kit DNeasy PowerSoil (QIAGEN®), seguindo o protocolo recomendado. Ao final da extração, a quantificação do DNA obtido ao final do

processo foi feita utilizando um espectrofotômetro do tipo NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific) na faixa de comprimento de onda de A260/A280 nm.

5.3.3 PCR convencional

Na Tabela 4, são mostradas as características de cada par de primer utilizado no presente estudo. Foram escolhidos cinco pares de primers referentes aos genes de resistência relacionados às classes de antibióticos mais consumidos no mundo: *blaTEM* (beta-lactâmicos), *ermB* (eritromicina), *qnrB* (quinolonas), *sulI* (sulfonamidas) e *tetA* (tetraciclina). Primers referentes ao elemento genético móvel *intI1* (gene integrase de classe I) e os primers referentes ao DNA ribossomal 16S (RNAr 16S) também foram utilizados, sendo este último com o objetivo de estimar a quantidade de bactérias totais.

Tabela 4 - Primers utilizados no presente estudo

Gene	Primer	Sequência	Temp. (°C) anelamento	Amplicon (pb)	Referência
<i>tetA</i>	<i>tetA</i> fw	GCTACATCCTGCTTGCCTTC	54,6	210	Mao et al. (2015)
	<i>tetA</i> rv	CATAGATCGCCGTGAAGAGG			
<i>sulI</i>	<i>sulI</i> fw	CGCACCGGAAACATCGCTGCAC	55,8	163	Mao et al. (2015)
	<i>sulI</i> rv	TGAAGTTCCGCCGCAAGGCTCG			
<i>ermB</i>	<i>ermB</i> fw	CGTGCGTCTGACATCTATCTGA	56,8	190	Mao et al. (2015)
	<i>ermB</i> rv	CTGTGGTATGGCGGGTAAGTT			
<i>qnrB</i>	<i>qnrB</i> fw	GCGACGTTCAAGTGGTTTTCAG	54,7	148	Mao et al. (2015)
	<i>qnrB</i> rv	TGTCCAACCTAACGCCTTGTA			
<i>blaTEM</i>	<i>blaTEM</i> fw	GCACGAGTGGGTTACATCGA	48	311	Tao et al. (2014)
	<i>blaTEM</i> rv	GGTCTCCGATCGTTGTCAG			
<i>intI1</i>	<i>intI1</i> fw	CCTCCCGCACGATGATC	60	280	Goldstein et al. (2001)
	<i>intI1</i> rv	TCCACGCATCGTCAGGC			
RNAr 16S	1055 fw	ATGGCTGTCGTCAGCT	53	337	Ferris; Muyzer; Ward et al. (1996)
	1392 rv	ACGGGCGGTGTGTAC			

Utilizando um termociclador Biocycler o DNA anteriormente extraído das amostras foi submetido à reação em cadeia de polimerase (sigla PCR do inglês *Polymerase Chain Reaction*) convencional, como fase inicial para o teste de amplificação das amostras com os primers de interesse. Para isso, foram adicionados 2 µL de DNA de cada amostra, 2 µL de PCR Buffer (Mg²⁺ Plus), 0,3 µL de dNTP (10 mM), 0,3 µL de cada par de primer (10 µM), 0,2 µL de Taq DNA Polimerase (5 U µL⁻¹) e 4,9 µL de água, totalizando 10 µL para cada reação. As condições de amplificação utilizadas no termociclador são apresentadas a seguir, na Tabela 5.

Tabela 5 - Condições utilizadas no termociclador para PCR convencional

		Temperatura (°C)	Tempo	
Desnaturação inicial	Degrau 1	94	5 min	
	Degrau 2	94	3 min	
Desnaturação	Degrau 1	94	45 s	
Anelamento	Degrau 2	x*	1 min	30 ciclos
Entensão	Degrau 3	72	2 min	
Extensão final	Degrau 1	72	10 min	
Resfriamento	Degrau 2	4	∞	

* x= temperatura de anelamento específica para cada *primer* (Tabela 4)

Para verificar a amplificação das amostras os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2%, contendo SyBR Safe DNA Gel Stain em TAE 1x, tempo de corrida de 1h15min a 70V, utilizando ainda, marcador de peso molecular KASB de 100 pares de bases. A visualização destes foi feita sob luz ultravioleta, registrando-se a imagem em um sistema fotodocumentador.

5.3.4 PCR em Tempo Real

Posteriormente à confirmação da amplificação via PCR convencional, foram feitas análises via reação em cadeia de polimerase quantitativa em tempo real (sigla qPCR do inglês Polymerase Chain Reaction Quantitative Real Time) no equipamento 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems), utilizando a quantificação do tipo absoluta, para todos os genes anteriormente citados.

Para o método em questão foram utilizados em cada reação 3,8 µL de água ultrapura, 5,0 µL de PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix, 0,1 µL de cada par de primer (30 µM) apresentado na Tabela 3 e 1,0 µL de amostra de DNA, totalizando um volume final de 10 µL por reação, com o objetivo de analisar os genes de resistência e o elemento móvel. As condições utilizadas no equipamento para amplificação das amostras são detalhadas na Tabela 6.

Tabela 6- Condições utilizadas no equipamento de PCR em tempo real

		Temperatura (°C)	Tempo
Estágio <i>holding</i>	Degrau 1	37	15 min
	Degrau 2	95	10 min
Estágio de ciclos (40 ciclos)	Degrau 1	95	10 s
	Degrau 2	x*	30 s
	Degrau 3	72	30 s
Estágio curva de <i>Melt</i>	Degrau 1	95	15 s
	Degrau 2	60	15 s
	Degrau 3	95	15 s
	Degrau 4	60	15 s

* x= temperatura de anelamento específica para cada *primer* (Tabela 4)

Alguns ajustes foram necessários no processo da quantificação do RNAr 16S para obtenção de uma curva-padrão representativa. Neste caso, para as reações foram utilizados 3,84 µL de água ultrapura, 5,0 µL de PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix, 0,08 µL de cada primer (30 µM) e 1,0 µL de amostra de DNA, totalizando também um volume final de 10 µL por reação. Para as variações de temperatura do equipamento de qPCR, utilizou-se no estágio de ciclos 95°C por 15 s, 50°C por 1 min e 72°C por 1 min (30 ciclos), sendo mantidas as demais temperaturas e tempos dos outros estágios apresentados na Tabela 6.

Para a elaboração das curvas-padrão foram utilizados os controles positivos, obtidos por meio de clonagem do produto da PCR em vetor plasmidial (kit pGem Easy Vector, Promega) e inseridos em bactérias *E. coli* JM109, gentilmente cedidos pelo Laboratório de Microbiologia do DESA/UFMG. As colônias brancas (que continham o plasmídeo recombinante) foram repicadas em placas de Petri contendo meio Luria Bertani (LB) com ampicilina (100 µg mL⁻¹) e levadas à estufa por 16h a 37°C. Em seguida, uma colônia crescida na placa foi transferida para um tubo de 50 mL, contendo 5 mL de caldo LB e ampicilina (100 µg mL⁻¹), sendo levado ao shaker (Thoth) por 5h e agitação de 180 rpm. Por fim, completou-se o volume do falcon para 50 mL com caldo LB e ampicilina (100 µg mL⁻¹), mantendo-o por mais 16h a 180 rpm no shaker para o crescimento da bactéria. Ao final do processo, parte do caldo LB contendo bactéria foi coletado e preservado em glicerol (500 g L⁻¹), sendo armazenado a -80 °C.

A parte restante foi utilizada para extração dos plasmídeos com o auxílio do kit Midiprep (Promega) conforme as instruções do fabricante. Ao final, o DNA plasmidial de cada amostra (plasmídeo + inserto) foi quantificado no NanoDrop nas quais foram congeladas a -20°C para posterior elaboração das curvas-padrão nos ensaios de PCR em tempo real.

Para o cálculo do número de cópias de DNA em cada μL dos controles positivos, utilizou-se a Equação 1, considerando que a massa de 1 mol de pares de bases (pb) possui 649 g e que o número de moléculas em 1 mol é igual a $6,02 \times 10^{23}$ (WHELAN; RUSSELL; WHELAN, 2003).

$$\text{n}^\circ \text{ de cópias de DNA } \mu\text{L}^{-1} = \frac{6,02 \times 10^{23} (\text{cópias mol}^{-1}) \times \text{quantidade de DNA (g } \mu\text{L}^{-1})}{\text{tamanho do DNA (pb)} \times 649 (\text{g mol}^{-1} \text{ pb}^{-1})} \quad \text{Equação 1}$$

Partindo deste raciocínio foram construídas curvas-padrão contendo 6 pontos, para cada gene de interesse, utilizando a diluição seriada de 1:10 dos controles positivos. A equação da reta ($y = ax + b$) de cada curva-padrão foi obtida plotando-se no eixo x o log da concentração de cada um dos pontos da curva, sendo este valor obtido a partir da concentração inicial dos controles positivos, e no eixo y o Ciclo de Threshold (Ct) correspondente a cada um desses pontos. O Ct representa resumidamente o ciclo na qual se atinge o limiar da fase exponencial de replicação de DNA, que é obtida pela intensidade de fluorescência emitida, podendo ser feita a quantificação exata da quantidade de produto gerado.

Para as análises serem consideradas aceitáveis alguns critérios referentes à curva-padrão obrigatoriamente foram atendidos. Esta deve apresentar $R^2 > 0,99$, inclinação da reta entre -3,1 e -3,6 e eficiência entre 90 e 110%. Todas as análises foram feitas em triplicata, tanto para a curva quanto para as amostras, incluindo um “branco”, no qual não se adicionou amostra.

Através da substituição do Ct nas equações da reta de cada curva-padrão a estimativa da quantidade de cópias do gene por μL de reação de cada amostra é obtida. Porém, posteriormente se faz necessário uma série de correções desse valor, levando-se em conta o volume de extrato de DNA utilizado por reação, a quantidade de DNA estimada e real pós-extração, as massas de sedimento de efluente e solo utilizadas para extração, o volume final de extrato gerado e o teor de sólidos da amostra líquida. Ao final, tem-se a obtenção da abundância absoluta de cada amostra, representada pela quantidade de cópias de gene por mL de efluente ou g de solo.

Foi realizada também a normalização das abundâncias absolutas, de modo a se obter as abundâncias relativas de cada amostra. Esta foi obtida por meio da divisão entre a abundância absoluta do gene (n° cópias gene mL^{-1} ou g^{-1} de amostra) e a abundância absoluta de bactérias totais da amostra em questão (n° cópias RNAr 16S mL^{-1} ou g^{-1} de amostra), originando na abundância relativa do gene (n° cópias gene $[\text{n}^\circ$ cópias RNAr 16S] $^{-1}$).

5.4 Análise Estatística

Na quantificação dos elementos genéticos, foram aplicados testes estatísticos para comparar os conjuntos de dados. Nesse caso, a comparação entre as abundâncias dos genes nas amostras EB, ET, S1 e S2 necessita ser realizada em termos relativos, ou seja, haverá comparação estatística apenas das abundâncias relativas dessas amostras, já que se tratam de amostras de tipologia diferente (efluente versus solo).

Inicialmente, foi testada a normalidade dos dados, utilizando o teste de Shapiro-Wilk. Em situações que os dados apresentaram distribuição normal, aplicou-se o teste de Tuckey, para verificar se as coletas eram estatisticamente diferentes. No caso de dados não-paramétricos, estes foram submetidos ao teste de ANOVA Kruskal-Wallis. As amostras foram consideradas estatisticamente diferentes quando apresentaram $p\text{-valor} \leq 0,05$, com um intervalo de confiança de 95%.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Abundância absoluta dos genes no efluente

A seguir, na Tabela 7, são apresentados todos os dados de quantificação volumétrica dos genes monitorados nos pontos EB e ET, durante seis campanhas amostrais (março, maio, agosto, setembro, novembro de 2019 e janeiro de 2020). Além disso, são mostradas também as abundâncias absolutas desses genes em ET nas três campanhas adicionais (agosto de 2020 e março e abril de 2021), realizadas juntamente com o monitoramento do solo.

Tabela 7 - Monitoramento de genes em amostras de efluente bruto (EB) e tratado (ET)

		Abundância absoluta (n° cópias gene mL ⁻¹)						
		RNAr 16S*	<i>intI1</i> *	<i>blaTEM</i> *	<i>ermB</i> *	<i>qnrB</i> *	<i>sul1</i> *	<i>tetA</i> *
Março/2019	EB	5,37E+06	1,54E+05	6,99E+05	1,44E+06	3,35E+04	5,12E+05	1,46E+04
	ET	1,44E+06	8,38E+03	5,18E+04	2,00E+05	4,87E+02	3,39E+04	1,30E+04
Maio/2019	EB	1,73E+07	9,52E+03	8,17E+05	1,17E+06	2,77E+04	3,07E+05	9,18E+04
	ET	3,39E+06	5,36E+03	1,69E+03	2,42E+05	1,04E+02	1,48E+05	1,77E+04
Agosto/2019	EB	1,22E+07	4,19E+06	1,24E+06	1,00E+07	6,58E+04	1,30E+06	3,81E+05
	ET	1,50E+05	2,50E+05	6,16E+03	2,46E+05	1,53E+01	1,38E+05	2,03E+04
Setembro/2019	EB	1,68E+08	5,54E+07	8,74E+06	9,87E+07	7,55E+04	1,44E+07	3,94E+07
	ET	6,84E+04	1,89E+04	2,51E+04	3,26E+05	1,29E+02	3,87E+04	8,19E+03
Novembro/2019	EB	5,37E+08	1,65E+07	1,60E+07	2,61E+08	8,59E+04	8,36E+06	1,09E+07
	ET	4,35E+06	4,00E+02	1,89E+03	5,26E+04	3,16E+00	2,43E+03	5,78E+02
Janeiro/2020	EB	1,95E+08	4,91E+07	5,12E+07	1,08E+08	5,85E+05	2,36E+07	2,97E+07
	ET	6,75E+05	2,26E+05	5,21E+04	4,69E+05	1,73E+03	6,08E+05	1,07E+05
Agosto/2020	ET	9,05E+05	1,25E+03	7,40E+04	6,70E+05	1,65E+02	1,39E+04	5,14E+03
Março/2021	ET	1,41E+06	2,70E+03	1,22E+05	8,38E+05	1,12E+05	1,62E+07	2,96E+04
Abril/2021	ET	1,53E+05	6,96E+04	1,29E+05	7,30E+05	3,98E+05	1,02E+08	4,91E+04

* Houve redução estatisticamente significativa entre as amostras, considerando todo o conjunto de dados

O gene de resistência *ermB* se apresentou como gene mais abundante no EF. Por se tratar de um gene referente ao antibiótico do grupo dos macrolídeos, mais especificadamente, eritromicina, que é um antibiótico natural, este gene já foi distribuído em diversos compartimentos ambientais, além disso, pela atuação da transferência horizontal de genes ele acaba também sendo encontrado em concentrações mais elevadas quando comparado a genes de resistência como o *qnrB* que confere resistência as fluoroquinolonas, que é um antibiótico sintético.

Foi possível observar que o gene mais abundante foi o RNAr 16S, como já esperado, visto que o mesmo representa o nível de bactérias presentes nas amostras, com abundâncias de até 8 logs, como já visto em outros estudos da literatura (TAO et al., 2014; SUI et al. 2017). Apesar do número de cópias desse gene por cada célula bacteriana ser variável, este é o representante da comunidade mais estudado na literatura. Observando as abundâncias nos pontos EB e ET, indica-se que o sistema de tratamento consegue reter certa quantidade de bactérias, já que ocorre uma nítida e significativa diminuição da abundância absoluta, em média de 1,7 logs. E

Seguindo esta mesma tendência, os genes de resistência *blaTEM* (2,4 logs), *ermB* (2,1 logs), *qnrB* (2,8 logs), *tetA* (2,1 logs) e *sulI* (1,7 logs), além do gene indicador de mobilidade genética *intI1* (2,8 logs), tiveram suas abundâncias reduzidas de forma significativa ao longo do tratamento, como já relatado na literatura (TAO et al., 2014; SUI et al. 2017). Porém, é importante destacar que o efluente tratado ainda contém certa quantidade de genes, gerando uma preocupação com relação à disposição final do mesmo.

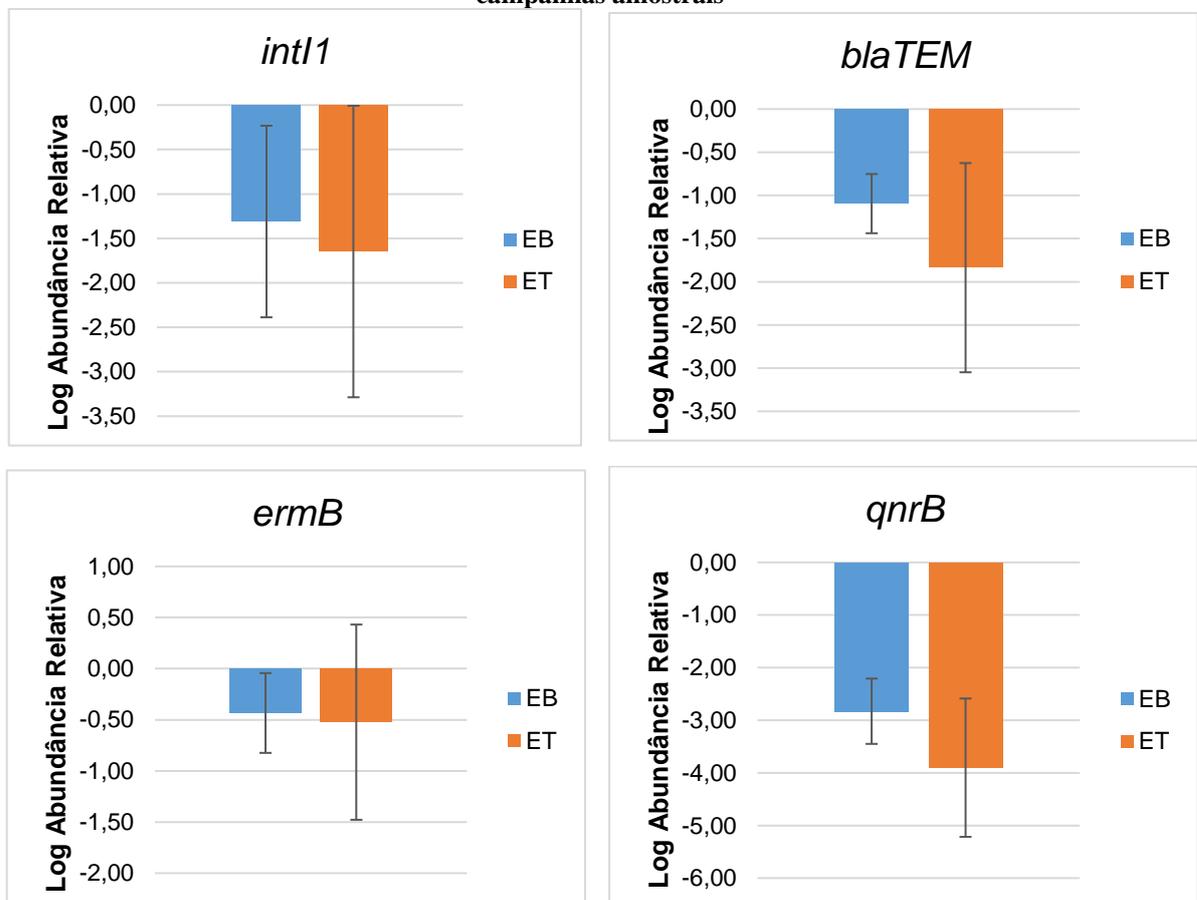
6.2 Comparação entre as abundâncias de genes do efluente bruto e tratado

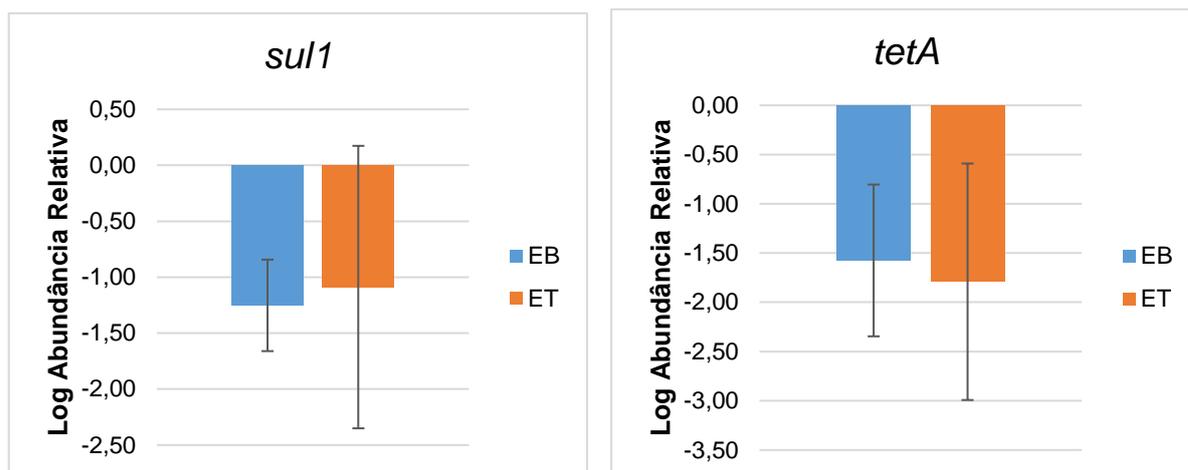
A análise das abundâncias absolutas é importante pois indica, em termos de concentração no efluente, se o sistema de tratamento consegue reduzir a quantidade de bactérias carreadoras de genes de resistência a antibióticos do efluente suíno. Porém, a análise das abundâncias relativas pode indicar se o sistema é seletivo, ou seja, se existe diferença entre os níveis de redução de bactérias resistentes e não-resistentes. Nesta abordagem, tem-se a razão entre a abundância absoluta de determinado GRA ou *intI1* e a abundância absoluta do gene RNAr 16S, ou seja, estima uma proporção entre bactérias resistentes e bactérias totais. Na Figura 7 são apresentadas as abundâncias relativas (média mais o desvio padrão) dos genes em EB e ET, para as seis campanhas amostrais, em unidades logarítmicas.

O elemento móvel *intI1* foi quantificado no efluente bruto, obtendo-se uma média de $1,31 \pm 1,08$ logs cópias gene (cópias de RNAr 16S)⁻¹, enquanto no efluente tratado obteve-se $-1,65 \pm 1,64$ logs cópias gene (cópias de RNAr 16S)⁻¹, indicando uma sutil diminuição na abundância relativa média deste elemento móvel ao passar pelo tratamento. Porém, após testes estatísticos, não foi observada diferença significativa entre EB e ET.

O gene de resistência *blaTEM*, conhecido por induzir resistência a antimicrobianos do tipo beta-lactâmicos através de mecanismo enzimático, foi detectado uma abundância relativa média de $-1,10 \pm 0,34$ logs cópias gene (cópias de RNAr 16S)⁻¹ em EB. Já ao final do tratamento, no efluente tratado, foram detectadas cerca de $-1,84 \pm 1,21$ logs cópias gene (cópias de RNAr 16S)⁻¹, sugerindo uma diminuição da sua abundância relativa média ao passar pelo tratamento. Entretanto, mais uma vez, EB e ET foram considerados estatisticamente iguais, devido à amplitude dos dados.

Figura 8 - Variação das abundâncias relativas dos genes no efluente bruto (EB) e tratado (ET) nas seis campanhas amostrais





O gene de resistência a eritromicina, *ermB*, que codifica resistência a esta classe de antibióticos através da alteração do alvo do antibiótico, foi quantificado no efluente bruto com uma abundância relativa de $-0,43 \pm 0,39$ logs cópias gene (cópias de RNAr 16S)⁻¹. Já no efluente tratado, o mesmo gene apresentou abundância relativa média de $-0,52 \pm 0,95$ logs cópias gene (cópias de 16S)⁻¹, havendo uma diminuição da sua abundância relativa média, apesar de não ser estatisticamente diferente.

O gene *qnrB* (resistência a quinolonas) se apresentou no efluente bruto com uma abundância relativa média de $-2,83 \pm 0,62$ logs cópias gene (cópias de RNAr 16S)⁻¹. Já no efluente tratado, para o mesmo gene, obteve-se uma abundância relativa média de $-3,90 \pm 1,32$ logs cópias gene (cópias de RNAr 16S)⁻¹, indicando uma redução após o processo de tratamento.

O gene de resistência as sulfonamidas, *sul1*, que promove resistência a esta classe de antibióticos através da alteração do alvo do antibiótico, apresentou uma abundância relativa média no efluente bruto de $-1,25 \pm 0,41$ logs cópias gene (cópias de RNAr 16S)⁻¹. Enquanto no efluente tratado, esta abundância apresentou-se em $-1,09 \pm 1,26$ logs cópias gene (cópias de RNAr 16S)⁻¹, indicando, ao contrário dos genes de resistência anteriores analisados, um aumento na abundância relativa média após o tratamento. Apesar disso, os testes estatísticos não indicaram que esta diferença foi significativa.

O gene de resistência *tetA*, responsável por conferir resistência aos antibióticos da classe das tetraciclinas através do mecanismo de bomba de efluxo, apresentou uma abundância relativa média de $-1,58 \pm 0,77$ logs cópias gene (cópias de RNAr 16S)⁻¹ e $-1,79 \pm 1,20$ logs cópias gene (cópias de RNAr 16S)⁻¹ no efluente bruto e tratado, respectivamente. Isso indica,

assim como para os outros genes analisados, com exceção do gene *sull*, uma diminuição não-significativa na abundância relativa do gene ao passar pelo tratamento.

Diante desses resultados, observou-se uma tendência de redução da abundância absoluta dos genes, porém as diferenças entre as abundâncias relativas em EB e ET não foram estatisticamente diferentes, apesar de uma tendência de redução ter sido constatada para maioria dos genes, exceto para *sull*. Outros estudos já relataram a redução da abundância absoluta de GRAs e manutenção da abundância relativa, como ocorreu no presente estudo (TAO et al., 2014; SUI et al., 2017), e atribuem este fato a uma possível alteração da comunidade microbiana ao longo das unidades de tratamento de efluentes. Acredita-se que o sistema de tratamento em questão pode ser seletivo, ou seja, este é capaz de reduzir certa quantidade de bactérias resistentes, porém reduz ainda mais a quantidade de bactérias não-resistentes. De certa forma, as bactérias resistentes podem ser mais persistentes no efluente.

6.3 Abundância absoluta dos genes no solo

Na Tabela 8, são mostradas as abundâncias absolutas dos genes monitorados nas amostras de solo que receberam diretamente o efluente tratado (S1) e o solo sem aplicação direta (S2) para as quatro campanhas amostrais (janeiro e agosto de 2020; março e abril de 2021).

Tabela 8 - Monitoramento de genes em amostras de solo fertirrigado diretamente (S1) e solo sem aplicação direta (S2)

		Abundância absoluta média para n=5 (nº cópias gene g ⁻¹)						
		RNAr 16S	<i>int11</i>	<i>blaTEM</i>	<i>ermB</i>	<i>qnrB</i>	<i>sull</i>	<i>tetA</i>
Janeiro/2020	S1	3,14E+09	2,09E+06	2,62E+06	2,63E+05	2,09E+03 ¹	4,29E+06	8,50E+05
	S2	3,85E+09	4,76E+05	2,44E+06	1,92E+04	< LD1	6,34E+05	8,02E+05
Agosto/2020	S1	3,28E+09	5,75E+06	7,27E+06	6,99E+05	3,38E+04	9,30E+06	1,93E+06
	S2	4,47E+09 ²	2,12E+05	1,20E+07	5,13E+04	7,83E+04	3,12E+05	1,15E+06
Março/2021	S1	1,93E+09	2,01E+07	1,76E+06	1,63E+06 ²	< LD2	1,76E+10 ²	8,29E+06 ²
	S2	8,08E+08	7,19E+06	9,54E+06	1,66E+05	< LD2	1,69E+09	2,62E+05
Abril/2021	S1	1,25E+09	1,24E+07	7,98E+05	1,16E+07	< LD2	1,09E+10	2,97E+06
	S2	5,76E+08	4,32E+06	9,38E+05	6,16E+05	< LD2	1,89E+09	1,89E+05

LD1 = 1 cópia gene uL⁻¹ de reação; LD2 = 2000 cópias gene uL⁻¹ de reação; ¹n=2; ²n=4

Assim como nas amostras de efluente bruto e tratado, o gene RNAr 16S foi o mais abundante como já esperado, visto que o mesmo representa estima as bactérias totais das

amostras de solo. Porém, com relação aos demais genes, foi observado um perfil diferente. Em geral, as abundâncias destes genes se apresentaram na faixa de 10^5 a 10^6 cópias por grama de solo, enquanto o gene *qnrB* foi o menos abundante, sendo detectado apenas em algumas campanhas.

As comparações entre as abundâncias absolutas de genes em S1 e S2 também foram variáveis, e em algumas campanhas, para a maioria dos genes, S1 apresentou mais cópias que o S2, possivelmente influenciado pela fertirrigação. Porém, também neste caso, não foram identificadas diferenças significativas para o conjunto de dados de S1 e S2, em nenhum dos genes, provavelmente devido à variabilidade dos dados. Este resultado sugere que não há influência dos períodos chuvosos (Janeiro/ Março) e não chuvosos (Agosto/ Abril) na abundância dos genes no efluente.

6.4 Comparação entre as abundâncias de genes do efluente tratado e solo

Como já mencionado, a comparação relativa entre as abundâncias permite conhecer a proporção entre bactérias portadoras de genes e bactérias totais em determinada amostra. Dessa forma, foram também calculadas as abundâncias relativas dos genes em S1 e S2. Adicionalmente, a abundância relativa em ET também foi usada na comparação, de modo a identificar uma possível redução ou incremento dessas após disposição final no solo. Na Figura 8, são apresentadas as variações abundâncias relativas dos genes no efluente tratado (ET), solo fertirrigado diretamente (S1) e solo sem aplicação direta (S2), nas campanhas amostrais de janeiro e agosto de 2020, e março e abril de 2021.

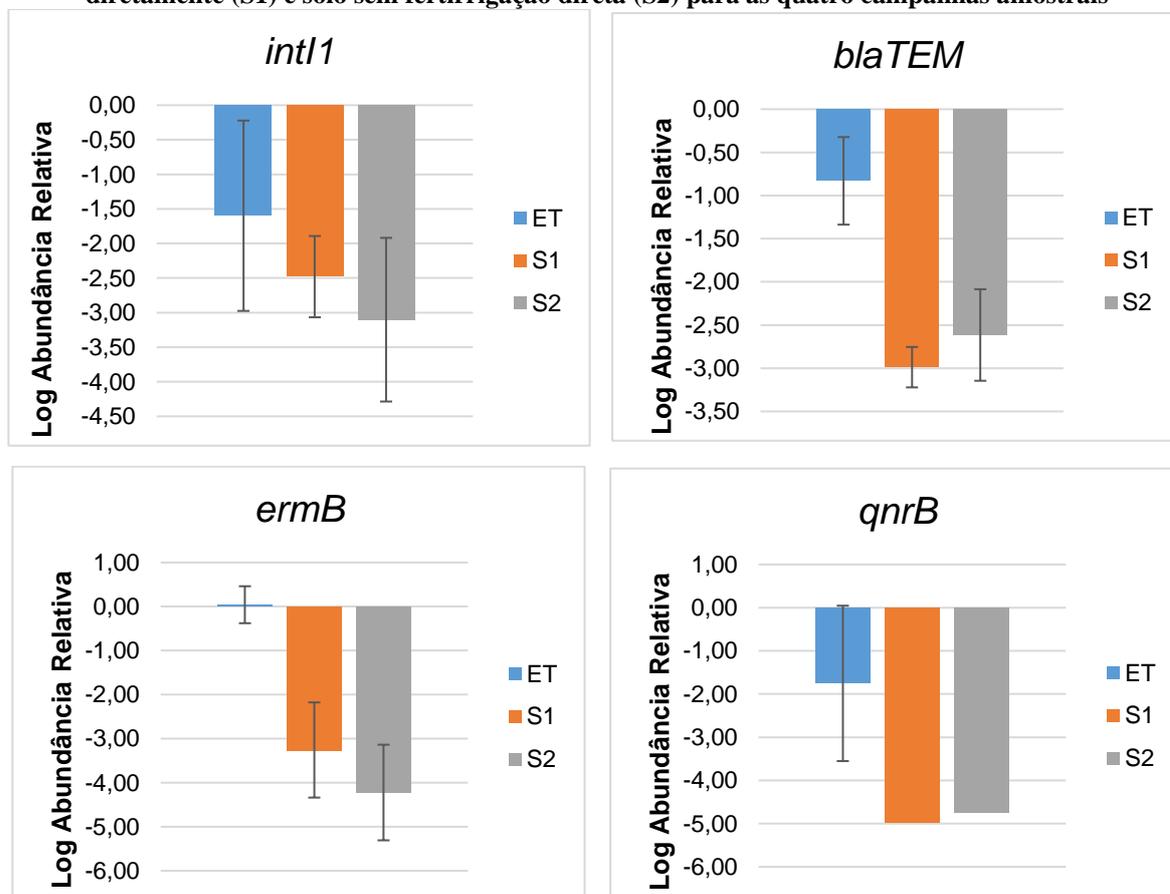
O elemento móvel *intI1* foi detectado no efluente tratado com abundância relativa média de $-1,60 \pm 1,38$ logs cópias gene (cópias de RNAr 16S)⁻¹. Já em S2 e S1 foram detectadas $-3,10 \pm 1,18$ logs cópias gene (cópias de RNAr 16S)⁻¹ e $-2,48 \pm 0,59$ logs (cópias gene RNAr 16S)⁻¹, respectivamente, indicando que a abundância do gene foi maior no efluente tratado em relação as amostras de solo. Na comparação de S1 e S2, não foram observadas diferenças significativas.

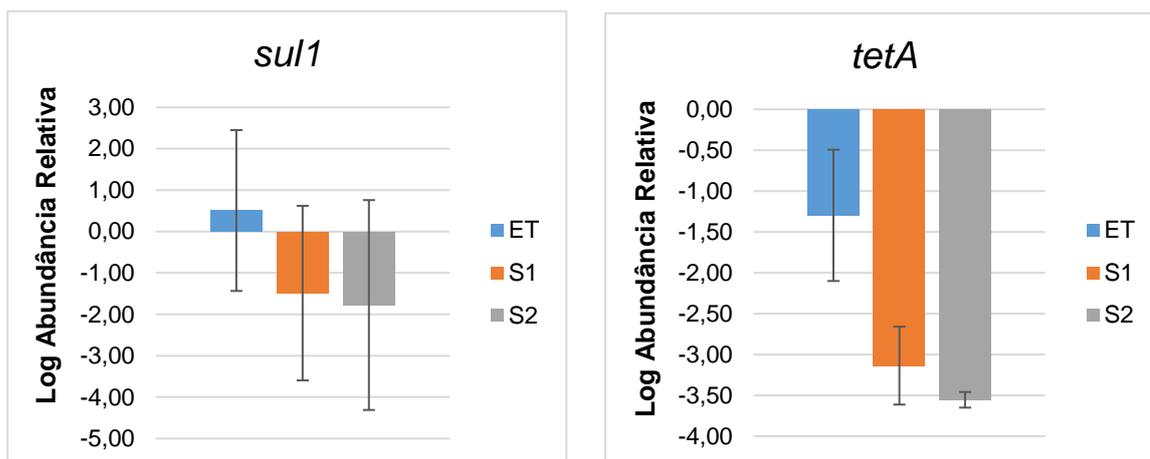
Para o gene de resistência aos beta lactâmicos, *blaTEM*, foi detectada no efluente tratado uma média de abundância relativa de $-0,83 \pm 0,51$ logs cópias gene (cópias RNAr 16S)⁻¹, enquanto em S2 e em S1 foram detectadas cerca de $-2,62 \pm 0,53$ logs e $-2,99 \pm 0,23$ logs cópias gene (cópias RNAr 16S)⁻¹, respectivamente. Estes dados indicam que a abundância do gene em questão se apresenta maior no efluente tratado em relação as amostras de solo analisadas. Entre S1 e S2, observou-se uma tendência contrária, ou seja, o solo que não recebeu efluente parece

apresentar maior teor relativo do gene *blaTEM*, apesar de não-significativo. Uma possível justificativa poderia ser a presença de bactérias portadoras deste gene em S2, que não estavam presentes em S1, ou até mesmo o carreamento deste gene por escoamento superficial de S1 para S2, já que a área de estudo apresenta uma declividade considerável.

Os genes *ermB* e *tetA* seguiram mesma tendência de *intI1*. Para o gene de resistência a eritromicina, foi detectada uma média de abundância relativa de $0,04 \pm 0,42$ logs cópias gene (cópias RNAr 16S)⁻¹ no efluente tratado. Enquanto isso, no S2 foi detectado $-4,22 \pm 1,09$ logs cópias gene (cópias RNAr 16S)⁻¹, apresentando uma média de abundância relativa menor do que a do S1, no qual foi detectado $-3,26 \pm 1,08$ logs cópias gene (cópias RNAr 16S)⁻¹. Para o gene de resistência as tetraciclinas, *tetA*, a análise do efluente tratado revelou uma média de abundância para este gene de $-1,30 \pm 0,80$ logs cópias gene (cópias de RNAr 16S)⁻¹. No S2 foi detectado $-3,56 \pm 0,10$ logs cópias gene (cópias RNAr 16S)⁻¹ e no solo fertirrigado com efluente suíno uma média de $-3,14 \pm 0,48$ logs cópias gene (cópias RNAr 16S)⁻¹. Para ambos os casos, houve diferença significativa da abundância relativa entre ET e S1/S2 (estatisticamente iguais).

Figura 9 - Variação das abundâncias relativas dos genes no efluente tratado (ET), solo fertirrigado diretamente (S1) e solo sem fertirrigação direta (S2) para as quatro campanhas amostrais





Para o gene de resistência as quinolonas, *qnrB*, a média de sua abundância relativa no efluente tratado foi de $-1,75 \pm 1,80$ logs cópias gene (cópias de RNAr 16S)⁻¹. Já nas amostras de solo, o mesmo não foi quantificado na maioria das coletas, o que indica neste caso que a disposição do efluente no solo possibilitou uma redução da abundância relativa deste.

A média da abundância relativa do gene de resistência as sulfonamidas, *sul1*, também foi analisada, sendo quantificado no efluente tratado um valor de $0,51 \pm 1,94$ logs cópias gene (cópias de RNAr 16S)⁻¹. Nas amostras de S2 e S1, foram observadas médias de $-1,78 \pm 2,53$ logs cópias gene (cópias de RNAr 16S)⁻¹ e $-1,49 \pm 2,11$ logs cópias gene (cópias de RNAr 16S)⁻¹, respectivamente. Devido à ampla variabilidade dos dados, não foram observadas diferenças significativas entre os pontos monitorados, incluindo ET.

Considerando as abundâncias relativas entre S1 e S2, não foram observadas diferenças significativas para os genes monitorados, apesar de haver tendência de níveis menores em S2 na maioria dos casos, exceto para *blaTEM*. Isso pode ter ocorrido devido à composição natural do S2, que pode apresentar bactérias portadoras de *blaTEM*, ou até mesmo a possibilidade de arraste de bactérias portadoras deste gene para região sem aplicação direta do efluente, devido ao escoamento superficial. Um maior número de coletas poderia trazer uma resposta mais clara, porém até o momento, já é possível observar que a disposição do efluente tratado no solo reduz as proporções relativas de bactérias resistentes, possivelmente devido às condições favoráveis para inativação de bactérias, tal como a incidência de radiação solar.

Como pode ser constatado na Tabela 3, os estudos da literatura são voltados para a investigação dos efeitos da aplicação do resíduo sólido gerado na suinocultura, o estrume. Apesar desse fato, é possível fazer algumas comparações dos efeitos da disposição final de efluentes suínos em solos, com relação aos genes monitorados no presente estudo.

Em geral, observou-se um incremento superior a 1 log na abundância relativa de *ermB*, *blaTEM*, *intI1* e *sul1*, após aplicação de estrume no solo, na maioria dos estudos consultados (VAN DEN MEERSCHKE et al., 2020; PENG et al., 2017; DUAN et al., 2019; WU et al., 2019). Por outro lado, não foram observadas variações para *tetA* (GUO et al., 2018; WU et al., 2019). Alguns casos específicos relataram abundância de *sul1* inferior no solo fertirrigado, quando comparado ao solo sem aplicação de estrume (HAN et al., 2021; MILLER et al., 2020). Inclusive, Miller et al. (2020) relataram abundâncias de *intI1*, *ermB* e *sul1* inferiores no solo acrescido de estrume, em comparação com o solo sem aplicação, o que pode ser justificado por características específicas dos solos em estudo. Apesar de não-significativas, houveram tendências semelhantes na granja em estudo quando comparadas aos dados da literatura para alguns genes.

A ampla variabilidade observada nesses dados pode estar ligada a inúmeros fatores, como as características do solo, à composição do estrume/efluente e o regime de aplicação do efluente. Além disso, neste trabalho, a área que não recebeu aplicação direta do efluente pode ter sofrido influência de escoamento superficial. Dessa forma, um maior número de campanhas amostrais, bem como a adição de uma área de estudo isenta de contato com o efluente, poderia delinear melhor as tendências percebidas neste trabalho.

Entretanto, os resultados alcançados aqui fortalecem a importância da investigação mais detalhada dos efeitos da disposição final de efluentes no solo, mesmo que tratados, como forma de suprir a demanda nutricional e hídrica de culturas agrícolas, já que esta prática é muito comum no país. No que diz respeito à disseminação de resistência a antibióticos, é nítida uma redução da concentração de GRAs no efluente pela unidade de tratamento, bem como uma redução na proporção relativa destes genes entre ET e S1/S2, indicando que esta via pode minimizar o problema.

7. CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados, foi possível observar a presença de todos os genes de resistência a antibióticos monitorados, na maioria das amostras de efluente e solo. Vale ressaltar que o gene de resistência *qnrB* foi o menos abundante em ambos os tipos de amostras, enquanto *ermB* foi o mais abundante no efluente. Para as amostras de solo, não houve um gene de resistência predominante, devido à variabilidade dos resultados.

A comparação relativa entre EB e ET revelou que o sistema de tratamento usado na granja não reduz significativamente a proporção entre bactérias resistentes e bactérias totais, apesar de haver redução da abundância absoluta dos genes. Isso indica que o tratamento é seletivo, ou seja, reduz mais bactérias não-resistentes que bactérias resistentes.

Com relação às amostras de solo, apenas o gene *blaTEM* apresentou maior abundância relativa em S2 que em S1 (considerada estatisticamente igual), indicando a possibilidade de bactérias exclusivas de S2 portadoras de genes *blaTEM*, ou até mesmo carreamento dessas bactérias de S1 para S2, devido ao escoamento superficial.

Possivelmente houve uma diminuição significativa da proporção de bactérias portadoras dos genes *blaTEM*, *ermB* e *tetA* após disposição do dejetos no solo, indicando que a prática pode auxiliar na redução da disseminação de GRAs no ambiente.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, E.; CHAIN, E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. **Nature**, London, v. 146, n. 3713, p. 837, Dec. 1940.
- AGGA, G. E. et al. Antimicrobial-Resistant Bacterial Populations and Antimicrobial Resistance Genes Obtained from Environments Impacted by Livestock and Municipal Waste. **Plos One**, v. 10, n. 7, p.1-19, 21 jul. 2015.
- ANDRADE, A. N. A; RANZI, T. J. D; MUNIZ, R. N; SILVA, L. G S; ELIAS, M. J. “Biodigestores rurais no contexto da atual crise de energia elétrica brasileira e na perspectiva da sustentabilidade ambiental”. Florianópolis- SC. **Enc. Energ. Meio Rural**, ano 4, 2002, 12 p.
- ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resistência microbiana - Mecanismos e impacto Clínico. Mecanismos de resistência bacteriana aos antimicrobianos.** 2007. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/cursos/rm_controlere/opas_web/modulo3/mecanismos.htm#. Acesso em: 30 Abr. 2020.
- APLEY, M. D., BUSH, E. J., MORRISON, R. B., SINGER, R. S., SNELSON, H. (2012) **Use estimates of in-feed antimicrobials in swine production in the United States.** Foodborne Path Dis 9, 1–8
- ARRUDA, C. J. M; SIQUEIRA, V. F. A; SOUZA, F. J. M; SILVA, J. L. N; SANTOS, K. F; CIPRIANO, D. Z; DIAS, L. A. S; FARO, F. R. A. Revisão Bibliográfica De Antibióticos Beta-Lactâmicos. **Revista Saúde em Foco**, São Paulo. Nº 11, p. 14, 2019
- AZEVEDO, S. M. M. **Farmacologia dos antibióticos beta-lactâmicos.** 2014. 180 f. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Fernando Pessoa Faculdade de Ciências da Saúde, Porto, 2014.
- BAO, J. et al. Effects of macroporous adsorption resin on antibiotic resistance genes and the bacterial community during composting. **Bioresource Technology**, v. 295, p. 121997, 2020.
- BAPTISTA, M. G. F. M. **Mecanismos de resistência aos antibióticos.** 2013. 51 p. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia Faculdade de Ciências e Tecnologias da Saúde, Lisboa, 2013.
- BARROCAS, A. R. F. **Epidemiologia das beta-lactamases CTX-M, em bactérias Gram negativo, em Portugal.** 2016. 37 p. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, Coimbra, 2016
- BARROS, E. C; NICOLOSO, R; OLIVEIRA, P. A. V; CORRÊA, J. C; Potencial Agrônomo dos dejetos de suínos. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).** 1 Ed. 2019.
- BERTONCHELI, C. M.; HÖRNER, R. Uma revisão sobre Metallo-β-lactamases. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.** São Paulo, v. 44, n. 4, p. 577-599, dez. 2008.

BLAIR, J. M. A. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 42-51, 2015.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução CONAMA nº 430, de 13 de maio de 2011**. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA. 2011.

BRUMANO, G.; GATTÁS, G. Implicações sobre o uso de antimicrobianos em rações de monogástricos. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 6, nº 3, p. 953-959, Maio/Junho 2009.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman**. Editora Ltda. 12ª Edição, 2012.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 54, n. 3, p. 969-976, Dec. 2010

CAETANO, G. L. Avaliação de elementos genéticos de resistência a antibióticos em área sob influência da fertirrigação com efluente tratado de uma granja de suinocultura. Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre em engenharia ambiental. 2022.

CAMPAGNOLO, E. R. et al. Antimicrobial residues in animal waste and water resources proximal to large-scale swine and poultry feeding operations. **Science of the Total Environment**, v. 299, n. 1, p. 89-95, 2002.

CANESIN, R. C. F. S.; CORRÊA, L. S. Uso de esterco associado à adubação mineral na produção de mudas de mamoeiro (*Carica papaya* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, p. 481-486, 2006.

CARD. **The Comprehensive Antibiotic Resistance Database**. Disponível em: <<https://card.mcmaster.ca/home>>. Acesso em: 22 abr. 2020.

CHANDER, Y. et al. Sub-therapeutic Use of Antibiotics and Prevalence of Antibiotic Resistant Bacteria on Swine Farms. **Research Journal of Microbiology**, v. 2, n. 9, p.654-663, 1 set. 2007.

CHANG, J. et al. Variation pattern of antibiotic resistance genes and microbial community succession during swine manure composting under different aeration strategies. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 95, n. 2, p. 466-473, 2020.

CHÁVEZ, L. F. G; MOREIRA, G. B; DUARTE, V. N; **Aspectos gerais da suinocultura brasileira e mundial no período de 2005 a 2014**. Ponta Porã/MS, 2016.

CHEN, J. et al. Development and Application of Real-Time PCR Assays for Quantification of erm Genes Conferring Resistance to Macrolides-Lincosamides-Streptogramin B in Livestock Manure and Manure Management Systems. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 14, p.4407-4416, 11 mai. 2007.

CHENG, D. L. et al. Bioprocessing for elimination antibiotics and hormones from swine wastewater. **Science of the Total Environment**, v. 621, p.1664-1682, abr. 2018.

COAN, M. M. **Detecção de genes codificadores de resistência a antimicrobianos de importância clínica em amostras de carne de frango.** Orientador: Prof. Associado Glavur Rogério Matté. 2014. 108 p. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Saúde Pública, São Paulo, 2014.

COELHO, S. T; VELAZQUEZ, S. M. S. G; SILVA, O. C; ABREU, F. C. Geração de energia elétrica a partir do biogás proveniente do tratamento de esgoto. CONGRESSO BRASILEIRO DE ENERGIA 11. Anais...Rio de Janeiro: Anais 6. **Engenharia Rural**, 2006.

COSTA, A. L. P; SILVA JÚNIOR, A. C. S. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. **Estação Científica (UNIFAP)**. v. 7, ed. 2, p. 45-57, Maio/Ago. 2017.

COUCH, M. et al. Abundances of tetracycline resistance genes and tetracycline antibiotics during anaerobic digestion of swine waste. **Journal of Environmental Quality**, v. 48, n. 1, p. 171-178, 2018.

CROSFITS, T. S; GASPARRINI, A. J; DANTAS, G. Next-generation approaches to understand and combat the antibiotic resistome. **Nature Reviews Microbiology**. 15(7): 422- 434. 2017.

CUNHA, V. O. **Bactérias multirresistentes: *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* enzima KPC nas Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS).** 2014. 55 p. Monografia (Programa de PósGraduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte- MG, 2014.

DELCOUR, A. H. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. **Revista Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Proteins and Proteomics** v. 5, ed. 1749, p. 808-816, Nov. 2008.

DONG, X.; REDDY, G. B. Soil bacterial communities in constructed wetlands treated with swine wastewater using PCR-DGGE technique. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 4, p. 1175-1182, 2010.

DUAN, M.; GU, J.; WANG, X.; LI, Y.; ZHANG, R.; HU, T.; ZHOU, B. Factors that affect the occurrence and distribution of antibiotic resistance genes in soils from livestock and poultry farms. **Science of The Total Environment**. v. 180, p.114-122, 2019.

DZIDIC, S; SUSKOVIC, J; KOS, B. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: Biochemical and genetic aspects. **Food Technology and Biotechnology (FOOD TECHNOLOGY BIOTECH)**, v. 46, n. 1, p. 11-21, Jan. 2008..

EL KHAL, A. **Isolamento e Caracterização Genômica de Bacteriófagos quanto ao seu Potencial de Uso Terapêutico em Infecções Causadas por Enterobactérias.** 2016. 96 p. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde) - Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte- MG, 2016.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 2020. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/estatisticas>>. Acesso em: 01 jun. 2020.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 2022. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/estatisticas/suinos/mundo/>>. Acesso em: 04 jul. 2022.

FANG, H. et al. Prevalence of Antibiotic Resistance Genes and Bacterial Pathogens in Long-Term Manured Greenhouse Soils As Revealed by Metagenomic Survey. **Environmental Science & Technology**, v. 49, n. 2, p.1095-1104, 2015.

FATMA. **Fundação do Meio Ambiente de Santa Catarina. Instrução Normativa nº11 de outubro de 2014.** *Definir a documentação necessária ao licenciamento e estabelecer critérios para apresentação dos planos, programas e projetos ambientais para implantação de atividades relacionadas à suinocultura de pequeno, médio e grande porte, incluindo tratamento de resíduos líquidos, tratamento e disposição de resíduos sólidos, emissões atmosféricas, ruídos e outros passivos ambientais.*

FERRIS, M. J.; MUYZER, G.; WARD, D. M. Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, n. 2, p. 340-346, 1996.

FILHO, R. S; SEHNEM, S; CERICATO, A; JUNIOR, S. S; FISCHER, A. Compostagem de dejetos de suínos. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v.6, n.1, p. 47-78, jan./abr. 2013.

FLUIT, AD. C.; VISSER, M. R.; SCHMITZ, F. J. Molecular Detection of Antimicrobial Resistance. **CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS**, The Netherland, v. 14, ed. 4, p. 836–871, Out. 2001..

FREY, S. K. et al. Quantitative *Campylobacter spp.*, antibiotic resistance genes, and veterinary antibiotics in surface and ground water following manure application: Influence of tile drainage control. **Science of the Total Environment**, v. 532, p.138-153, nov. 2015.

FURUYA, Y., LOWY, F. Antimicrobial resistant bacteria in the community setting. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 1, p. 36-45. 2006.

GOLDSTEIN, C. et al. Incidence of class 1 and 2 integrases in clinical and commensal bacteria from livestock, companion animals, and exotics. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 45, n. 3, p. 723-726, 2001.

GONÇALVES, R; PALMEIRA, E. SUINOCULTURA BRASILEIRA: Observatorio de la Economía Latinoamericana. **Revista académica de economía**, ano 2006, n. 71, p. 1-11, Dez. 2006.

GRAVES, A. K. et al. Distribution of ten antibiotic resistance genes in *E. coli* isolates from swine manure, lagoon effluent and soil collected from a lagoon waste application field. **Folia Microbiologica**, v. 56, n. 2, p.131-137, mar. 2011.

GUIMARÃES, D; AMARAL, G; MAIA, G; LEMOS, M; ITO, M; CUSTODIO, S. Suinocultura: Estrutura da cadeia produtiva, panorama do setor do Brasil e no mundo e o apoio do BNDES. **Agroindústria. BNDES Setorial** 45, p. 85-136, 2017.

GUO, T.; LOU. C.; ZHAI. W.; TANG, X.; HASHMI, M. Z.; MURTAZA, R.; LI, Y.; LIU, X.; XU, J. Aumento da ocorrência de metais pesados, antibióticos e genes de resistência na

superfície do solo após a aplicação de estrume a longo prazo. **Science of The Total Environment**. v 635, p. 995-1003. 2018.

HAN, B.; YANG, F.; TIAN, X.; MU, M.; ZHANG, K. Rastreado a transferência de genes de resistência a antibióticos em todas as estações, desde dejetos de suínos até ambientes receptores. **Science of The Total Environment**. v 219, 2021.

HÖLZEL, C. S. et al. Sewage sludge and liquid pig manure as possible sources of antibiotic resistant bacteria. **Environmental Research**, v. 110, n. 4, p.318-326, mai. 2010.

HU, Y. et al. Occurrence and removal of sulfonamide antibiotics and antibiotic resistance genes in conventional and advanced drinking water treatment processes. **Journal of Hazardous Materials**, v. 360, p. 364-372, 2018

HUANG, X. et al. Performance of vertical up-flow constructed wetlands on swine wastewater containing tetracyclines and tet genes. **Water Research**, v. 70, p.109-117, mar. 2015.

HUANG, X. et al. Removal of antibiotics and resistance genes from swine wastewater using vertical flow constructed wetlands: Effect of hydraulic flow direction and substrate type. **Chemical Engineering Journal**, v. 308, p.692-699, jan. 2017.

ITO, M. GUIMARÃES, D. AMARAL, G. **Impactos ambientais da suinocultura: desafios e oportunidades**. Agroindústria BNDES Setorial 44, p. 125-156. 2016.

JINDAL, A. et al. Antimicrobial Use and Resistance in Swine Waste Treatment Systems. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 12, p.7813-7820, 13 out. 2006.

JOY, S. R. et al. Fate and Transport of Antimicrobials and Antimicrobial Resistance Genes in Soil and Runoff Following Land Application of Swine Manure Slurry. **Environmental Science & Technology**, v. 47, n. 21, p.12081-12088, 14 out. 2013.

KATZUNG, B. G; TREVOR, A. J. **Farmacologia básica e clínica**. Editora Ltda. 13º Edição, 2017.

KUMAR, S.; VARELA, M. F. Molecular mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. Microbial pathogens and strategies for combating them: **Science, Technology and Education**. Formatex, v.4, p. 522-534. 2013.

KUNZ, A.; HIGARASHI, M. M.; OLIVEIRA, P. A. Tecnologias de manejo e tratamento de dejetos de suínos estudadas no Brasil. **Caderno de Ciência e Tecnologia**, Brasília, v. 22, n. 3, p.652-665, set./dez. 2005.

KUNZ, A.; STEINMETZ, R. L. R; BORTOLI, M. Separação sólido- líquido em efluentes da suinocultura. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.14, n.11, p.1220-1225, 2010.

LIANG, X. et al. Spatial and seasonal variations of antibiotic resistance genes and antibiotics in the surface waters of Poyang Lake in China. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 196, p. 110543, 2020.

LIMA, C. C; BENJAMIN, S. C. C; SANTOS, R. F. S. Mecanismo de Resistência Bacteriana Frente aos Fármacos: Uma Revisão. **Revista CuidArt Enfermagem**. v. 11 n° 1 p. 105-113. Jan. –jun. /2017.

LUBY, E. M.; MOORMAN, T. B.; SOUPIR, M. L. Fate and transport of tylosin-resistant bacteria and macrolide resistance genes in artificially drained agricultural fields receiving swine manure. **Science of the Total Environment**, v. 550, p.1126-1133, abr. 2016.

LUO, G. et al. Antibiotic Resistance Genes and Correlations with Microbial Community and Metal Resistance Genes in Full-Scale Biogas Reactors As Revealed by Metagenomic Analysis. **Environmental Science & Technology**, v. 51, n. 7, p.4069-4080, 16 mar. 2017.

LU, X.; LU, P. Synergistic effects of key parameters on the fate of antibiotic resistance genes during swine manure composting. **Environmental Pollution**, v. 252, p. 1277-1287, 2019.

MAO, D. et al. Prevalence and proliferation of antibiotic resistance genes in two municipal wastewater treatment plants. **Water research**, v. 85, p. 458-466, 2015.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Projeto de agronegócios- Brasil 2017/18 a 2027/28. Projeções a longo prazo**. 9º Ed. Brasília: MAPA, 2018. 114p.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Suinocultura de baixa emissão de carbono. Levantamento de tecnologias de tratamento de dejetos para suinocultores de pequeno porte**. 1º Ed. Brasília: MAPA, 2016, 44p. MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento.

MAPAa. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2020. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pequarios/alimentacao-animal/aditivos>>. Acesso em: 01 jun. 2020.

MAPAb. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. 2020. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/mapa-proibe-o-uso-de-tilosina-lincomicina-e-tiamulina-como-aditivo-para-melhorar-o-desempenho-de-animais>>. Acesso em 03 mai. 2020.

MAYER, G. (2012). Bacteriology- Chapter Eight Exchange of Genetic Information. Disponível em: <<https://www.microbiologybook.org/mayer/genetic%20ex.htm>>. Acesso em: 04 jun. 2020.

MEDRI, W.; COSTA, R. H. R; MEDRI, V.; BELLI FILHO, P. Stabilization ponds systems: cost estimation for the treatment of piggery waste. **Transactions of The ASABE**, v. 50, n. 4, p. 1409-1414, 2007.

MELO, R. F. M. R., et al. Avaliação do uso de adubo orgânico nas culturas de milho e feijão caupi em barragem subterrânea. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 4, n. 2, 2009.

MENDES, C. USDA estima que produção de suínos deva crescer 3,5% no Brasil. **Revista Suinoculturaindustrial.com**. n° 04/2020. Ano 42. Edição 294, 2019.

MILLER, D. N.; JURGENS, M. E.; DURSO, L. M.; SCHMIDT, A. M. Simulated Winter Incubation of Soil With Swine Manure Differentially Affects Multiple Antimicrobial Resistance Elements. **Frontiers Microbiology**. v. 11, 2020.

MINAS GERAIS. **Deliberação Normativa Conjunta COPAM/CERH-MG N.º 1, de 05 de Maio de 2008**. *Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências.*

NATIONAL PORK BOARD. World Per Capita Pork Consumption – 2015. 7 nov. 2016. Disponível em: <http://www://.pork.org/pork-quick-facts/home/stats/u-s-pork-exports/world-per-capita-pork-consumptio-2/>. Acesso em: 31 ago. 2016.

NEIHARDT, F. (2004). Bacterial genetics. Em McGraw Hill (Eds.), **Sherris Medical Microbiology - An introduction to infectious diseases** (4ª ed., pp. 53 - 74). Nova Iorque.

NOGUEIRA, H. S; XAVIER, A. R. E. O; XAVIER, M. A. S; CARVALHO, A. A; MONÇÃO, G. A; BARRETO, N. A. P. Antibacterianos: Principais Classes, Mecanismos de Ação e Resistência. **Revista Unimontes Científica**. Montes Claros, v. 18, nº 2. Jul./dez. 2016.

OLIVEIRA, et al. Mecanismos de resistência bacteriana a antibióticos na infecção urinária. **Uningá Review**, v.20, n.3, p.65-71. 2014.

OLIVEIRA, P. A. V. (Coord.). Tecnologias para o manejo de resíduos na produção de suínos: manual de boas práticas. **Concórdia: Embrapa Suínos e Aves**, 2004.

OLIVEIRA, P. A. V. et al. **MANUAL DE MANEJO E UTILIZAÇÃO DOS DEJETOS DE SUÍNOS**. Nº 27. 1. ed. Concórdia: EMBRAPA-CNPSA, 1993. p. 188.

OLIVEIRA, P. A. V.; NICOLOSO, R. S.; HIGARASHI, N. M.; SANTOS FILHO, J. I. Desenvolvimento de unidade de compostagem automatizada para o tratamento dos dejetos líquidos de suínos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 48. 2011, Belém. Anais... Belém: UFRA, 2011. CD-ROM

OLLÉ, M. A; GROFF, P.M; RUAS, M.S; OLLÉ, F. A; FLUCK, A. C; SILVEIRA, R. F; ALFAYA, H. Uso de antibióticos na alimentação de suínos. Revisão de literatura. **REDVET - Revista electrónica de Veterinária** - Volume 18 Nº 10, 2017).

OMS. Organização Mundial da Saúde. **Global Action Plan on Antimicrobial Resistance**. Genebra: WHO, 2015. 28 p.

PALZKILL, T. Metallo- β -lactamase structure and function. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1277, n. 1, p. 91-104, Jan. 2013.

PARK, J. et al. Spread of multidrug-resistant *Escherichia coli* harboring integron via swine farm waste water treatment plant. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 149, p.36-42, mar. 2018.

PAULA, V. G. et al. Enterobactérias produtoras de carbapenemase: prevenção da disseminação de superbactérias em UTI's. **Universitas: Ciências da Saúde**, Brasília, v. 14, n. 2, p. 175-185, jul./dez. 2016.

PENG, S.; FENG, Y.; WANG, Y.; GUO, X.; CHU, H.; LIN, X. Prevalence of antibiotic resistance genes in soils after continually applied with different manure for 30 years. **Science of The Total Environment**. v. 340. p. 16-25.2017

PERDOMO, C. C.; OLIVEIRA, P. A. V. O.; KUNZ, A. Sistema de tratamento de dejetos de suínos: inventário tecnológico. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2003. 83 p. (Documentos, 85).

PEREIRA, A. R; PARANHOS, A. G. O; AQUINO, S. F; SILVA, Q. S. Distribution of genetic elements associated with antibiotic resistance in treated and untreated animal husbandry waste and wastewater. **Environ Sci Pollut Res**, v. 28, p. 26380–26403, 2021.

PETRIN, S. et al. Evaluation and quantification of antimicrobial residues and antimicrobial resistance genes in two Italian swine farms. **Environmental Pollution**, v. 255, p. 1-9, 2019.

QIAN, X. et al. Effects of passivators on antibiotic resistance genes and related mechanisms during composting of copper-enriched pig manure. **Science of the Total Environment**, v. 674, p. 383-391, 2019.

RANG, H. P; RITTER, J. M; FLOWER, R. J; HENDERSON, G. Rang e Dale: Farmacologia. Elsevier Editora Ltda. Tradução da 8ª edição, 2016.

REGITANO, J. B; LEAL; R. M. P. Comportamento e Impacto Ambiental de Antibióticos Usados na Produção Animal Brasileira. **Revista Brasileira Ciência do Solo**. vol. 34, n.3, p.601-616, 2010.

SANTOS, L. D; MAYERLE, S.F; CAMPOS, L.M.S; Tecnologias e sistemas de tratamento para os dejetos da suinocultura. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 9, n. 5 , p. 12 - 18, 2014.

SANTOS, W. R. M; INFORZATO, G. R; ALVEZ, R. M; BATAIER NETO, M; COELHO NETO, E. C; BAZAN, C. T. Antibioticoterapia em suínos- Matrizes e Engorda. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. Ano VII, Nº 12, p. 7, Jan. 2009.

SARMAH, A. K.; MEYER, M. T.; BOXALL, A. B. A. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. **Chemosphere**, v. 65, n. 5, p.725-759, out. 2006.

SCHIESARI JUNIOR, A.; BENTO, A. M.; SILVA, A. C. M. A. A.; XAVIER, C. M. Infecções por bactérias formadoras de biofilme: breve revisão. **Revista Brasileira de Medicina Interna**. v.2 n. 1 p. 37-47, Cantanduva -São Paulo, 2015.

SEBRAE. Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. **Mapeamento da Suinocultura Brasileira. Mapping of Brazilian pork Chain**. 1ª Edição. Brasília: SEBRAE, 2016, p. 378.

SEBRAE. Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. **Suinocultura carne in natura, embutidos e defumados**. ESTUDOS DE MERCADO SEBRAE/ESPM, 2008. Relatório Completo, 2008, p. 104.

SILVA, F. L.; SILVA, I. J.; RODRIGUES, L. S.; OLIVEIRA, P. R. Influência dos parâmetros de projeto e condições operacionais no desempenho de lagoas de estabilização no tratamento de dejetos de suínos. **Engenharia Ambiental** - Espírito Santo do Pinhal, v. 6, n. 3, p. 422-433, set /dez 2009.

SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. **Doenças dos Suínos**, Goiânia, Cãnone Editorial, p. 683-717, 2007.

SOUZA, H. C; FEHR, L. C. A; TRINDADE, J. A. S; TAVARES, M. Custos de produção de suínos: estudo nos principais estados produtores do Brasil. In: *Congresso Brasileiro de Custos – XXV*. 2018, Vitória, ES. **Anais eletrônicos...** Vitória: 2018, p. 1-16.

SUI, Q. et al. Seasonal variation and removal efficiency of antibiotic resistance genes during wastewater treatment of swine farms. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 10, p. 9048-9057, 2017.

TAO, C. et al. Evaluation of five antibiotic resistance genes in wastewater treatment systems of swine farms by real-time PCR. **Science of the Total Environment**, v. 496, p.116-121, out. 2014.

TORRES, A; PEDROSA, J. F; MOURA, J. P., Fundamentos de Implantação de Biodigestores em Propriedades Rurais. **Revista Educação Ambiental em Ação**. Nº 40. Ano XI, p. Jun.-Ago./2012.

VAN DEN MEERSCHE, T. et al. Presence and fate of antibiotic residues, antibiotic resistance genes and zoonotic bacteria during biological swine manure treatment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 175, p. 29-38, 2019.

VAN DE MEERSCHE, T.; RASSCHAERT, G.; NEST, T. V.; HAESEBROUCK, F.; HERMAN, L.; VAN COILLIE, E.; VAN WEYENBERG, S.; DAESSELLEIRE, E.; HEYNDRICKZ, M. Triagem longitudinal de resíduos de antibióticos, genes de resistência a antibióticos e bactérias zoonóticas em solos fertilizados com esterco de proco. **Ciência Ambiental e Pesquisa de Poluição**. v. 27 p. 28016–28029, 2020.

VERDI, C. M. et al. Detecção laboratorial dos mecanismos de resistência da *Klebsiella pneumoniae*: Uma Revisão. **Revista Saúde Integrada**, v. 9, n. 17, 2016.

VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos. Princípios do tratamento biológico de águas residuárias**. 3. ed. v. 1. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental - DESA; Universidade Federal de Minas Gerais, 2005, 452 p.

VON SPERLING, M. **Lagoas de estabilização. Princípios do tratamento biológico de águas residuárias**. 2. ed. v. 3. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental - DESA; Universidade Federal de Minas Gerais, 2002, 196 p.

VON SPERLING, M. **Lodos ativados. Princípios do tratamento biológico de águas residuárias**. 1. ed. v. 4. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental - DESA; Universidade Federal de Minas Gerais, 1997, 428 p.

WAN, M.; CHOU, C. Class 1 Integrons and the Antiseptic Resistance Gene (*qacEΔ1*) in Municipal and Swine Slaughterhouse Wastewater Treatment Plants and Wastewater – Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 12, n. 6, p.6249-6260, 2 jun. 2015.

WANG, L. et al. Distribution characteristics of antibiotic resistant bacteria and genes in fresh and composted manures of livestock farms. **Science of the Total Environment**, v. 695, p. 133781, 2019.

WANG, L. et al. Persistence of Resistance to Erythromycin and Tetracycline in Swine Manure During Simulated Composting and Lagoon Treatments. **Microbial Ecology**, v. 63, n. 1, p.32-40, 2012.

WANG, Y. et al. Distribution of the ermG gene among bacterial isolates from porcine intestinal contents. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 8, p. 4930-4934, 2005.

WEN, X. et al. Occurrence and contamination profiles of antibiotic resistance genes from swine manure to receiving environments in Guangdong Province southern China. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 173, p. 96-102, 2019.

WHELAN, J. A.; RUSSELL, N. B.; WHELAN, M. A. A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. **Journal of immunological methods**, v. 278, n. 1-2, p. 261-269, 2003.

WHO. World Health Organization. 10 facts on antimicrobial resistance. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/facts-in-pictures/detail/antimicrobial-resistance#> Acesso em: 22 mai. 2020.

WU, D. et al. Contamination profile of antibiotic resistance genes in ground water in comparison with surface water. **Science of the Total Environment**, v. 715, p. 136975, 2020.

WU, N.; ZHANG, W.; XIE, S.; ZENG, M.; LIU, H.; YANG, J.; LIU, X.; YANG, F. Increasing prevalence of antibiotic resistance genes in manured agricultural soils in northern China. **Frente. Environ. Sci. Eng.** v. 14. 2019.

XIA, X. et al. Association of colistin residues and manure treatment with the abundance of mcr-1 gene in swine feedlots. **Environment International**, v. 127, p. 361-370, 2019.

XU, L. et al. High-throughput profiling of antibiotic resistance genes in drinking water treatment plants and distribution systems. **Environmental Pollution**, v. 213, p. 119-126, 2016.

YU, Z. et al. Development and Application of Real-Time PCR Assays for Quantification of Genes Encoding Tetracycline Resistance. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 11, p. 6926–6933, nov. 2005

ZHANGa, J. et al. The role of substrate types and substrate microbial community on the fate of antibiotic resistance genes during anaerobic digestion. **Chemosphere**, v. 229, p. 461-470, 2019.

ZHANGb, J. et al. Which animal type contributes the most to the emission of antibiotic resistance genes in large-scale swine farms in China? **Science of the Total Environment**, v. 658, p. 152-159, 2019.

ZHANG, M. et al. Occurrence, fate and mass loadings of antibiotics in two swine wastewater treatment systems. **Science of the Total Environment**, v. 639, p.1421-1431, out. 2018.

ZHANG, Y. et al. Occurrence of antimicrobials and antimicrobial resistance genes in beef cattle storage ponds and swine treatment lagoons. **Science of the Total Environment**, v. 463-464, p.631-638, out. 2013.

ZHU, Y. et al. Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 9, p.3435-3440, 11 fev. 2013.

ZUGNO, A. L. A bomba de efluxo de sódio e potássio, mantém o equilíbrio das células com a manutenção das concentrações de íons, através da captura de íons de sódio do plasma e posterior transporte para o meio extra celular, assim como a captura de íons de potássio do meio extra celular e transporte para o meio intra celular. **Dissertação de pós graduação em ciências biológicas**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.