

UFRRJ

**INSTITUTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGRONOMIA - CIÊNCIA DO SOLO**

DISSERTAÇÃO

**Ocorrência de Genes de Resistência a Antimicrobianos em
Solos de Áreas Agrícolas e de Reserva Legal em Nova
Friburgo, RJ**

Camila Costa de Oliveira

2019



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
CIÊNCIA DO SOLO**

**OCORRÊNCIA DE GENES DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS
EM SOLOS DE ÁREAS AGRÍCOLAS E DE RESERVA LEGAL EM
NOVA FRIBURGO, RJ**

CAMILA COSTA DE OLIVEIRA

Sob a orientação da Professora
Irene da Silva Coelho

e Coorientação da Professora
Miliane Moreira Soares de Souza

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestra** no Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Ciência do Solo.

Seropédica, RJ
Agosto 2019

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

O48o Oliveira, Camila Costa de, 04/11/1988-
OCORRÊNCIA DE GENES DE RESISTÊNCIA A
ANTIMICROBIANOS EM SOLOS DE ÁREAS AGRÍCOLAS E DE
RESERVA LEGAL EM NOVA FRIBURGO, RJ / Camila Costa de
Oliveira. - Seropédica, 2019.
60 f.: il.

Orientadora: Irene da Silva Coelho.
Coorientadora: Miliane Moreira Soares de Souza.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em
Agronomia Ciência do Solo , 2019.

1. Adubação orgânica. 2. Avicultura. 3. Compostagem.
4. Colistina. 5. Metais pesados. I. Coelho, Irene da
Silva, 1979-, orient. II. Souza, Miliane Moreira
Soares de, 1970-, coorient. III Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em
Agronomia Ciência do Solo . IV. Título.

É permitida a cópia parcial ou total desta Dissertação, desde que seja citada a fonte.

**O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento
Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA - CIÊNCIA DO SOLO**

CAMILA COSTA DE OLIVEIRA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestra**, no Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de Concentração em Ciência do Solo.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 16/08/2019.

Irene da Silva Coelho. Dra. UFRRJ
(Orientadora)

Shana de Mattos de Oliveira Coelho. Dra. UFRRJ

Luc Felicianus Marie Rouws. Dr. Embrapa Agrobiologia

*Aos meus pais Elizabeth e José
Roberto e irmão Leonardo
Dedico*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela sua bondade e misericórdia infinita! E por sempre colocar pessoas iluminadas no meu caminho!

Aos meus pais, Elizabeth e José Roberto, e meu irmão, Leonardo pelo apoio, dedicação e confiança.

A minha orientadora Irene da Silva Coelho a qual se tornou minha referência de profissionalismo, generosidade e companheirismo.

Ao meu namorado Ademir Junior Fornaciari por me transmitir paz nas horas mais tribuladas.

As minhas amigas Mayara, Jéssica, Bianca, Stéfanny, Rafaela e Cíntia por sempre estarem presentes nas horas de alegria e de tristeza, de risadas e de choro, de trabalho e de festas. Por se tornarem minha família e meu porto seguro.

As minhas amigas Bárbara Mirelle e Bárbara Emanuelle, pelo apoio e disponibilidade de tempo fornecido através de conversas diárias pelo whatsapp.

A Tássia do Laboratório Multiusuário por toda a disponibilidade e solicitude.

A Maristela e a Patrícia pelo conhecimento compartilhado com muita paciência e tranquilidade.

Ao professor Huarrisson por me receber no seu laboratório e compartilhar seus conhecimentos e experiência.

Às professoras Shana de Mattos de Oliveira Coelho e Miliane Moreira Soares de Souza, por todo apoio e suporte para realização desse projeto.

As estagiárias da época Eliene e Karen por toda ajuda e dedicação.

Aos estagiários Mariana, José e Thereza pela proatividade e vontade de ajudar

A pós doutoranda Dayanne pelos conhecimentos e experiências de laboratório compartilhados.

Ao professor Fábio Côrrea pela ajuda, disponibilidade e atenção na análise estatística.

A Vanessa, Keila e Renata da secretaria pelos momentos de descontração com café.

As meninas da limpeza, em especial a Maria, pelo bom humor matinal e suporte para as funcionalidades do laboratório.

À toda a equipe do LABACVET e do Laboratório de Diversidade Microbiana do Departamento de Veterinária da UFRRJ.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pela parceria e disponibilidade do Laboratório.

À CAPES, ao CNPq e à FAPERJ, agências de fomento, pelo financiamento das pesquisas realizadas e em andamento.

A CAPES pela concessão da bolsa, recurso indispensável para que fosse possível minha dedicação exclusiva para realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

Camila Costa de Oliveira, filha de Elizabeth Costa de Oliveira e José Roberto Alves de Oliveira, nascida na cidade de Barra do Piraí, estado do Rio de Janeiro. Concluiu o ensino médio no Colégio Estadual presidente Rodrigues Alves no ano de 2006. Ingressou em 2010 no Curso de Agronomia na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Durante sua graduação sempre esteve envolvida com estágios e projetos de pesquisa. Foi bolsista de Iniciação Científica pela Embrapa Solos na área de Fertilidade dos Solos e pela Embrapa Agrobiologia na área de Ciclagem de Nutrientes. Participou do programa de Iniciação Científica voluntária na área de Agroecologia. Foi monitora na disciplina de Fitopatologia e Microbiologia Geral. Realizou mobilidade internacional pelo programa Ciência sem Fronteiras na Universidade de Bolonha-Itália, onde estagiou na área de Horticultura Urbana. Graduou-se em 2016. No mesmo ano participou do programa de Residência Agronômica da UFRRJ no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Em 2017 ingressou no Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Ciência do Solo na área de Biologia do Solo na UFRRJ. Neste mesmo ano iniciou o curso de Pós-Graduação *lato sensu* (Especialização) em Agroecologia pelo IFSudesteMG, concluindo em dezembro de 2018.

RESUMO GERAL

OLIVEIRA, Camila da Costa de. **Ocorrência de genes de resistência a antimicrobianos em solos de área agrícola e de reserva legal em Nova Friburgo, RJ.** 2019. 60f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

A resistência antimicrobiana tem emergido globalmente como uma das maiores ameaças para saúde pública, principalmente devido ao uso generalizado de antimicrobianos em humanos e na produção animal. O uso de esterco animal proporciona benefícios para o solo, além de ser uma alternativa para a disposição deste resíduo no ambiente, uma vez que a produção animal é uma atividade expressiva do agronegócio brasileiro. Porém, pode incrementar bactérias e genes de resistência a antimicrobianos e favorecer sua disseminação para bactérias patogênicas e comensais de humano e animais. Estratégias de manejo destes resíduos, como a compostagem, são importantes ferramentas para garantir seguridade de seu uso como fertilizante. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a presença de genes de resistência a antimicrobianos em solos de cultivos agrícolas tratados com cama de aviário fresca e de reserva legal próximas às áreas agrícolas em Nova Friburgo, RJ, a fim de elucidar o papel destes ambientes como reservatório e fonte de disseminação da resistência a antimicrobianos. Foi também avaliado, o efeito do processo de compostagem da cama de aviário na prevalência de genes de resistência. Após a extração do DNA total das amostras de solo, foi realizada a detecção dos genes de resistência a β -lactâmicos, colistina e sulfonamidas (*bla_{ampC}*, *mcr-1*, *sul1* e *sul2*, respectivamente) pela técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), seguida de uma análise de correlação da presença dos genes em relação aos atributos físico-químicos dos solos. A abundância relativa do gene *mcr-1* foi determinada pela técnica de qPCR (*Quantitative Polymerase Chain Reaction*). A presença dos genes de resistência também foi avaliada nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 dias de compostagem da cama de aviário. Houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre as proporções dos genes *sul1* e *sul2* nas áreas de cultivo agrícola e reserva legal, sendo prevalentes nas áreas de cultivo agrícola. O gene *mcr-1* foi detectado em todas as amostras de solo. O log da abundância relativa do gene *mcr-1* variou de -1,76 ($1,81 \times 10^{-2}$ cópias de *mcr-1/16S* rDNA) a -3,12 ($7,67 \times 10^{-4}$ cópias de *mcr-1/16S* rDNA). O gene *bla_{ampC}* não foi detectado após 30 dias de compostagem. Já os genes *sul1*, *sul2* e *mcr-1* foram detectados até 120 dias de compostagem. Esses resultados reforçam a importância de estudos que visem elucidar as vias de disseminação de genes de resistência a antimicrobianos nas áreas de produção agrícola, bem como os fatores que interferem na persistência e disseminação desses genes no ambiente, a fim de subsidiar a implementação de práticas de manejo que diminuam o risco de disseminação da resistência, que constitui uma ameaça potencial à saúde pública.

Palavras-chave: Adubação orgânica. Avicultura. Compostagem. Colistina. Metais pesados. Sulfonamida.

GENERAL ABSTRACT

OLIVEIRA, Camila da Costa de. **Occurrence of antimicrobials resistance genes in soils of agricultural production and legal reserve areas in Nova Friburgo, RJ.** 2019. 60 p. Dissertation (Master Science in Agronomy, Soil Science). Agronomy Institute, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019

Antimicrobial resistance has emerged globally as one of the greatest threats to public health, mainly due to the widespread use of antimicrobial in humans and animal production. The use of animal manure provides benefits to the soil, besides being an alternative to the discharge of this residue in the environment, since animal production is an expressive activity of the Brazilian agribusiness. However, it can increase bacteria and antimicrobial resistance genes and promote its dissemination to commensal and pathogenic bacteria of humans and animals. Strategies to manage these residues, such as composting, are important tools to ensure the safety of their use as organic fertilizer. In this context, the aim of this study was to evaluate the presence of antimicrobial resistance genes in soils of agricultural crops treated with fresh poultry manure and legal reserve areas near these production areas in Nova Friburgo, RJ, in order to clarify the role of these environments as a reservoir and source of dissemination of antimicrobial resistance. It was also evaluated the effect of the composting process of poultry manure on the prevalence of resistance genes. After the total DNA extraction of the soil samples, the detection of the resistance genes to β -lactamics, colistin and sulphonamides (*bla_{ampC}*, *mcr-1*, *sul1* and *sul2*, respectively) was performed using PCR (Polymerase Chain Reaction), followed by a correlation analysis of the presence of the genes in relation to the physical-chemical attributes of soils. The relative abundance of the *mcr-1* gene was determined by the qPCR (Quantitative Polymerase Chain Reaction) technique. The presence of resistance genes was also evaluated at 0, 30, 60, 90 and 120 days of poultry manure composting. There was a significant difference ($P < 0.05$) between the proportions of genes *sul1* and *sul2* in the areas of agricultural production and legal reserve, being predominant in the agricultural areas. The *mcr-1* gene was detected in all soil samples. The log of relative abundance of the *mcr-1* gene ranged from -1.76 (1.81×10^{-2} copies of *mcr-1*/16S rDNA) to -3.12 (7.67×10^{-4} copies of *mcr-1*/16S rDNA). The *bla_{ampC}* gene was not detected after 30 days of composting. Otherwise, the genes *sul1*, *sul2* and *mcr-1* were detected up to 120 days of composting. These results reinforce the importance of studies that aimed at elucidating the pathways for the dissemination of antimicrobial resistance genes in agricultural production areas, as well as the factors that interfere in the persistence and dissemination of these genes in the environment, in order to subsidize the implementation of management practices that reduce the risk of spreading resistance, which is a potential threat to public health.

Keywords: Aviculture. Colistin. Composting. Heavy metals. Organic fertilization. Sulfonamide

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA GERAL	2
2.1. Origem da Resistência aos Antimicrobianos.....	2
2.2 Utilização de Antimicrobianos na Produção Avícola.....	3
2.3 Utilização da Cama de Aviário como Adubo Orgânico e Incremento de Determinantes de Resistência a Antimicrobianos no Solo	4
2.4 Relação de Metais Pesados e Determinantes de Resistência a Antimicrobianos nos Solos	6
2.5 Efeito da Compostagem em Determinantes de Resistência a Antimicrobianos.....	7
3 CAPÍTULO I - DETECÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E CORRELAÇÃO COM METAIS PESADOS EM SOLOS AGRÍCOLA E DE RESERVA LEGAL EM NOVA FRIBURGO – RJ	9
3.1 RESUMO	10
3.2 ABSTRACT	11
3.3 INTRODUÇÃO	12
3.4 MATERIAL E MÉTODOS	13
3.4.1 Caracterização da Área de Estudo	13
3.4.2 Amostragem	13
3.4.3 Caracterização Física e Química e de Elementos-traço.....	13
3.4.4 Extração de DNA de Bactérias Utilizadas como Controle Positivo.....	14
3.4.5 Extração de DNA Total do Solo.....	16
3.4.6 Avaliação da Quantidade e Qualidade do DNA Total	16
3.4.7 Amplificação dos Genes de Resistência a Antimicrobianos	16
3.4.8 Análise Estatística	17
3.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
3.6. CONCLUSÕES	22
3.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
4. CAPÍTULO II - OCORRÊNCIA DO GENE DE RESISTÊNCIA A COLISTINA <i>mcr-1</i> EM SOLOS DE PRODUÇÃO AGRÍCOLA E DE RESERVA LEGAL	26
4.1 RESUMO	27
4.2 ABSTRACT	28
4.3 INTRODUCTION	29
4.4 MATERIALS AND METHODS	30
4.5 RESULTS	32
4.6 DISCUSSION	33
4.7 CONCLUSION	34
4.8 ACKNOWLEDGEMENTS	35
4.9 REFERENCES	36
5 CAPÍTULO III - PERSISTÊNCIA DE GENES DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DURANTE O PROCESSO DE COMPOSTAGEM DE CAMA DE AVIÁRIO	39
5.1 RESUMO	40
5.2 ABSTRACT	41
5.3 INTRODUÇÃO	42

5.4	MATERIAL E MÉTODOS	43
5.4.1	Caracterização da Compostagem e Amostragem	43
5.4.2	Extração de DNA de Bactérias Utilizadas como Controle positivo	43
5.4.3	Extração de DNA Diretamente do Composto	43
5.4.4	Avaliação da Quantidade e Qualidade do DNA Total	44
5.4.5	Amplificação dos Genes de Resistência a Antimicrobianos	44
5.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.6	CONCLUSÕES	48
5.7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
6	CONCLUSÕES GERAIS	52
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os solos representam um reservatório natural de bactérias resistentes a antimicrobianos carregando um conjunto diversificado de determinantes conhecidos e desconhecidos de resistência. Porém, atividades que liberam antimicrobianos e/ou bactérias resistentes, e/ou genes de resistência a antimicrobianos, como uso de resíduos animais como adubos orgânicos, podem modificar a diversidade bacteriana dos solos e os reservatórios ambientais de genes de resistência, o "resistoma". Além disso, podem favorecer a disseminação de determinantes de resistência a antimicrobianos no ambiente, uma vez que bactérias resistentes a antimicrobianos podem ser transferidas diretamente de animais para humanos e podem disseminar para solos, alimentos, águas subterrâneas através da aplicação do esterco nos campos agrícolas (HEUER et al., 2011).

A inter-relação entre humanos, animais e ambiente permite analisar a resistência antimicrobiana no conceito "Saúde Única" e possibilita considerar uma estratégia global para expansão da colaboração e comunicação interdisciplinar, direcionada para redução da pressão seletiva e interrupção dos ciclos de transmissão de determinantes de resistência (THAKUR & GRAY, 2019).

A resistência aos antimicrobianos é considerada por diversas autoridades internacionais como um dos principais desafios da saúde pública do nosso tempo (W.H.O, 2013). Como ação para enfrentar a iminente crise de resistência a antimicrobianos a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) elaborou o Plano de Ação da Vigilância Sanitária em Resistência aos Antimicrobianos que norteará a atuação da Agência frente a esse urgente desafio da saúde pública (BRASIL, 2017).

Assim, o objetivo do trabalho foi avaliar a presença de genes de resistência a antimicrobianos em solos de cultivos agrícolas e de reserva legal em Nova Friburgo-RJ, para elucidar o papel destes ambientes como fonte e reservatório de resistência a antimicrobianos, e ponderar os riscos para saúde pública, a fim de subsidiar propostas de vigilância ambiental para redução da disseminação da resistência a antimicrobianos.

Dessa forma, no Capítulo I foi abordado a presença de genes de resistência a antimicrobianos e a correlação com metais pesados; no Capítulo II a quantificação do gene de resistência à colistina *mcr-1*; e, no Capítulo III foi avaliada a persistência de genes de resistência a antimicrobianos durante o processo de compostagem da cama de aviário.

2. REVISÃO DE LITERATURA GERAL

2.1. Origem da Resistência aos Antimicrobianos

Microrganismos unicelulares foram as primeiras formas de vida presentes na Terra há cerca de 4 bilhões de anos; representam grande parte da diversidade genética na Terra, sendo estimado $4,6 \times 10^{30}$ células, e são responsáveis por transformações indispensáveis nos ciclos biogeoquímicos da biosfera (WHITMAN et al., 1998; DODD et al., 2017). Fatores bióticos e abióticos são determinantes para a densidade e atividade dos microrganismos no ambiente. Entre os fatores bióticos, a produção de antibióticos por algumas espécies de fungos e bactérias pode ser destacado como um importante elemento para as relações antagônicas, que têm efeitos deletérios sobre outros microrganismos (SIQUEIRA & FRANCO, 1988; BETIOL, 2005).

Presume-se que a resistência a antibióticos coevoluiu com o processo de biossíntese de antibióticos, uma vez que os organismos produtores precisam se equipar com genes de resistência para se protegerem (DAVIES & DAVIES, 2010). Desse modo, tais genes, têm circulado por um longo período em comunidades bacterianas, uma vez que é estimado que a origem da produção de antibióticos está entre 2 bilhões a 40 milhões de anos atrás, antes mesmo do início da utilização dos antimicrobianos pela humanidade (D’COSTA, 2011).

Uma vez que os solos têm uma alta abundância de microrganismos, é coerente considerá-lo como um grande reservatório de genes de resistência a antimicrobianos, denominado resistoma ambiental, que inclui aqueles presentes em bactérias patogênicas, comensais e de vida livre (WRIGHT, 2007; XIE et al., 2017). Há evidências de que genes de resistência a antimicrobianos em organismos patogênicos tenham sido originados do resistoma ambiental (WRIGHT, 2007).

A descoberta da penicilina, ou benzilpenicilina, em 1928 por Alexander Fleming (NICOLAOU & MONTAGNON, 2008) e do prontossil, precursor das sulfonamidas descoberta por Gerhard Domagk em 1935 proporcionou o início da era antibiótica que foi introduzida na medicina para tratamento de infecções bacterianas nos anos de 1940 (CHOPRA, 2002). Desde então vários antimicrobianos de origem natural e derivados semissintéticos foram descobertos e são utilizados para tratar doenças em humanos e animais, de forma profilática e como promotores de crescimento para o melhoramento da eficiência alimentar em animais (ADDISON, 1984).

Apesar das vantagens para a cadeia produtiva, é crescente a preocupação com o aumento de microrganismos multirresistentes, devido ao uso indiscriminado desses compostos em humanos e na produção animal. A resistência pode ser natural, a partir de características intrínsecas aos microrganismos, ou seja, que podem ser anteriores a uma exposição prévia ao antimicrobiano; ou mecanismos adquiridos através da mutação de genes ou aquisição desses genes de resistência por transmissão entre uma bactéria e outra (BAPTISTA, 2013). Entre os diversos tipos de mecanismos de resistência que as bactérias podem apresentar, destacam-se: a alteração da permeabilidade da membrana celular, seja por modificações estruturais ou bioquímicas como, por exemplo, o número e a seletividade de porinas, impedindo a penetração do antimicrobiano, que por sua vez, dependem, também, das características intrínsecas de suas moléculas para atravessar a membrana; a alteração do local de ação do antimicrobiano, ou seja, a modificação dos alvos, caracterizada pela diminuição ou ausência de compatibilidade entre o antimicrobiano e seu sítio de ligação na bactéria, podendo ocorrer por alterações na síntese DNA ou de proteínas e pela alteração da estrutura do peptidoglicano, que levam a inibição ou modificação das enzimas que participam na construção do mesmo; mecanismo enzimático que altera a estrutura química do antimicrobiano, através da capacidade de algumas bactérias produzirem enzimas que degradam ou inativam o antimicrobiano como, por exemplo, as β -lactamases que quebram o

anel β -lactâmico das penicilinas e cefalosporinas; bombas de efluxo, proteínas presentes nas membranas, capazes de realizar efluxo de pequenas moléculas para o meio extracelular, dentre outras (CAUMO et al., 2010; BAPTISTA, 2013).

A utilização de antimicrobianos em escala mundial cria uma forte pressão seletiva contribuindo para resistência em patógenos bacterianos oportunistas (SOBIA et al., 2011). O uso indiscriminado dessas moléculas, tanto na medicina humana quanto na produção animal, é a principal causa da seleção e disseminação de genes de resistência aos antimicrobianos nos tempos modernos (HU et al., 2017).

A transferência de genes de resistência entre procariotos pode ocorrer por três diferentes processos, sendo estes: conjugação, transformação ou transdução. O processo de transformação envolve a incorporação de fragmentos de DNA livres no meio e está intimamente relacionada a proteínas codificadas por genes presentes no cromossomo que são encontradas em bactérias naturalmente transformáveis. Em contraste, a conjugação é mediada por plasmídeos conjugativos ou elementos conjugativos integrados cromossomicamente, os quais incluem transposons conjugativos. Esses elementos genéticos codificam proteínas que facilitam a transferência de genes de uma célula doadora para outra célula receptora que não possua o plasmídeo ou o elemento conjugativo integrado. Já a transdução é um processo de transferência de DNA mediado por vírus que infectam bactérias chamados bacteriófagos ou fagos (FROST et al., 2005). A disseminação de genes de resistência pode ser intensificada via forças físicas como lixiviação de água, deposição de resíduos, transporte de animais, uso de produtos carreando genes de resistência a antimicrobianos (CYCON et al., 2019). Assim, a Organização Mundial de Saúde tem requerido ação urgente de todas as nações devido à grave ameaça à saúde pública representada pela disseminação da resistência antimicrobiana.

2.2 Utilização de Antimicrobianos na Produção Avícola

A produção animal consiste em uma atividade relevante do agronegócio brasileiro. O Brasil se destaca na produção avícola sendo o segundo maior produtor de carne de aviário do mundo atingindo a produção de 13,056 milhões de toneladas ficando atrás somente dos EUA com uma produção de 18,596 milhões de toneladas (ABPA, 2017). A avicultura é um dos setores da economia brasileira que mais se reformulou nos últimos anos, se expandindo de uma atividade tradicional e artesanal para o que pode ser considerado, um complexo industrial, devendo ser analisado por uma abordagem sistêmica do setor, que possui tecnologia, produção e produtividade de pontas (COSTA & SHIMA, 2007; RODRIGUES et al., 2014).

Há cerca de 60 anos, a utilização de aditivos zootécnicos em rações, foi introduzida na produção de aves como melhorador da eficiência na conversão alimentar e como promotor de crescimento (LIBBY & SCHAIBLE, 1955). A utilização de antimicrobianos na produção animal tem diferentes finalidades, tanto para proteger ou melhorar a saúde dos animais, quanto para estimular um crescimento mais rápido e maximizar os lucros. Estima-se que até 2030 o consumo deve aumentar em torno de 67% devido ao aumento do número de animais e a transição da produção extensiva para intensiva. Os países que mais consomem antimicrobianos na produção animal são a China, seguida dos Estados Unidos, Brasil, Alemanha e Índia (VAN BOECKEL et al., 2015). Embora não haja na literatura científica estatísticas oficiais sobre a quantidade de antimicrobianos utilizados e vendidos no Brasil, em um levantamento emitido pela Secretaria de Estado da Saúde do Paraná, pelo Programa Estadual de Controle de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem animal (PAMvet –PR), no ano de 2004, constatou-se que os princípios ativos mais utilizados com a finalidade de prevenção na fase final do desenvolvimento do aviário de corte foram: enrofloxacina, avilamicina, lasalocida, ciprofloxacina, fosfomicina, clortetraciclina,

sulfatiazina+trimetropina, ácido 3-nitro, virginiamicina, lincomicina, norfloxacina e tilosina. E como terapêutico: norfloxacina, enrofloxacina, monensina, sulfadiazina+trimetropin, avilamicina, amoxicilina, clortetraciclina, sulfacloerperidazina+trimetropina, maduramicina, nircabazina, neomicina, tiamulina e tilmicosina (SESA, 2005; LEAL et al., 2012).

O uso mais controverso dos antimicrobianos é sua utilização como aditivo zootécnico para promoção de crescimento. Aditivo zootécnico é definido como substância, micro-organismo ou produto formulado, adicionado intencionalmente aos produtos, que não é utilizado normalmente como ingrediente, tenha ou não valor nutritivo e que melhore as características dos produtos destinados à alimentação animal dos produtos animais, melhore o desempenho dos animais sadios ou atenda às necessidades nutricionais (BRASIL, 2015). Estas substâncias ocasionam a redução da flora intestinal natural, as quais competem com o hospedeiro por nutrientes, e bactérias intestinais prejudiciais que podem causar doenças interferindo na performance. (WEGENER, et al., 1999). E, tal como acontece com qualquer uso de antimicrobiano, isso aumenta as chances de seleção e disseminação de bactérias resistentes, reforçando a preocupação a partir de uma perspectiva de saúde humana.

De fato, muitos países com destaque aos que compõem a União Europeia já proibiram o uso de antimicrobianos como promotores de crescimento em 2006 (O'NEILL, 2016). No Brasil, a proibição de alguns aditivos foi estabelecida em Instrução Normativa 26/2009 do MAPA, de julho de 2009 no art. 18 “Os anfenicóis, tetraciclina, beta lactâmicos (benzilpenicilâmicos e cefalosporinas), quinolonas e sulfonamidas sistêmicas são de uso exclusivo em produtos antimicrobianos de uso veterinário, sendo vedada a sua utilização como aditivos zootécnicos melhoradores de desempenho ou como conservantes de alimentos para animais” (BRASIL, 2009). Em 2016, houve a proibição da adição do sulfato de colistina na alimentação animal publicado em Diário Oficial pela IN 45/2016 (BRASIL, 2016a). De acordo com o Ministério de Agricultura, Abastecimento e Pecuária, a proibição dessa substância na alimentação animal é baseada em recomendações de Órgão Internacionais, como a Organização Mundial da Saúde (OMS), devido ao possível impacto na saúde humana, uma vez que a colistina é o último recurso no tratamento de infecções em humanos causadas por bactérias que não respondem a outros antimicrobianos, e por isso, a preocupação sobre o surgimento e disseminação da resistência a este antimicrobiano (BRASIL, 2016b). Recentemente o uso dos antimicrobianos tilosina, lincomicina, virginiamicina, bacitracina e tiamulina como aditivos melhoradores de desempenho em animais de produção foi proibido pela Portaria 171/2018 (BRASIL, 2018).

2.3 Utilização da Cama de Aviário como Adubo Orgânico e Incremento de Determinantes de Resistência a Antimicrobianos no Solo

O aumento da produção animal tem por consequência a geração de grandes quantidades de resíduos com lenta degradabilidade em alguns casos, e, em outros, da geração de subprodutos que podem ser tóxicos e cumulativos tendo impacto ambiental negativo (SCHNEIDER et al., 2012). Um dos maiores problemas é a acumulação em grande quantidade, especialmente de esterco e cama de aviário oriunda da produção animal intensiva. Cama de aviário refere-se ao material usado para forrar o chão do local de produção das aves que durante o ciclo de produção ocorre a mistura do material com estrume das aves, penas e alimento (EDWARDS & DANIEL, 1992). O material é diversificado podendo ser composto de subprodutos agroindustriais, restos de culturas e fenos de gramíneas, maravalha, casca de amendoim, casca de arroz, casca de café entre outros (SANTOS et al., 2005).

O Brasil enquanto um dos maiores produtores de carne de aviário mundial tem estimativa de produção de volume anual de cama de aviário em torno de 8-10 milhões de toneladas ano⁻¹ (DALÓLIO et al., 2017). Dessa forma, é necessária a adoção de tecnologias e

boas práticas que conciliem a produtividade agropecuária com redução dos impactos ambientais promovendo um desenvolvimento ecologicamente sustentável para atender as exigências dadas pelo Código Florestal de Lei nº 12.651/2012 (BRASIL, 2012) e a Política Nacional de Recursos Hídricos da Lei nº 9.433/1997 (BRASIL, 1997).

Resíduos da produção animal podem ser utilizados para geração de energia como biogás ou serem aplicados no solo como adubo (SCHNEIDER et al., 2012). Atualmente, o principal destino da cama de aviário é sua utilização como adubo orgânico. O aproveitamento destes resíduos na agricultura é previsto pela Lei nº 8.171/1991 que dispõe sobre a política agrícola onde delibera que para proteção ao meio ambiente e conservação dos recursos naturais. O poder público deverá coordenar programas de estímulo e incentivo à preservação das nascentes dos cursos d'água e do meio ambiente, bem como o aproveitamento de dejetos animais para a conversão em fertilizantes (BRASIL, 1991). Em adição, no sistema de produção orgânico, é preconizado a reciclagem de resíduos de origem orgânica reduzindo ao mínimo o emprego de recursos não-renováveis (Artigo 1º, parágrafo 1º, VI) conforme a Lei Federal nº 10.831/2003 (BRASIL, 2003). Entretanto, segundo a Instrução Normativa nº 64/2008 o uso de excrementos animais é permitido, desde que compostados e bioestabilizados (BRASIL, 2003).

Quando utilizada de forma correta, a cama de aviário aumenta o potencial da produção agrícola devido ao aporte nutricional de nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), elementos traços fornecido às plantas e também promove melhoria nos atributos do solo devido à adição de matéria orgânica e enriquecimento microbiológico no solo (BLUM et al., 2003; BOLAN et al., 2010). A adubação com cama de aviário pode ser utilizada nas culturas produtoras de grãos, horticultura, fruticultura, pastagem, reflorestamento e recuperação de áreas degradadas (EMBRAPA, 2011).

Porém, grande proporção dos antimicrobianos administrados na criação de animais é usualmente excretada pelos mesmos como substância inalterada ou como metabólitos que ainda podem estar ativos contaminando o solo (SARMAH et al., 2006). Em média, 80% dos antimicrobianos administrados são liberados em fezes e urina. Em estudo realizado por Heuer et al. (2007) com amostra de esterco durante 10 dias após aplicação de sulfadiazina com C₁₄ marcado, foi observado que em 4 dias consecutivos, mais de 96% do fármaco foi excretado como composto original ou metabólitos. Tem sido demonstrado que o esterco animal contém altos níveis de patógenos, antimicrobianos e genes de resistência a antimicrobianos, e após repetidas aplicações do esterco, esses contaminantes podem persistir e acumular no solo (ZHOU et al., 2017; JI et al., 2012; ZHU et al., 2013; FANG et al., 2014). A sulfadiazina pode selecionar populações resistentes e estimular a disseminação horizontal de genes de resistência ao antimicrobiano. Nas bactérias a sulfadiazina inibe a síntese da enzima dihidropteroato sintase que é crucial na biossíntese do ácido fólico por competir com o substrato natural ácido benzóico p-amino. Os genes *sul1*, *sul2* e *sul3* codificam a enzima dihidropteroato sintase com baixa afinidade para sulfonamidas conferindo resistência à bactéria para esta classe (HEUER et al., 2011; JECHALKE et al., 2013). Adição prolongada de esterco aumentou o nível basal de genes de resistência a betalactâmicos e *int1* em relação à adução com fertilizantes inorgânicos (GRAHAM et al., 2016). Laube e colaboradores (2013) demonstraram que a presença de *Escherichia coli*, produtoras de enzimas β-lactamases do tipo AmpC/ESBL (β-lactamases de Espectro Extendido) aumentam durante o período de engorda dos frangos e prevalecem no ambiente agrícola. Esta enzima inativa os antimicrobianos da classe dos betalactâmicos devido à hidrólise dos anéis β-lactâmicos constituintes (DIERIKX et al., 2010). O gene *mcr-1*, que confere resistência ao antimicrobiano colistina mediado por plasmídeo, já foi isolado de *E. coli* produtoras de ESBL em amostras de solo agrícola na China (ZHENG et al., 2017). Este gene codifica a enzima MCR-1 que possui a sequência de aminoácidos estreitamente próxima com a enzima

fosfoetanolamina transferase que promove a adição de fosfoetanoamina ao lipídeo A resultando na redução da afinidade à colistina e conseqüentemente à resistência ao antimicrobiano desta classe (LIU et al., 2015). A colistina é um antimicrobiano de última escolha para tratamento de infecções causadas por bactérias multirresistentes em humanos. Os autores ressaltam a importância de mais estudos para investigar a influência da aplicação de esterco animal na transmissão de bactérias produtoras de *mcr-1* (ZHENG et al., 2017).

Subprodutos da produção animal são fontes de resíduos de antimicrobianos, bactérias resistentes a antimicrobianos e genes de resistência a antimicrobianos (HEUER et al., 2011). Com isso, há uma preocupação, a nível mundial, sobre o uso de esterco como fertilizante devido a sua possível contribuição no aumento da concentração de genes resistência aos antimicrobianos no solo e o risco potencial para saúde humana.

A presença desses contaminantes no ambiente pode causar distúrbios metabólicos afetando vários processos bioquímicos na população microbiana que podem ser relevantes para sua atividade mesmo em concentração sub-inibitória (FAJARDO & MARTINEZ, 2008). Estudo recente realizado por Wepking e colaboradores (2017) encontraram evidências de que a adição de esterco proveniente de gado tratado com antibióticos gera mudanças na composição da comunidade microbiana do solo e funções que esses microrganismos desempenham no ecossistema. Neste estudo, solos que foram expostos a esterco proveniente de gados tratados com cefapirina benzatina, antimicrobiano do grupo das cefalosporinas da primeira geração, apresentaram uma maior abundância média de 421% e 3.283% dos genes de resistência a β -lactâmicos (*bla_{ampC}*) e tetraciclina (*tetO*), respectivamente, quando comparado com solo de referência com mínimo de contaminação. A atividade microbiana, principalmente em alguns processos no ciclo do nitrogênio, foi reduzida pelo uso de esterco contendo sulfadiazina (KOTZERKE et al., 2008).

Como há evidências de que o resistoma ambiental tem o potencial de ser parcialmente transferido para agentes patogênicos, a contaminação do meio ambiente por antimicrobianos e genes de resistência a antimicrobianos provavelmente aumenta a chance de aquisição de resistência pelas bactérias comensais e patógenos humanos (HOELZER et al., 2017; WELLINGTON et al., 2013). Dessa forma, estratégias para reduzir a resistência antimicrobiana em animais e humanos devem incluir a prevenção do fluxo de genes de resistência antimicrobianos de/e para reservatórios ambientais (PRUDEN et al., 2013; THANNER et al., 2016). Portanto, é importante identificar genes de resistência que são introduzidos e os ocorrem naturalmente, que podem ser selecionados pelas aplicações de esterco provenientes de produção animal (XIE et al., 2017).

2.4 Relação de Metais Pesados e Determinantes de Resistência a Antimicrobianos nos Solos

Metais pesados ocorrem de forma onipresente no ambiente e, e em certos casos em concentrações elevadas, devido a atividades antrópicas. É comum, haver impurezas como cádmio (Cd) e chumbo (Pb) em fertilizantes utilizados como de nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K) para o solo. Em geral, os metais pesados, são usados na agropecuária moderna, desde a pecuária até a horticultura, e principalmente em suas formas inorgânicas, para diversos fins. Alguns são adicionados à ração animal, como cobre (Cu) e zinco (Zn) para auxiliar na função hormonal, reprodução normal, síntese de vitaminas, formação de enzimas e manutenção do sistema imunológico, exercendo as mesmas funções dos antimicrobianos, ou seja, alteração da microbiota intestinal e a supressão de patógenos. Porém, como são pouco absorvidos pelo organismo animal são facilmente excretados, persistindo e se acumulando no solo depois de repetidas aplicações de esterco (JI et al., 2012; ZHANG et al., 2017).

Em consequência, microrganismos que são expostos a contaminação ambiental de antimicrobianos e metais pesados estão sujeitas a co-seleção da resistência a antimicrobianos e metais pesados que pode ocorrer por mecanismos de co-resistência e resistência cruzada (IMRAM et al., 2019). No mecanismo de co-resistência, dois ou mais genes que conferem resistência a diferentes compostos estão presentes no mesmo elemento genético móvel (plasmídeo, transposons). Quando um único mecanismo é responsável pela resistência a diferentes compostos, como por exemplo antimicrobianos e metais pesados tem-se a resistência cruzada (CHAPMAM, 2003; PAL et al., 2017). A co-existência de ambos os tipos de determinantes no mesmo elemento genético permite a seleção da resistência a antimicrobianos em ambientes contaminados com metal pesado, mesmo sem a presença de antimicrobianos (ALONSO et al., 2001).

Considerando que os níveis antropogênicos de metais pesados são maiores em várias ordens de magnitude do que os níveis de antimicrobianos, além do fato dos metais pesados não serem sujeitos a degradação, estes têm potencial para representar uma pressão de seleção a longo prazo para evolução de resistência aos antimicrobianos em microrganismos (STEPANAUSKAS et al., 2005). Isto pode favorecer maior persistência dos genes no ambiente aumentando os riscos de uma maior disseminação. Dados apresentados por Ji e colaboradores (2012) revelou um aumento significativo na detecção de genes de resistência a antimicrobianos específicos devido a presença de metal pesado ocorrendo não somente na manutenção, mas na proliferação da abundância dos genes em bactérias do solo.

Genes que codificam para resistência às betalactamases (*bla_{CTX-M}*) e operons responsáveis para resistência ao cobre (Cu) e prata (Ag) tem sido encontrados ligados em plasmídeos em *E. coli* (FANG et al., 2016). Bombas de efluxo para metais pesados *CzcCBA*, juntamente com genes reguladores *czcR-czcS*, também conferem resistência para carbapenemos em *P. aeruginosa* (PERRON et al., 2004). Além disso, pesquisadores têm relatado que a ocorrência simultânea de metais pesados com outros poluentes como solventes, óleo, pesticidas, microplásticos em ambientes proporciona pressão de seleção em bactérias patogênicas que resultam no favorecimento de evolução de resistência a antimicrobianos através do mecanismo de co-seleção (YE et al., 2017).

Durante o intemperismo dos microplásticos, muitos aditivos químicos como metal, metaloides, compostos aromáticos, plastificantes, antioxidantes, estabilizadores de calor, agente deslizante são liberados ou lixiviados proporcionando um ambiente perfeito para co-seleção de resistência a antimicrobianos mediada por compostos químicos em bactérias patogênicas (HAHLADAKIS et al., 2018). Foi demonstrado que bactérias com potencial patogenicidade para humanos como *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp., *Proteus* spp., *Acinetobacter* spp., *Listeria* spp., isolados de 22 amostras de frutos do mar de 16 espécies de peixe e frutos do mar diferentes apresentaram múltipla resistência a antimicrobianos, biocidas, conservantes e metais através do mecanismo de co-seleção (ROMERO et al., 2017).

A prática da adição de metais como cobre, zinco, roxarsone (composto arsênico) como promotor de crescimento, além do uso de antimicrobianos com a mesma finalidade, em produção de aves e suínos tem favorecido o desenvolvimento de determinantes resistentes para ambos os compostos em bactérias nativas. Foi reportado que baixa concentração de metais pesados e antimicrobianos foram responsáveis pela manutenção de plasmídeos que codificam beta-lactamases de amplo espectro (ESBL) em *K. pneumoniae* e *E. coli* responsáveis por surto hospitalar (GULLBERG et al., 2014).

2.5 Efeito da Compostagem em Determinantes de Resistência a Antimicrobianos

A compostagem, ou a decomposição biológica controlada, consiste num processo aeróbico pelo qual diversos grupos de microrganismos decompõem materiais orgânicos de

origem animal e vegetal produzindo produtos orgânicos e inorgânicos estáveis (RYNK, 1992). Durante o processo de compostagem os compostos são transformados através de sucessivas atividades de diferentes microrganismos em matéria orgânica estável (PARE et al., 1998).

As bactérias mesofílicas, actinobactérias, fungos e protozoários são os primeiros microrganismos a colonizarem o composto, com crescimento ótimo entre 10 e 45°C. Durante esta etapa inicial ocorre a acidificação do composto causada pela formação de ácidos graxos voláteis. Devido à ação oxidativa dos microrganismos, a temperatura aumenta atingindo valores de 60°C propiciando o crescimento de microrganismos termofílicos (HELLMAN et al., 1997). Dessa forma, a segunda fase do processo de compostagem é chamada de fase termofílica onde maior parte da matéria orgânica é degradada e conseqüentemente maior parte do oxigênio é consumido (HELLMAN et al., 1997). Após a fase termofílica, a qual corresponde ao pico de degradação de matéria orgânica fresca, a atividade microbiana diminui assim como a temperatura, dando início a fase de maturação do composto produzindo substâncias semelhantes a húmus (COOPERBAND, 2000). Além de microrganismos diversificados que atuam na degradação da matéria orgânica, fatores como arejamento, temperatura, umidade, relação C/N e granulometria são os principais parâmetros abióticos que afetam o processo (DIAZ et al., 1993).

A adoção do método de compostagem proporciona benefícios como reciclagem de nutrientes, estabilização de nitrogênio amoniacal por incorporação na biomassa microbiana, eliminação de microrganismos patogênicos e sementes de plantas indesejáveis através da elevação de temperatura, redução de massa e volume devido à perda de água e carbono e redução na emissão de odores (GIBBS et al., 2002). Além disso, tem sido relatado que os resíduos de antimicrobianos e genes de resistência podem reduzir significativamente durante a compostagem de compostos provenientes da produção animal (GOU et al., 2018; SELVAM et al., 2012; DOLLIVER et al., 2008).

Assim, a adoção da compostagem pode ser um manejo eficiente, simples econômico no tratamento do esterco para prevenir a liberação de antimicrobianos, bactérias e genes de resistência do esterco para solos. Entretanto, a remoção eficiente de resíduos de antimicrobianos, e particularmente genes de resistência a antimicrobianos, em alguns processos de compostagem são ainda baixas e requer melhorias (ZHU et al., 2013). O processo foi eficiente na diminuição da abundância dos genes *tetQ*, *tetM* e *tetW* em esterco de gado, todavia aumentou a abundância de *tetC*, *tetX*, *sul1* e *sul2* (QIAN et al., 2016). Su e colaboradores (2015) encontraram que a abundância total de genes de resistência presentes no lodo de águas residuais aumentou após a compostagem. Um aumento de genes de resistência a tetraciclina (*tet*) foi observado em solos aráveis que foram sujeitos a aplicação de esterco suíno compostado e fresco em um período de seis anos (PENG et al., 2015). Isso ressalta os efeitos variados da compostagem nos diferentes contaminantes presentes no substrato sendo dependentes das condições e materiais utilizados no processo, reforçando a importância de estudos que avaliem o potencial da aplicação de compostagem não só na bioestabilização de compostos e eliminação de microrganismos patogênicos, mas na eliminação de determinantes de resistência a antimicrobianos.

3 CAPÍTULO I

DETECÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E CORRELAÇÃO COM METAIS PESADOS EM SOLOS AGRÍCOLA E DE RESERVA LEGAL EM NOVA FRIBURGO – RJ

3.1 RESUMO

A complementação da fertilização do solo com resíduos animais é comum e indicada na agricultura. Esta prática incrementa matéria orgânica no solo e melhora suas características físico-químicas e biológicas. Entretanto, os resíduos provenientes da produção animal podem ser fontes de antimicrobianos, microrganismos resistentes e genes de resistência a antimicrobianos e não há informação disponível sobre o impacto de seu uso em áreas agrícolas no Brasil e suas respectivas áreas de reserva legal. Neste contexto, esse trabalho teve como objetivo avaliar a presença de genes de resistência a antimicrobianos em solos agrícolas que recebem cama de aviário fresca e de reserva legal em Nova Friburgo, RJ. Após a extração de DNA total dos solos, foi realizada a detecção do gene 16S rDNA e dos genes que codificam resistência aos antimicrobianos colistina (*mcr-1*) e sulfonamida (*sul1* e *sul2*) pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR). A detecção dos genes foi correlacionada com as características físico-químicas dos solos. O gene *mcr-1* foi detectado em todas as 20 amostras. Já os genes *sul1* e *sul2* foram prevalentes na área de cultivo agrícola, que se diferenciou da área de reserva legal pela maior quantidade dos elementos P, K, Co, Pb e Mn. Os resultados apresentados corroboram com a hipótese de que o uso de esterco animal como fertilizante é uma fonte de genes de resistência a antimicrobianos no ambiente, e reforçam a importância do desenvolvimento de pesquisas que elucidem os fatores que interferem na persistência e disseminação desses genes no ambiente, para que sejam estabelecidas medidas de controle de qualidade de resíduos animais utilizados na agricultura, levando em conta a resistência a antimicrobianos.

Palavras-chave: Cama de aviário. Colistina. *mcr-1*. Saúde única. *sul1*. *sul2*. Sulfonamida.

3.2 ABSTRACT

The increase of soil fertilization with animal residues is common and indicated in agriculture. This practice increases organic matter in the soil and improves its physicochemical and biological characteristics. However, residues from animal production may be sources of antimicrobials, resistant microorganisms and antimicrobial resistance genes and there is no information available on the impact of its use on agricultural areas in Brazil and its respective legal reserve areas. In this context, this study aimed to evaluate the presence of antimicrobial resistance genes in agricultural soils that received fresh poultry manure and legal reserves in Nova Friburgo, RJ. After the total soil DNA extraction, the 16S rDNA gene and the genes coding antimicrobial resistance to colistin (*mcr-1*) and sulfonamide (*sul1* and *sul2*) were detected using the polymerase chain reaction (PCR) technique. The detection of the genes was correlated with the physicochemical characteristics of the soils. The *mcr-1* gene was detected in all 20 samples. The *sul1* and *sul2* genes were predominant in the agricultural farming area, which differed from the legal reserve area by the greater quantity of P, K, Co, Pb and Mn. The results corroborate to the hypothesis that the use of animal manure as fertilizer is a source of antimicrobial resistance genes in the environment, and reinforce the importance of the development of scientific research that elucidate the factors that interfere in the persistence and dissemination of these genes in the environment, so quality control methods can be developed to animal waste used in agriculture, taking into account resistance to antimicrobials.

Keywords: Poultry manure. Colistin. *mcr-1*. One health. *sul1*. *sul2*. Sulfonamide

3.3 INTRODUÇÃO

A produção animal é um dos principais pilares do agronegócio brasileiro, com destaque para produção avícola que em 2017 posicionou o Brasil como segundo maior produtor de carne de aviário do mundo (ABPA, 2017). Essa alta produção gera uma grande quantidade de resíduo, e a principal destinação é sua utilização na agricultura como adubo orgânico, que melhora as características físico-químicas e o aporte nutricional do solo (DALOLIO et al., 2017). Entretanto, na produção avícola é comum a utilização de antimicrobianos de forma profilática, terapêutica e como aditivo zootécnico, além da suplementação da ração com metais pesados para promoção de crescimento e controle microbiano. Esses produtos exercem pressão seletiva na microbiota intestinal do animal favorecendo a co-seleção de cepas resistentes a antimicrobianos e metais pesados, além de grandes quantidades serem excretadas via fezes e urina. Isso faz com que resíduos provenientes da produção avícola sejam fontes de antimicrobianos, metais pesados e determinantes de resistência a ambos (HEUER & SMALLA, 2007).

A co-seleção da resistência a antimicrobianos e metais pesados pode ocorrer por mecanismos de co-resistência ou resistência cruzada. A co-resistência é caracterizada pela presença de genes que determinam resistência a antimicrobianos e metais pesados no mesmo elemento genético móvel como plasmídeo, transposon ou integron. A resistência cruzada é quando um único mecanismo confere resistência a antimicrobianos e metais pesados (CHAPMAM, 2003). Lu e colaboradores (2015) para determinar a prevalência e examinar o destino de genes de resistência a sulfonamidas em dois estuários observaram que os metais pesados como Ni, Cu, Zn e Pb correlacionaram significativamente com a abundância dos genes. O gene *mcr-1* que confere resistência à colistina, antibiótico utilizado na medicina humana como última escolha para tratamento de bactérias gram-negativas multirresistentes, foi encontrado em isolados de *Salmonella* tolerantes ao cobre (CAMPOS et al., 2016).

Uma vez que o solo é reconhecido como um reservatório de bactérias e genes de resistência a antimicrobianos, e o uso de resíduos da produção animal que contém antimicrobianos, genes de resistência a antimicrobianos e metais pesados podem incrementar este reservatório e favorecer a disseminação da resistência.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a presença de genes de resistência a antimicrobianos em solos agrícolas que recebem cama de aviário fresca e de Reserva Legal em Nova Friburgo, Rio de Janeiro, e correlacionar a presença destes genes com a presença de metal pesado nos solos.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

A coleta das amostras de solos e a caracterização físico-química e de elementos-traço foram realizadas pela discente de Doutorado do Curso de Pós-graduação em Agronomia – Ciências dos Solos, orientada do prof. Nelson Moura Brasil do Amaral Sobrinho.

3.4.1 Caracterização da Área de Estudo

A área de estudo compreende a microbacia hidrográfica de Barracão dos Mendes, situada na cidade de Nova Friburgo, região Serrana do Estado do Rio de Janeiro, Brasil (Figura 1). Está situada em Latitude 22°16'55" e Longitude 42°31'152", altitude de 846 metros, e é limítrofe aos municípios de Cachoeiras de Macacu, Silva Jardim, Casimiro de Abreu, Macaé, Trajano de Moraes, Bom Jardim, Duas Barras, Sumidouro e Teresópolis. O clima é tropical de altitude, com temperatura amena no verão e fria no inverno (PMNF, 2015). Os solos são pouco profundos e lixiviados, sendo identificados Cambissolos e Latossolos Vermelho-Amarelos, na vertente oriental de montanhas, há solos menos lixiviados como Argissolos Vermelho-Amarelos e Argissolos Vermelhos Eutróficos (DANTAS et al., 2015).

3.4.2 Amostragem

A coleta foi realizada em julho de 2016 em 11 propriedades agrícolas, produtoras de hortaliças. Em nove destas propriedades foram realizadas coletas de solo em área de cultivo (P) em que cama de aviário fresca foi usada como fertilizante orgânico e em áreas de reserva legal, com remanescente de mata (M) (P1, M1, P4, M4, P6, M6, P8, M8, P9, M9, P11, M11, P14, M14, P15, M15, P16, M16). Na propriedade 3 foi realizada a coleta apenas de solo de área de cultivo de hortaliças (P3) e a amostra M12 é a área com mata que melhor representa a microbacia hidrográfica. Estas áreas amostrais foram selecionadas por declividade e representatividade, totalizando 10 pontos em áreas de cultivo de olerícolas e 10 pontos em áreas de mata próximas a essas propriedades. Desta forma, amostras com mesma numeração representam a mesma propriedade com manejos distintos de solo. Os pontos amostrados foram georreferenciados com a utilização de um GPS topográfico, marca Garmin, modelo Montana TM 650.

3.4.3 Caracterização Física e Química e de Elementos-traço

Para aferição dos atributos químicos e físicos dos solos, as amostras de terra foram processadas (secas ao ar e passadas por peneira com malha de 2,0 mm de diâmetro) e foi efetuada as análises químicas para determinação dos teores de matéria orgânica (MO), pH (H₂O), P, K, Ca, Mg e Al trocáveis, H+Al, soma de bases, areia, silte e argila, seguindo metodologia da Embrapa (DONAGEMA et al. 2011) (Tabela 1).

Para análise dos elementos traço Zn, Mn, Cd, Pb, Ni e Cu, as amostras de solo foram secas ao ar em casa de vegetação do Departamento de Solos da UFRRJ. Posteriormente, as amostras de solo foram desmanteladas em argamassa de ágata e peneiradas em peneira de aço inoxidável de malha de 2 mm. Os teores pseudototais dos elementos foram determinados usando o método de digestão EPA 3051A (USEPA, 2007) (Tabela 1).

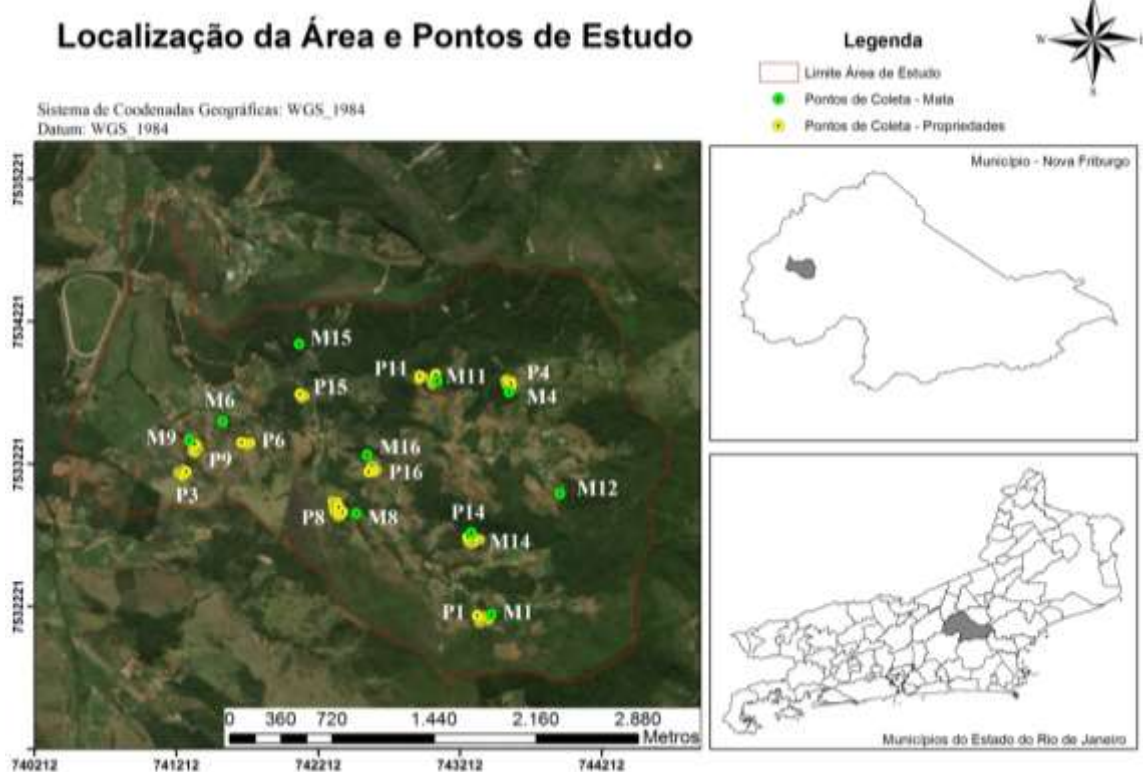


Figura 1. Localização da área de coleta das amostras em Nova Friburgo-RJ, microbacia hidrográfica (delimitada pela linha vermelha). Os pontos verdes correspondem às 10 áreas contendo mata (M) e os pontos amarelos correspondem às 10 áreas cultivadas com hortaliça (P). Fonte: Guimarães (2017).

3.4.4 Extração de DNA de Bactérias Utilizadas como Controle Positivo

O controle positivo das reações de PCR foi obtido a partir da extração de DNA de cepas de *Escherichia coli* resistentes a sulfonamida e colistina. As cepas de *E. coli* foram isoladas de aves provenientes de granjas avícolas do estado do Rio de Janeiro, pelo, então doutorando, Ramon Loureiro Pimenta, do curso de Pós-graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária, sob a orientação da professora Miliane Moreira Soares de Souza.

Para extração de DNA, cinco isolados em duplicatas foram cultivados em 5 mL do meio de cultura líquido BHI (*Brain Heart Infusion*) à temperatura ambiente a 150 RPM. Após 16 horas, 1,5 mL de cada cultura foram transferidos para microtubos e centrifugados a 16.873 g por 1 min, para sedimentar as células (HE, 2011). Esse processo foi repetido por três vezes para concentrar o maior número de células possível. Após o descarte do sobrenadante, o *pellet* foi ressuspensionado no vortex em 600 µL de tampão de lise (TE buffer 1X, SDS 10% e proteinase K 20 mg mL⁻¹) e incubado a 37 °C por 1 h (HE, 2011). Após esfriar a temperatura ambiente, foram adicionados 600 µL de clorofórmio álcool isoamílico (24:1), e em seguida, foram homogeneizadas por 2 min, e centrifugadas a 14.549 g por 10 min. Aproximadamente 600 µL do sobrenadante de cada amostra foram transferidos para um novo microtubo para adição de igual volume de clorofórmio álcool isoamílico (24:1). Em seguida as amostras foram centrifugadas a 14.549 g por 10 min e aproximadamente 400 µL do sobrenadante foram transferidos para um novo microtubo com o mesmo volume de isopropanol gelado. As amostras foram incubadas a -20°C, para precipitação do DNA, e após 12 horas foram centrifugadas a 14.549 g por 30 min. O *pellet* foi lavado com 200 µL de etanol 70% por duas vezes e após secar a temperatura ambiente, foi resuspensionado em 30 µL de água ultrapura.

Tabela 1. Atributos físico-químicos dos solos de áreas com cultivo de hortaliças adubadas com cama de aviário e de áreas de reserva legal da bacia hidrográfica de Barracão dos Mendes, em Nova Friburgo-RJ

Amostras	CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS (mg kg ⁻¹)										TEORES DE METAIS PESADOS (mg kg ⁻¹)								
	pH H ₂ O	P	K	Ca	Mg	Al ³⁺	H+Al	Al T	Fe T	MO	Arg	Cu	Ni	Cr	Co	Pb	Cd	Zn	Mn
Propriedades agrícolas com cultivo de hortaliças																			
P1	5,24	128,27	372,53	5,28	11,22	0,24	5,40	43060,7	32403,0	29,57	381,20	20,8	8,1	8,6	11,0	17,2	0,7	81,3	316,3
P3	5,62	214,22	275,44	3,42	1,09	0,03	1,96	16417,3	19852,3	23,01	184,00	15,1	9,8	14,9	12,0	18,4	0,5	63,5	248,7
P4	5,18	88,22	202,89	3,18	0,68	0,57	8,28	32369,4	66182,3	44,38	432,67	32,7	16,9	29,9	19,9	31,8	0,6	65,3	182,7
P6	5,29	80,13	288,88	3,64	1,00	0,21	6,00	53274	63806,2	38,60	422,88	10,7	12,6	32,1	11,9	29,1	0,1	46,3	214,9
P8	5,98	290,63	271,75	6,51	1,14	0,01	6,63	12319,6	63816,3	32,37	408,13	33,7	12,5	12,1	7,5	28,1	0,2	77,3	286,0
P9	5,85	118,00	270,67	5,13	0,85	0,00	4,25	7355,8	53471,1	30,49	379,00	26,5	10,6	9,8	2,6	24,5	0,2	48,4	289,8
P11	4,88	175,00	197,83	3,34	0,68	0,82	10,69	60786,8	5484,5	38,52	398,17	3,2	0,6	15,4	6,7	26,8	1,4	7,4	72,3
P14	4,88	230,18	204,27	4,00	0,79	1,09	8,31	7797,1	64533,6	32,74	315,91	16,6	9,2	9,5	7,5	22,0	0,3	114,8	669,6
P15	5,20	252,83	122,17	4,20	0,55	0,37	6,48	15762,8	36330,6	31,38	402,33	15,9	9,4	8,7	9,7	19,3	0,6	91,6	503,6
P16	5,15	108,40	213,4	2,92	0,78	0,25	5,70	69897,3	1654,7	23,81	438,80	5,0	1,2	1,1	10,1	25,2	0,1	62,4	264,6
MAX.	5,98	290,63	372,53	6,51	11,22	1,09	10,69	69897,3	66182,3	44,38	438,80	33,7	16,9	32,1	19,9	31,8	1,4	114,8	669,6
MÉDIA	5,33	168,59	241,98	4,16	1,88	0,36	6,37	31904,08	40753,46	32,49	376,31	18,0	9,09	14,2	9,9	24,2	0,5	65,8	304,8
MÍN.	4,88	80,13	122,17	2,92	0,55	0,00	1,96	7355,8	1654,7	23,01	184,0	3,2	0,6	1,1	2,6	17,2	0,1	7,4	72,3
Áreas de reserva legal																			
M1	5,50	102,00	144,00	12,10	1,60	0,00	7,00	17265,2	41265,2	48,10	331,00	2,3	0,5	0,1	1,2	5,3	nd	4,0	34,7
M4	4,50	12,00	52,00	0,40	0,20	2,60	20,00	14325,2	28543,3	56,72	353,00	4,2	0,5	0,1	Nd	2,5	nd	65,4	55,4
M6	4,70	14,00	86,00	1,60	0,50	1,40	10,50	18340,2	24970,7	38,10	422,87	3,1	0,5	0,1	Nd	nd	nd	4,0	33,2
M8	5,20	32,00	93,00	8,10	1,60	0,10	8,30	17724,2	59777,1	41,72	408,12	1,0	0,5	0,1	Nd	11,1	nd	nd	10,8
M9	5,0	2,00	55,00	0,50	0,30	0,60	6,20	19076,2	32170,7	20,86	293,00	3,7	0,5	0,1	Nd	8,6	nd	8,7	34,1
M11	4,90	18,00	98,00	0,40	0,40	2,40	12,40	13212,2	22136,2	45,51	227,00	4,3	0,5	0,1	3,3	6,4	nd	15,4	29,7
M12	4,90	24,00	110,00	0,70	0,40	1,30	9,30	16231,2	33254,2	31,55	336,00	3,4	0,5	0,1	1,5	0,0	nd	3,4	102,4
M14	4,90	13,00	117,00	1,50	0,50	1,20	5,90	18540,2	26905,9	36,89	430,00	11,5	0,5	0,1	Nd	5,1	nd	10,9	30,1
M15	4,50	3,00	55,00	0,10	0,10	2,20	11,60	19932,2	61041,1	36,89	402,33	1,6	0,5	0,1	0,1	13,1	nd	3,4	11,9
M16	4,70	4,00	52,00	1,00	0,40	1,70	10,70	18388,2	60885,1	32,58	438,80	4,6	0,5	0,1	6	20,6	nd	64,2	189,4
MAX.	5,5	102	144	12,1	1,6	2,6	20	19932,2	61041,1	56,72	438,8	11,5	0,5	0,1	6	20,6	0	65,4	189,4
MÉDIA	4,88	22,4	86,2	2,64	0,6	1,35	10,19	17303,5	39094,9	38,892	364,21	3,97	0,5	0,1	1,21	7,27	0	17,94	53,17
MÍN.	4,5	2	52	0,1	0,1	0,00	5,9	13212,2	22136,2	20,86	227	1	0,5	0,1	0	0	0	0	10,8

nd = não determinado.

3.4.5 Extração de DNA Total do Solo

A extração do DNA total do solo foi realizada utilizando o kit PowerSoil DNA Isolation (MO BIO Laboratories INC.), segundo protocolo fornecido pelo fabricante. Após a extração, as amostras foram armazenadas a -20° C, a quantidade e qualidade do DNA obtido foram avaliadas por espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer- Thermo Fisher Scientific). O cálculo da concentração de DNA foi realizado segundo a fórmula: concentração do DNA em $\text{ng } \mu\text{L}^{-1} = A_{260\text{nm}} \times 50$ e a razão entre as leituras da absorbância a 260 nm e 280 nm e 260 nm e 230 nm foram utilizadas como indicativos da pureza do DNA obtido.

3.4.6 Avaliação da Quantidade e Qualidade do DNA Total

Após a extração, as amostras foram armazenadas a -20° C, e a quantidade e a qualidade do DNA obtido também foram avaliadas por espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer - Thermo Fisher Scientific). A integridade do DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 0,8% acrescido de SYBR green (Invitrogen), a fim de realizar estimativas de concentração, comparando a intensidade da banda da amostra com a intensidade da banda do marcador fago Lambda (λ) (Pomega), nas concentrações de 25 e 50 ng. O gel foi visualizado sob luz UV 254 nm e as imagens foram capturadas com a utilização do sistema de fotodocumentação L-PIX EX (Loccus Biotecnologia).

3.4.7 Amplificação dos Genes de Resistência a Antimicrobianos

O gene 16S rDNA e os genes que conferem resistência aos antimicrobianos sulfonamida (*sul1* e *sul2*) e colistina (*mcr-1*) foram detectados através da técnica de PCR, utilizando os *primers* descritos na Tabela 2. Para as reações de PCR foram utilizados 1 U de Taq DNA polimerase, 1X de tampão de reação, 2,5 mM de MgCl_2 , 0,2 mM de dNTP e 0,4 μM de cada *primer*. A concentração de DNA das cepas de *Escherichia coli* utilizadas como controle positivo foi de aproximadamente $10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$, já a concentração do DNA total das amostras de solos variou entre $5 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ a $12 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$.

Tabela 2. Sequência de primers utilizados na amplificação do gene 16S rDNA e dos genes que codificam resistência a sulfonamida e colistina.

Primers	Sequência 5'-3'	Tamanho do amplicon	Referência
1369-F 1492-R	CGGTGAATACGTTTCYCGG GGWTACCTTGTTACGACTT	144pb	SUZUKI et al., (2000)
<i>sul1</i> -F <i>sul1</i> -R	CGCACCGGAAACATCGCTGCAC TGAAGTTCGCCGCAAGGCTCG	162pb	PEI et al., (2006)
<i>sul2</i> -F <i>sul2</i> -R	TCCGGTGGAGGCCGGTATCTGG CGGGAATGCCATCTGCCTTGAG	190pb	PEI et al., (2006)
<i>mcr-1</i> F <i>mcr-1</i> R	CGGTCAGTCCGTTTGTTC CTTGGTCGGTCTGTAGGG	309pb	LIU et al., 2015

As amplificações para *sul1*, *sul2* foram conduzidas segundo os seguintes parâmetros: 5 minutos de desnaturação inicial a 95 °C, 40 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 60 °C por 30 segundos, 72 °C por 30 segundos, seguida de uma elongação final a 72 °C por 7 minutos. Para o gene *mcr-1* a condição de amplificação seguiu de 15 minutos de desnaturação inicial a 94 °C, 25 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 58 °C por 90 segundos, 72 °C por 60 segundos e uma elongação final de 72 °C por 10 minutos. Os produtos das reações de PCR foram

visualizados por eletroforese em gel de agarose 1,5% sob luz UV no sistema de fotodocumentação L-PIX EX (Loccus Biotecnologia). Todas as reações foram realizadas em triplicatas para confirmação dos resultados.

3.4.8 Análise Estatística

Uma análise de correlação de Pearson (5%) foi construída para as variáveis dentro de cada área. Adicionalmente, foi utilizado o método LASSO para selecionar as variáveis que apresentam maior percentual de classificação das amostras para as áreas avaliadas. Após a seleção das variáveis foi realizado uma análise de componentes principais (PCA) para verificar o grau de explicação das variáveis selecionadas e o perfil das áreas avaliadas. Posteriormente, um modelo generalizado foi utilizado considerando uma distribuição binomial para avaliar o efeito da frequência dos genes nas áreas estudadas. Todas as análises foram realizadas utilizando o software R.3.6.0. (CRAN).

3.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O gene 16S rDNA foi detectado em todas as amostras de solos, evidenciando presença de DNA em quantidade e qualidade suficiente para ser utilizado como molde para amplificação dos genes que codificam resistência aos antimicrobianos (Tabela 3). O gene *mcr-1* foi detectado em todas as amostras das áreas de cultivo agrícola e reserva legal.

Tabela 3. Detecção dos genes 16S rDNA, *mcr-1*, *sul1* e *sul2* em solos de cultivo agrícola e de reserva legal

	16SrDNA	<i>mcr-1</i>	<i>sul1</i>	<i>sul2</i>
P1	+	+	+	+
P3	+	+	+	+
P4	+	+	+	+
P6	+	+	-	-
P8	+	+	+	+
P9	+	+	+	+
P11	+	+	+	+
P14	+	+	+	-
P15	+	+	-	-
P16	+	+	+	-
M1	+	+	-	-
M4	+	+	-	-
M6	+	+	-	-
M8	+	+	-	+
M9	+	+	-	+
M11	+	+	-	-
M12	+	+	-	-
M14	+	+	-	-
M15	+	+	-	-
M16	+	+	-	-

P = Áreas de cultivo agrícolas; M = Áreas de reserva legal, com remanescente de mata; Presença (+) e ausência (-) de gene.

Em relação aos genes *sul1* e *sul2*, não houve a ocorrência de interação entre os genes, mas houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre as proporções dos genes nas duas áreas, de cultivo agrícola e de reserva legal (Tabela 4), onde ambos foram mais frequentes nas amostras de cultivo agrícola (Figura 2).

Tabela 4. Análise de *deviance* para as proporções de genes *sul1* e *sul2* da área de cultivo agrícola e reserva legal

	Grau de liberdade	Deviance	Grau de liberdade do resíduo	Resíduo da deviance	Pr (>Chi)
NULL			39	54,55	
Áreas	1	19,05	38	35,50	0,0000
Genes	1	0,18	37	35,32	0,6708
Áreas:Genes	1	3,08	36	32,23	0,0791

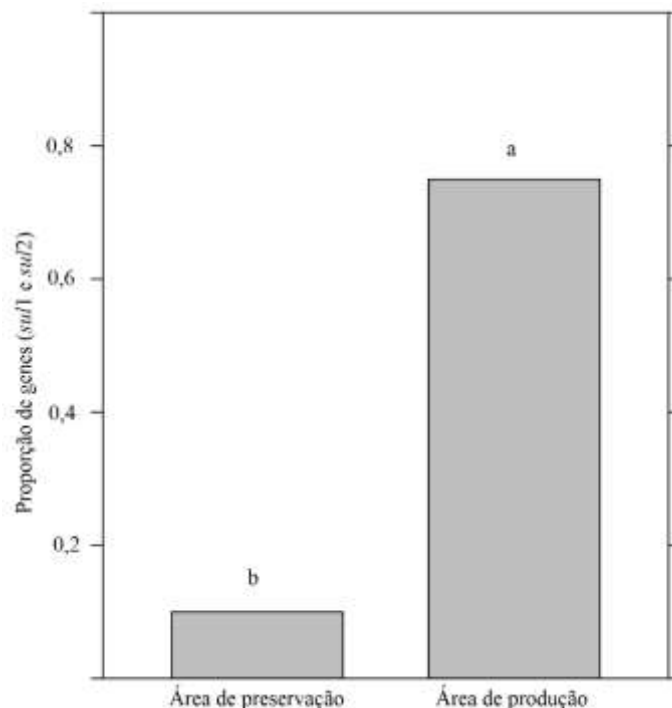


Figura 2. Proporção dos genes *sul1* e *sul2* nas áreas de cultivo agrícola e de reserva legal.

As variáveis com maior poder de classificação das duas áreas foram P, K, Co, Pb e Mn, de acordo com o modelo de classificação:

$$Y_{ij} = -8,37 + 0,017P + 0,018K + 0,06Co + 0,186Pb + 0,0015Mn$$

Isso também pode ser observado pela análise das componentes principais que demonstrou que as variáveis selecionadas explicam 82,74% da variância total (Figura 3).

A maior proporção dos genes *sul1* e *sul2* na área de cultivo agrícola corrobora com a hipótese de que o uso de esterco animal como fertilizante é uma fonte de genes de resistência, bactérias resistentes e resíduos de antimicrobianos e pode disseminar a resistência aos antimicrobianos no ambiente. A presença de resíduos de sulfonamida já foi registrada em amostras de cama de aviário, bem como, os genes *sul1* e *sul2* já foram detectados tanto em cama de aviário, quanto em solos adubados com este tipo de esterco (Ji et al., 2012). Segundo Ji et al. (2012), a ação do antimicrobiano sulfonamida está relacionada à inibição competitiva da enzima dihidropteroato sintase (DHPS) na via do ácido fólico e a resistência é conferida por mutações no gene que codifica esta enzima ou pela aquisição de genes alternativos, como *sul1* e *sul2*. Heuer et al. (2011) verificaram, através de PCR em tempo real, que a abundância de genes *sul1* e *sul2* em solos tratados com aplicações repetidas de esterco suíno contendo sulfonamida aumentou dois meses após cada aplicação e sugeriram que aplicações repetidas de esterco no solo aumentam a abundância dos genes de resistência a este antimicrobiano no solo.

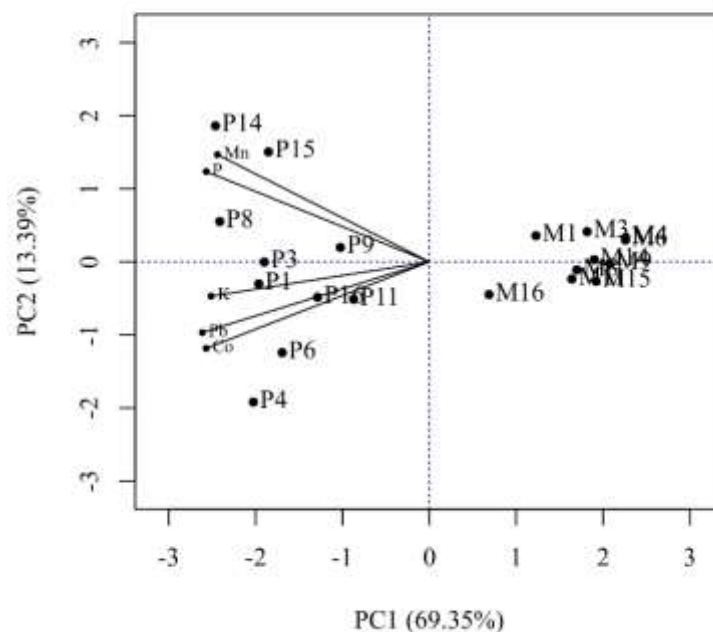


Figura 3. Análise de componentes principais das variáveis P, K, Co, Pb e Mn das áreas de cultivos agrícolas e de reserva legal.

A maior proporção dos genes *sul1* e *sul2* na área de cultivo agrícola corrobora com a hipótese de que o uso de esterco animal como fertilizante é uma fonte de genes de resistência, bactérias resistentes e resíduos de antimicrobianos e pode disseminar a resistência aos antimicrobianos no ambiente.

Além do incremento de antimicrobianos e genes de resistência a antimicrobianos através da adição de cama de aviário nos solos, há evidências de que fatores externos como os metais pesados e pesticidas, por exemplo, exercem forte pressão seletiva e contribuem para a abundância e propagação de genes de resistência a antimicrobianos mesmo em baixas concentrações do antimicrobiano em questão (LU et al., 2015).

Dentre as variáveis com maior poder de diferenciação da área de cultivo agrícola e de reserva legal, podemos citar os metais pesados Co, Pb e Mn, que estão em maior concentração nas áreas de cultivo agrícola. Nossa hipótese é que os maiores teores destes metais também contribuem para a manutenção dos genes de resistência a antimicrobianos nos solos. Lu e colaboradores (2015) investigando os fatores que influenciam na manutenção, propagação e destino de genes de resistência a sulfonamidas (*sul1*, *sul2* e *sul3*) em dois estuários na China observaram uma correlação positiva entre os genes de resistência e os metais pesados Cr, Co, Ni, Cu, Zn e Pb, tendo estes um coeficiente de correlação maior do que o observado com a presença do antimicrobiano. Nos estudos realizados por Ji et al. (2012) foi observado uma maior correlação entre a abundância de metais pesados e genes de resistência do que entre a abundância de resíduos de antimicrobianos e genes de resistência, em solos tratados com esterco, incluindo cama de aviário. No estudo supracitado Cu, Zn e Hg correlacionaram-se positivamente com o gene *sul1*. Os autores sugeriram que, embora o principal fator de seleção de genes de resistência seja causado pelos antimicrobianos na microbiota intestinal, a pressão de seleção causada por resíduos de antimicrobianos no solo é transitória, pois estes podem ser degradados. Já os metais pesados podem exercer uma pressão seletiva a longo prazo, já que não são degradados e podem acumular no ambiente.

O gene *mcr-1* foi detectado em todas amostras, tanto provenientes de cultivo agrícola, tanto da área de reserva legal. Sugerimos que a principal fonte do gene *mcr-1* nas amostras de solo de cultivo agrícola é proveniente da cama de aviário usada como fertilizante orgânico e que a presença desse gene nas amostras de solo de reserva legal reflete uma contaminação a partir das áreas de produção agrícola que são próximas.

Vários estudos têm relatado que genes de resistência a antimicrobianos podem ser disseminados no ambiente através de escoamento superficial da água de chuva e/ou irrigação, lixiviação de áreas agrícolas manejadas com biossólidos ou esterco, trânsito de animais entre outros (ALLEN et al., 2010; PENG et al., 2015; WANG et al., 2017; ZHU et al., 2013).

A estocagem de água para reuso na irrigação e/ou uso humano e animal próximo a áreas de produção é uma preocupação pertinente. Sun et al., (2017) relataram que *E. coli* produtoras de ESBL (beta-lactamase de amplo espectro) foram isoladas de poços de água os quais poderiam constituir um alto risco de disseminação bacteriana para humanos e animais. Em Lansing (EUA) esterco da produção animal intensiva foi massivamente aplicado em solos agrícolas e antimicrobianos comumente usados como medicamentos veterinários foram detectados em água de onze canais de estabelecimentos agrícolas em concentrações variando de vários a centenas de nanograma por litro (SONG et al., 2010). Assim, é sugerido que o solo atua como um reservatório de antimicrobianos e pode ser disseminado no ambiente e contaminar áreas próximas através de água superficial e/ou subterrânea estabelecendo uma pressão de seleção nos microrganismos favorecendo a disseminação de genes de resistência. As áreas de cultivo agrícola analisadas neste estudo são irrigadas com água de nascente ou açudes o que pode representar uma fonte de disseminação de genes e microrganismos resistentes no ambiente.

Grande quantidade dos antimicrobianos administrados aos animais são excretados via fezes e urina como forma inalterada ou metabólitos ativos (SARMAH, 2006). Ainda no intestino dos animais, os antimicrobianos causam uma pressão de seleção na microbiota intestinal o que pode aumentar a abundância de bactérias resistentes que são disseminados no ambiente juntamente com os resíduos antimicrobianos e genes de resistência. Uma vez no solo, esses contaminantes interagem de diferentes maneiras, de acordo com as características físico-químicas do solo, como por exemplo os metais pesados, que irão influenciar na sua persistência no ambiente. Em acordo com o conceito de saúde única, a saúde humana, animal e ambiental estão intrinsecamente conectadas o que faz com que a ação em qualquer ponto dessa tríade reflita no outro. Assim, os resultados deste trabalho sinalizam a importância do entendimento das vias de disseminação de genes de resistência a antimicrobianos nas áreas de produção agrícola, bem como os fatores que interferem na persistência e disseminação desses genes no ambiente, uma vez que estes podem ser transferidos para bactérias comensais e patogênicas de humanos e animais.

3.6. CONCLUSÕES

A adubação de áreas agrícolas com cama de aviário fresca incrementa genes de resistência a sulfonamida e colistina no solo.

Os teores de elementos P, K, Co, Pb e Mn são discrepantes nos solos agrícolas e de reserva legal e podem ser um dos fatores que determinam a persistência dos genes de resistência a antimicrobianos no solo.

3.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. 2017. Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/mercado-mundial>>. Acesso em: 24 de novembro de 2018.

ALLEN, H. K.; MOE, L. A.; RODBUMRER, J.; GAARDER, A.; HANDELSMAN, J. Functional metagenomics reveals diverse β -lactamases in a remote Alaskan soil. **The ISME Journal**, v. 3, n. 2, p. 243, 2010.

CAMPOS, J.; CRISTINO, L.; PEIXE, L.; ANTUNES, P. MCR-1 in multidrug-resistant and copper-tolerant clinically relevant *Salmonella* 1, 4,[5], 12: i:-and S. Rissen clones in Portugal, 2011 to 2015. **Eurosurveillance**, v. 21, n. 26, p. 30270, 2016.

CHAPMAN, J. S. Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 51, n. 4, p. 271-276, 2003.

DALÓLIO, F. S.; SILVA, J. N.; OLIVEIRA, A. C. C.; TINÔCO, I. F. F.; BARBOSA, R. C.; RESENDE, M. O.; ALBINO, L. F. T.; COELHO, S. T. Poultry litter as biomass energy: A review and future perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 76, n. March, p. 941–949, 2017.

DANTAS, M.E.; SHINZATO, E.; MEDINA, A. I. D. M.; SILVA, C. R. D.; PIMENTEL, J., LUMBRERAS, J. F.; CALDERANO, S.B.; CARVALHO FILHO, A. D. **Diagnóstico Geoambiental do Estado do Rio De Janeiro**. 2015. Disponível em: <http://www.cprm.gov.br/publique/media/artigo_geoambiental_RJ.pdf>. Acesso em: 04 de julho de 2018.

DONAGEMA, G. K.; DE CAMPOS, D. B.; CALDERANO, S. B.; TEIXEIRA, W. G.; VIANA, J. M. Manual de métodos de análise de solo. **Embrapa Solos-Documentos (INFOTECA-E)**. 2011.

HE, F. *E. coli* Genomic DNA Extraction. **Bio-protocol**, [s.l.], v. 1, n. 14, p.1-3, 2011.

HEUER, H.; SOLEHATI, Q.; ZIMMERLING, U.; KLEINEIDAM, K.; SCHLOTTER, M.; MÜLLER, T.; FOCKS, A.; THIELE-BRUHN, S.; SMALLA, K. Accumulation of sulfonamide resistance genes in arable soils due to repeated application of manure containing sulfadiazine. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 7, p. 2527-2530, 2011.

HEUER, H. & SMALLA, K.. Manure and sulfadiazine synergistically increased bacterial antibiotic resistance in soil over at least two months. **Environmental Microbiology**, v. 9, n. 3, p. 657-666, 2007.

JI, X., SHEN, Q., LIU, F., MA, J., XU, G., WANG, Y., & WU, M. Antibiotic resistance gene abundances associated with antibiotics and heavy metals in animal manures and agricultural soils adjacent to feedlots in Shanghai, China. **Journal of hazardous materials**, v. 235, p. 178-185, 2012.

LIU, Y. Y.; WANG, Y.; WALSH, T. R.; YI, L. X.; ZHANG, R.; SPENCER, J.; DOI, Y.; TIAN, G.; DONG, B.; HUANG, X.; YU, L. F.; GU, D.; REN, H.; CHEN, X.; LV, L.; HE, D.; ZHOU, H.; LIANG, Z.; LIU, J. H.; SHEN, J. Emergence of plasmid-mediated colistin

resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. **The Lancet infectious diseases**, v. 16, n. 2, p. 161-168, 2015.

LU, Z.; NA, G.; GAO, H.; WANG, L.; BAO, C.; YAO, Z. Fate of sulfonamide resistance genes in estuary environment and effect of anthropogenic activities. **Science of the Total Environment**, v. 527, p. 429-438, 2015.

MO BIO Laboratories INC. **Power Soil DNA Isolation Kit**. Disponível em: <<https://mobio.com/media/wysiwyg/pdfs/protocols/12888.pdf>> Acesso em: 05 de novembro de 2017

NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.8 User's Manual, 2010. Disponível em: <<http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/nd-1000-v3.8-users-manual-8%205x11.pdf>> Acesso em: 15 jun. 2018.

PEI, R.; KIM, S. C.; CARLSON, K. H.; PRUDEN, A. Effect of river landscape on the sediment concentrations of antibiotics and corresponding antibiotic resistance genes (ARG). **Water research**, v. 40, n. 12, p. 2427-2435, 2006.

PENG, S.; WANG, Y.; ZHOU, B.; LIN, X. Long-term application of fresh and composted manure increase tetracycline resistance in the arable soil of eastern China. **Science of the Total Environment**, v. 506, p. 279-286, 2015.

PMNF. **Prefeitura Municipal de Nova Friburgo: dados gerais**. Disponível em: <<http://novafriburgo.rj.gov.br/nova-friburgo/dados-gerais/>>. Acesso em: 13 set. 2015.

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, 2006.

SONG, W.; DING, Y.; CHIOU, C. T.; LI, H. Selected veterinary pharmaceuticals in agricultural water and soil from land application of animal manure. **Journal of environmental quality**, v. 39, n. 4, p. 1211-1217, 2010.

SUN, P.; BI, Z.; NILSSON, M.; ZHENG, B.; BERGLUND, B.; LUNDBORG, C. S.; BÖRJESSON, S.; LI, X.; CHEN, B.; YIN, H.; NILSSON, L. E. Occurrence of blaKPC-2, blaCTX-M, and mcr-1 in Enterobacteriaceae from well water in rural China. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 4, p. e02569-16, 2017.

SUZUKI, M. T.; TAYLOR, L. T.; DELONG, E. F. Quantitative analysis of small-subunit rRNA genes in mixed microbial populations via 5'-nuclease assays. **Applied and Environment Microbiology**, v. 66, n. 11, p. 4605-4614, 2000.

USEPA, E. Method 3051: Microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils, and oils. Test Methods for Evaluating Solid Waste. [s.l: s.n.]. 2007. Disponível em: <<http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3051a.pdf>>. Acesso em: 4 de julho de 2018.

WANG, M.; LIU, P.; XIONG, W.; ZHOU, Q.; WANGXIAO, J.; ZENG, Z.; SUN, Y. Fate of potential indicator antimicrobial resistance genes (ARGs) and bacterial community diversity

in simulated manure-soil microcosms. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 147, p. 817-823, 2017.

ZHU, Y. G.; JOHNSON, T. A.; SU, J. Q.; QIAO, M.; GUO, G. X.; STEDTFELD, R. D.; HASHSHAM, S.A.; TIEDJE, J. M. Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 9, p. 3435-3440, 2013.

4. CAPÍTULO II

OCORRÊNCIA DO GENE DE RESISTÊNCIA A COLISTINA *mcr-1* EM SOLOS DE PRODUÇÃO AGRÍCOLA E DE RESERVA LEGAL

Document published in “European Journal of Soil Science”

OLIVEIRA, C.C.; LOPES, E.S.; BARBOSA, D.R.; PIMENTA, R.L.; SOBRINHO; N.M.B.A.; COELHO; S.M.O.; SOUZA; M.M.S.; COELHO, I. S. Occurrence of the colistin resistance *mcr-1* gene in soils from intensive vegetable production and native vegetation. *European Journal of Soil Science*. 70:876-881, 2019.

4.1 RESUMO

A colistina, atualmente considerada o antibiótico de última escolha para o tratamento de infecções causadas por bactérias multirresistentes, é usada na produção de aviário para tratar e prevenir infecções, e como promotor de crescimento. A cama de aviário é comumente usada como fertilizante orgânico; no entanto, não há relatos sobre o efeito de sua aplicação em relação à resistência à colistina em solos. Assim, o objetivo do presente estudo foi comparar a abundância do gene de resistência à colistina (*mcr-1*) em solos de áreas de produção de hortaliças que receberam cama de aviário não-compostada como fertilizante orgânico e áreas de reserva legal. O gene *mcr-1* foi detectado em todas as amostras de solo das duas áreas. Uma diferença significativa ($p < 0,05$) foi observada na abundância relativa do gene *mcr-1* entre os solos pertencentes à área de produção agrícola e a área de reserva legal em seis dessas 10 propriedades. Este é o primeiro relato da presença do gene de resistência à colistina em solos do Brasil. A grande maioria dos genes de resistência a antibióticos adquiridos por patógenos humanos se originou em ambientes naturais. Assim, a presença do gene *mcr-1* em solos tratados com cama de aviário e de áreas de reserva legal reforça a necessidade de estudos que minimizem os riscos potenciais do desenvolvimento da resistência à colistina.

Palavras chave: Gene de resistência antimicrobiana. Reserva legal. Cama de aviário. PCR em tempo real

4.2 ABSTRACT

Colistin, currently regarded as the last-resort antibiotic for the treatment of infections caused by multidrug-resistant bacteria, is used in poultry production to treat and prevent infection, and as a growth promoter. Poultry litter is commonly used as organic fertilizer; however, there are no reports on the effect of its application regarding colistin resistance in soils. Thus, the objective of the present study was to compare the abundance of the colistin resistance gene (*mcr-1*) in soils from vegetable production areas that received non-composted poultry litter as organic fertilizer and native vegetation areas. The *mcr-1* gene was detected in all soil samples from both areas. A significant difference ($p < 0.05$) was observed in the relative abundance of the *mcr-1* gene between soils pertaining to the vegetable production area and the native vegetation area in six of those 10 properties. This is the first report of the presence of the colistin resistance gene in soils from Brazil. The vast majority of antibiotic resistance genes acquired by human pathogens originated in natural environments. Thus, the presence of the *mcr-1* gene in soils treated with poultry litter and from native vegetation areas reinforces the need for studies that minimize potential risks of the development of colistin resistance.

Keywords: Antimicrobial resistance gene. Legal reserve. Poultry litter. Real-time PCR

4.3 INTRODUCTION

Colistin, also known as polymyxin E, is an antibiotic produced by some strains of *Paenibacillus polymyxa*, a bacterium commonly found in soils associated with plant roots (GRADY, MACDONALD, LIU, RICHMAN, & YUAN, 2016). The antibiotic was maintained as a reserve agent for an extended period because of severe problems concerning nephrotoxicity and neurotoxicity (BERINGER, 2001). However, the rapid increase in the prevalence of Gram-negative pathogens resistant to most antimicrobials has led to its reconsideration as a therapeutic alternative, and, in some cases, the drug has been considered the last available option (BISWAS, BRUNEL, DUBUS, REYNAUD-GAUBERT, & ROLAIN, 2012; LANDMAN, GEORGESCU, MARTIN, & QUALE, 2008).

The first reports on mechanisms of resistance to colistin refer to chromosome-mediated transfer and involve the modulation of two-component regulatory systems, which lead to the modification of lipid A (OLAITAN, MORAND, & ROLAIN, 2014). Another resistance mechanism is mediated by the enzyme phosphatidylethanolamine transferase, encoded by the *mcr-1* gene. In 2015, Liu and collaborators first reported the presence of the gene in a plasmid, increasing the concern regarding dissemination of resistance.

Colistin has been used extensively in animal production for prophylactic and therapeutic purposes, as well as in promoting growth (RHOUMA, BEAUDRY, & LETELLIER, 2016). Poultry litter, a mixture of materials including faeces, feed, feathers, water and bedding, is a valuable nutrient-rich soil fertilizer that can improve the physical, chemical and biological properties of soils used in agricultural production. However, animal manure, such as poultry litter, has been considered an important reservoir of antibiotic residues, antibiotic-resistant bacteria and antibiotic resistance genes (FALDYNOVA et al., 2013; UDIKOVIC-KOLIC, WICHMANN, BRODERICK, & HANDELSMAN, 2014). Despite the fact that the soil environment constitutes a natural source of both antibiotics and antibiotic resistance genes, the application of manure from animal production can enhance the abundance and diversity of antibiotic resistance determinants (HERATH, PALANSOORIYA, DANDENIYA, & JINADASA, 2016; WU, QIAO, ZHANG, CHENG, & ZHU, 2010; YANG, ZHANG, GUO, & TIAN, 2016; ZHU et al., 2013).

Therefore, the present study aimed to evaluate the occurrence of the *mcr-1* gene in cultivated soils that received poultry litter as organic fertilizer and legal reserve areas with native vegetation in Nova Friburgo-RJ, Brazil.

4.4 MATERIALS AND METHODS

Soil samples were collected from 10 properties in the Barracão dos Mendes hydrographic microbasin, located in Nova Friburgo, Rio de Janeiro, Brazil (latitude 22° 16' 55", longitude 42° 31' 52") (Figure 1) in July 2016. According to Law No 12,651/2012 (União, 2012), all rural properties must maintain an area covered with native vegetation, entitled as a "Legal Reserve". Soil samples were collected from intensive vegetable production areas that received non-composted poultry litter as organic fertilizer, and from native vegetation areas within each property. Each sample consisted of 30 subsamples collected at depths ranging from 0 to 20 cm, which were pooled.

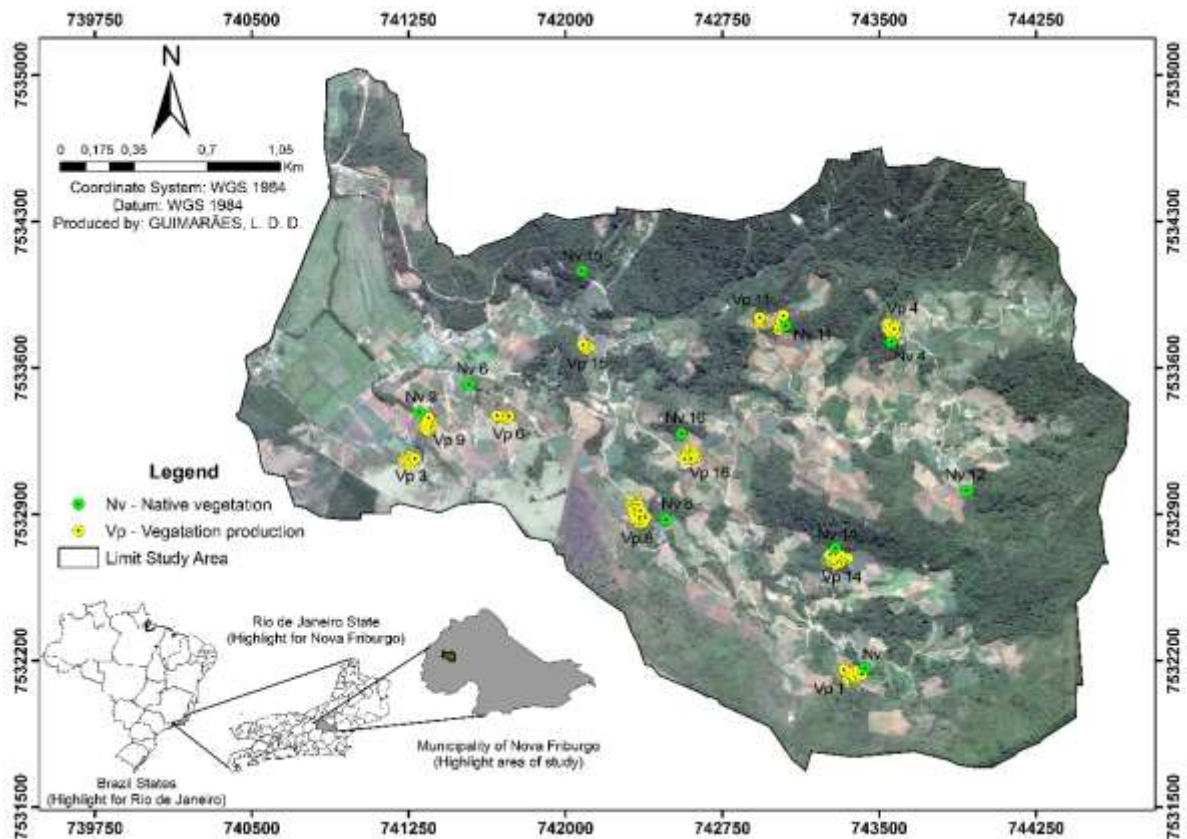


Figure 1. Map showing the location of the study area in the Barracão dos Mendes hydrographic basin (delimited by black line), located in Nova Friburgo, Rio de Janeiro, Brazil. The green points correspond to the native vegetation area (Nv) and the yellow points represent the vegetable production area (Vp).

Total DNA was extracted from 0.25 g of soil using the DNA PowerSoil kit (MO Bio Laboratories Inc. MO BIO Laboratories, Inc., Carlsbad, CA), according to the manufacturer's recommendations. The 16S rDNA and *mcr-1* gene were quantified using the primers 1369F (5'-CGGTGAATACGTTTCYCGG-3') and 1492R (5'-GGWTAC CTTGTTACGACTT-3') (Suzuki, Taylor, & DeLong, 2000) and *mcr1*-qF (5'-AAAGACGCGGTACAAGCAAC-3') and *mcr1*-qR (5'-GCTGAACATACACGGCACAG-30) (Li et al., 2017), respectively.

Primer concentrations were analysed through concentration curves generated using the standard sample DNA as a template. The optimal primer concentration was determined considering the minimum concentration necessary to achieve the smallest cycle quantification (Cq) and maximum standardized report fluorescence signal (ΔRn) in the absence of non-specific peaks by melting curve analysis. Different combinations of forward and reverse

primers were tested for reaction optimization and 400 nM of primer 1369F and 800 nM of 1492R (for 16S rDNA gene quantification), and 400 nM of *mcr1*-qF and 600 nM of *mcr1*-qR (for *mcr1* gene quantification), were selected. The reactions were carried out in a total volume of 12 μ L containing 1X HOT FIREPolEvaGreen® HRM Mix (Solis Biodyne, Tartu, Estonia) and 100 ng of DNA from an *Escherichia coli* strain positive for the *mcr1* gene. The assays were performed using the StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster, CA), under the following conditions: 95°C for 10 min, 40 cycles at 95°C for 15 s, 60°C for 20s and 72°C for 30 s. After amplification, the melting curve was measured with a denaturing step of 15 s at 95°C, a hybridization step of 20 s at 60°C, followed by a stepwise temperature increment from 72 to 95°C, where the change in fluorescence was assessed at each 0.1°C increase for 5 s.

The *Escherichia coli* strain used as a positive control for the *mcr1* gene was obtained through cloacal swabs of broiler chickens from the city of São Jose do Vale do Rio Preto, in the state of Rio de Janeiro. The swab samples were placed in tubes containing Stuart transport medium. One swab was streaked on methylene Blue Eosin Agar (EMBHiMedia®) and the plates were incubated at 37°C for 24 hr. Green metallic colonies, indicating strong lactose fermentation, were selected. Identification of the strain was performed using the MALDI-TOF MS proteomic technique (Rodrigues et al., 2017). The strain was tested for susceptibility to colistin using the broth dilution method, whereby a minimum inhibitory concentration (MIC) $>2.0 \text{ mg L}^{-1}$ was considered indicative of colistin resistance, according to the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). The DNA from the colistin-positive strain (confirmed by the phenotypic method) was extracted by boiling, and the PCR for *mcr1* gene detection was conducted using the primers described by Liu et al. (2015). The PCR product was purified with Exo-Sap (USB 39 Corp., Cleveland, OH, USA), according to the manufacturer's recommended protocol. The reverse and the forward strands of the *mcr1* gene were sequenced and assembled to provide an accurate consensus sequence, helping resolve ambiguities. Sequencing was performed at Helixxa Company (Paulínia, SP, Brazil). The nucleotide sequences were edited with the Bioedit version 7.0.9.0 software (Hall, 1999) and compared to sequences deposited in the GenBank using the Blast-n algorithm (ALTSCHUL et al., 1997), showing complete identity (100%) with the *mcr1* gene from the *Escherichia coli* strain E308 plasmid pLKSZ03 (Genbank accession number CP030284). The sequence was deposited in a GenBank database (Genbank accession number MH918830).

The genome size of the *Escherichia coli* strain was used to estimate the quantity of DNA (pg) that had one copy of the target (HEMBACH et al., 2017). Serial dilutions of DNA stocks were prepared and used to calculate the calibration curves, which varied from 1.0×10^2 to 1.0×10^6 copies of the target. Optimization of the qPCR assay was evaluated by linear regression, together with the coefficient of determination (R^2), at the end of the resolution of each point of the curve. All R^2 values were higher than 0.99 and every reaction retained amplification efficiency above 98%. The abundance of the *mcr1* gene was normalized to the abundance of the 16S rDNA gene. These standardized values were logarithmically transformed to log₁₀ to obtain a near-normal distribution of the data. Excel 2010 (Microsoft Office 2010, Microsoft, Redmond, WA) was applied to determine the averages and standard error. Student's t-test was performed to compare the levels of the antimicrobial resistance *mcr1* gene in vegetable production and native vegetation areas within each property. One-way analysis of variance (ANOVA) was used for pairwise comparisons. Differences were considered significant at a p value of <0.05 . Statistical analyses were carried out with the GLM procedure in SAS version 9.3 (SAS, 2001).

4.5 RESULTS

The colistin resistance *mcr-1* gene was detected in all soil samples from intensive vegetable production (Vp) and native vegetation (Nv) areas. The relative abundance \log_{10} *mcr-1* ranged from -3.12 (7.67×10^{-4} copies of *mcr-1*/16S rDNA) in the native vegetation area of property 14 to -1.76 (1.81×10^{-2} copies of *mcr-1*/16S rDNA) in the native vegetation area of property 11 (Figure 2). A significant difference ($p < 0.05$) was observed in the relative abundance of the *mcr-1* gene between soils pertaining to the vegetable production area and native vegetation area of properties P1, P3, P6, P9, P11 and P14. In properties 6 and 14 the relative abundance of the *mcr-1* gene in vegetable production areas was significantly higher than in native vegetation areas. On the other hand, the relative abundance of the *mcr-1* gene in native vegetation areas was significantly higher than in the vegetable production area in properties 1, 3, 9 and 11.

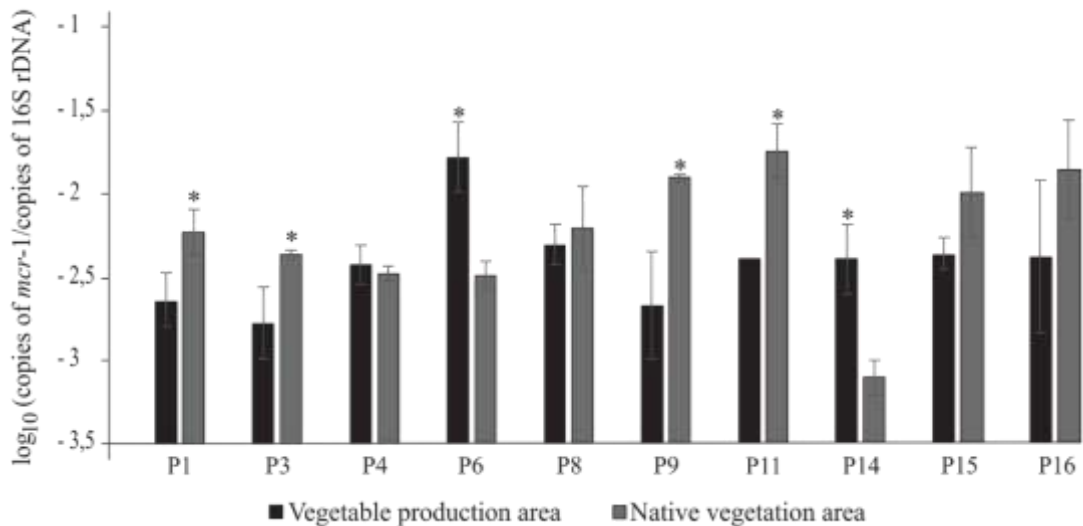


Figure 2. Relative abundance of the colistin resistance *mcr-1* gene in soils from intensive vegetable production and native vegetation areas from properties P1, P3, P4, P6, P8, P9, P11, P14, P15 and P16. Bars indicate an average of three triplicates \pm standard standard error. Bars with an asterisk (*) indicate a significant difference ($p < 0.05$) between intensive vegetable production and native vegetation areas.

4.6 DISCUSSION

The first description of colistin resistance was detected in *Escherichia coli* isolated from animals and humans in China in November 2015 (LIU et al., 2015). In April 2016, the presence of the *mcr-1* gene was reported in bacteria of animal origin in Brazil (Fernandes et al., 2016), and in October 2016, the colistin-resistant *Escherichia coli* sequence type 101 isolate from a human infection in Brazil was reported in the country (FERNANDES et al., 2016). Given that colistin sulphate is not routinely used as an antibiotic in the treatment of human infections, the detection of this gene has been linked to the intensive use of colistin sulphate in animal production. Thus, Brazil has banned the marketing and use of colistin sulphate as a growth promoter since November 2016. Because the soil samples used in this study were collected in 2016 before the prohibition, the poultry litter applied in the vegetable production soils was originated from poultry production that used colistin sulphate as a growth promoter. Accordingly, our hypothesis is that the principal source of the *mcr-1* gene in agricultural soils is the poultry litter used as an organic fertilizer and the abundance of this gene in the soils under native vegetation may reflect contamination from the agricultural production nearby.

Numerous studies have shown that the abundance of antibiotic resistance genes can be disseminated in the environment through runoff and leaching from fields treated with biosolids or manure (ALLEN et al., 2010; PENG, WANG, ZHOU, & LIN, 2015; WANG et al., 2017; ZHU et al., 2013). The antimicrobials used to treat animal disease and for growth promotion can be found at a significant fraction on animal manure (SARMAH, MEYER, & BOXALL, 2006), which, when used as organic fertilizer, may lead to the contamination of surface water and groundwater. The increase of these molecules in the environment causes selective pressure among microorganisms, leading to the selection of strains with intrinsic resistance, and benefits the acquisition of determinants that confer resistance by mobile genetic elements which may be disseminated throughout the environmental microbiota (HEUER et al., 2011; MARTINEZ, 2009). In Lansing (MI), manure from intensive animal production was extensively applied to agricultural soils, and antimicrobials commonly used as veterinarian pharmaceuticals were detected in water from 11 drainage canals of agricultural establishments and surface trenches, in concentrations varying from several to hundreds of nanograms per litre (SONG, DING, CHIOU, & LI, 2010). Sun et al. (2017) demonstrated that *E. coli* ESBL (extended-spectrum β -lactamase) producers were isolated from well water, which could probably constitute a high risk of bacterial dissemination for humans and animals. A pertinent concern is the reuse of stocked water (for both irrigation or human and animal purposes) near these areas, which could represent a potential risk of resistant bacterial dissemination. Antibiotics and antibiotic resistant bacteria can also be transported through aerosols or dust generated during the incorporation of poultry litter into the soil. Airborne particulate matter derived from feed yards in Texas facilitated the dispersal of several veterinary antibiotics, as well as microbial communities containing antimicrobial resistance genes (MCEACHRAN et al., 2015).

4.7 CONCLUSION

The present study constitutes the first report of the presence of the *mcr-1* gene in Brazilian soils. Considering that colistin sulphate was used in considerable quantities in poultry production (FERNANDES, MCCULLOCH, et al., 2016), and that poultry manure is used at large scales as an organic fertilizer in agricultural production (MOORE, DANIEL, SHARPLEY, & WOOD, 1995), future investigations are required to confirm the origin of *mcr-1* resistance genes in these soils. This information is crucial for the development of management strategies that reduce the risk of dissemination of colistin resistance, given that the antibiotic is currently considered a last resort for the treatment of infections caused by multidrug-resistant Enterobacteriaceae in humans.

4.8 ACKNOWLEDGEMENTS

We thank research funding agencies CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and FAPERJ (Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro) for financial support. We thank Patrícia Gonzaga Paulino, Maristela Peckle Peixoto and Huarrisson Azevedo Santos for assistance with real time PCR methodology; Bruna Caroline Franzan for assistance with statistical analyses and Douglas McIntosh for the availability the use of the equipment of the Multi-user Laboratory of Molecular Biology of the Parasitology Department of the Veterinary Institute in the Rural Federal University of Rio de Janeiro.

4.9 REFERENCES

- ALLEN, H. K.; DONATO, J.; WANG, H. H.; CLOUD-HANSEN, K. A.; DAVIES, J.; HANDELSMAN, J. Call of the wild: Antibiotic resistance genes in natural environments. **Nature Reviews Microbiology**, 8, 251–259. 2010.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSIBLAST: A new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, 25, 3389–3402. 1997.
- BERINGER, P. The clinical use of colistin in patients with cystic fibrosis. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, 7, 434–440. 2001.
- BISWAS, S.; BRUNEL, J. M.; DUBUS, J. C.; REYNAUD-GAUBERT, M.; ROLAIN, J. M. Colistin: An update on the antibiotic of the 21st century. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, 10, 917–934. 2012.
- FALDYNOVA, M.; VIDENSKA, P.; HAVLICKOVA, H.; SISAK, F.; JURICOVA, H.; BABAK, V.; STEINHAUSER, L.; RYCHLIK, I. Prevalence of antibiotic resistance genes in faecal samples from cattle, pigs and poultry. **Veterinarni Medicina**, 58, 298–304. 2013.
- FERNANDES, M. R.; MOURA, Q.; SARTORI, L.; SILVA, K. C.; CUNHA, M. P. V.; ESPOSITO, F.; SARTORI, L.; DROPA, M.; MATTÉ, M. H.; LIRA, D. P. A.; MAMIZUKA, E. M.; LINCOPAN, N. First report of the globally disseminated IncX4 plasmid carrying the *mcr-1* gene in a colistin-resistant *Escherichia coli* ST101 isolated from a human infection in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 60, 6415–6417. 2016.
- FERNANDES, M. R.; MOURA, Q.; SARTORI, L.; SILVA, K. C.; CUNHA, M. P.; ESPOSITO, F.; LOPES, R.; OTUTUMI, L. K.; GONÇALVES, D. D.; DROPA, M.; MATTÉ, M. H.; MONTE, D. F. M.; LANDGRAF, M.; FRANCISCO, G. R.; BUENO, M. F. C.; GARCIA, D. O.; KNÖB, T.; MORENO, A. M.; LINCOPAN, N. Silent dissemination of colistin-resistant in South America could contribute to the global spread of the gene. **Euro Surveillance**, 21, 30214. 2016.
- GRADY, E. N.; MACDONALD, J.; LIU, L.; RICHMAN, A.; YUAN, Z. C. Current knowledge and perspectives of Paenibacillus: A review. **Microbial Cell Factories**, 15, 203–221. 2016.
- HALL, T. A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium**. Series, 41, 95–98. 1999.
- HEMBACH, N.; SCHMID, F.; ALEXANDER, J.; HILLER, C.; ROGALL, E. T.; SCHWARTZ, T. Occurrence of the *mcr-1* colistin resistance gene and other clinically relevant antibiotic resistance genes in microbial populations at different municipal wastewater treatment plants in Germany. **Frontiers in Microbiology**, 8, 1282. 2017.
- HERATH, E. M.; PALANSOORIYA, A. G. K. N.; DANDENIYA, W. S.; JINADASA, R. N. An assessment of antibiotic resistant bacteria in poultry litter and agricultural soils in Kandy district, Sri Lanka. **Tropical Agricultural Research**, 27, 389–398. 2016.

- HEUER, H.; SOLEHATI, Q.; ZIMMERLING, U.; KLEINEIDAM, K.; SCHLOTTER, M.; MÜLLER, T.; FOCKS, A.; THIELE-BRUHN, S.; SMALLA, K. Accumulation of sulfonamide resistance genes in arable soils due to repeated application of manure containing sulfadiazine. **Applied and Environmental Microbiology**, 77, 2527–2530. 2011.
- LANDMAN, D.; GEORGESCU, C.; MARTIN, D. A.; QUALE, J. Polymyxins revisited. **Clinical Microbiology Reviews**, 21, 449–465. 2008.
- LI, J.; SHI, X.; YIN, W.; WANG, Y.; SHEN, Z.; DING, S.; WANG, S. A multiplex SYBR green real-time PCR assay for the detection of three Colistin resistance genes from cultured bacteria, feces, and environment samples. **Frontiers in Microbiology**, 8, 2078. 2017.
- LIU, Y. Y.; WANG, Y.; WALSH, T. R.; YI, L. X.; ZHANG, R.; SPENCER, J.; DOI, Y.; TIAN, G.; DONG, B.; HUANG, X.; YU, L. F.; GU, D.; REN, H.; CHEN, X.; LV, L.; HE, D.; ZHOU, H.; LIANG, Z.; LIU, J. H.; SHEN, J. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. **The Lancet Infectious Diseases**, 16, 161–168. 2015.
- MCEACHRAN, A. D.; BLACKWELL, B. R.; HANSON, J. D.; WOOTEN, K. J.; MAYER, G. D.; COX, S. B.; SMITH, P. N. Antibiotics, bacteria, and antibiotic resistance genes: Aerial transport from cattle feed yards via particulate matter. **Environmental Health Perspectives**, 123, 337–343. 2015
- MARTINEZ, J. L. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. **Environmental Pollution**, 157, 2893–2902. 2009.
- MOORE, P. A.; DANIEL, T. C.; SHARPLEY, A. N.; WOOD, C. W. Poultry manure management: Environmentally sound options. **Journal of Soil and Water Conservation**, 50, 321–327. 1995.
- OLAITAN, A. O.; MORAND, S.; ROLAIN, J. M. Mechanisms of polymyxin resistance: Acquired and intrinsic resistance in bacteria. **Frontiers in Microbiology**, 5, 643. 2014
- PENG, S.; WANG, Y.; ZHOU, B.; LIN, X. Long-term application of fresh and composted manure increase tetracycline resistance in the arable soil of eastern China. **Science of the Total Environment**, 506, 279–286. 2015.
- RHOUMA, M.; BEAUDRY, F.; LETELLIER, A. Resistance to colistin: What is the fate for this antibiotic in pig production? **International Journal of Antimicrobial Agents**, 48, 119–126. 2016.
- RODRIGUES, N. M. B.; BRONZATO, G. F.; SANTIAGO, G. S.; BOTELHO, L. A. B.; MOREIRA, B. M.; COELHO, I. S.; SOUZA, M. M. S.; COELHO, S. M. O. The matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) identification versus biochemical tests: A study with enterobacteria from a dairy cattle environment. **Brazilian Journal of Microbiology**, 48, 132–138. 2017.
- SARMAH, A. K. & MEYER, M. T.; BOXALL, A. B. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. **Chemosphere**, 65, 725–759. 2006.

SAS. STAT User's guide for personal computers, release 6.12. Cary, NC: SAS Institute Inc.
Song, W., Ding, Y., Chiou, C. T., & Li, H. (2010). Selected veterinary pharmaceuticals in agricultural water and soil from land application of animal manure. **Journal of Environmental Quality**, 39, 1211–1217. 2001.

SUN, P.; BI, Z.; NILSSON, M.; ZHENG, B.; BERGLUND, B.; LUNDBORG, C. S.; NILSSON, L. E. Occurrence of *blaKPC-2*, *blaCTX-M* and *mcr-1* in Enterobacteriaceae from well water in rural China. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 61, e02569–e02516. 2017.

SUZUKI, M. T.; TAYLOR, L. T.; DELONG, E. F. Quantitative analysis of small-subunit rRNA genes in mixed microbial populations via 50-nuclease assays. **Applied and Environmental Microbiology**, 66, 4605–4614. 2000.

UDI KOVIC-KOLIC, N., WICHMANN, F., BRODERICK, N. A., & HANDELSMAN, J. Bloom of resident antibiotic-resistant bacteria in soil following manure fertilization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 111, 15202–15207. 2014.

UNIÃO, D. O. 2012. Lei 12651/2012. Dispõe sobre a proteção da vegetação nativa; Altera as Leis 6.938, de 31 de agosto de 1981, 9.393, de 19 de dezembro de 1996, e 11.428, de 22 de dezembro de 2006; Revoga as Leis 4.771, de 15 de setembro de 1965, e 7.754, de 14 de abril de 1989, e a Medida Provisória 2.166 67, de 24 de agosto de 2001; e dá outras providências. Retrieved from <http://www2.camara.leg.br/legin/fed/lei/2012/lei-12651-25-maio-2012-613076-publicacaooriginal-136199-pl.html>

WANG, M.; LIU, P.; XIONG, W.; ZHOU, Q.; WANGXIAO, J.; ZENG, Z.; SUN, Y. Fate of potential indicator antimicrobial resistance genes (ARGs) and bacterial community diversity in simulated manure-soil microcosms. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 147, 817–823. 2017.

WU, N.; QIAO, M.; ZHANG, B.; CHENG, W. D.; ZHU, Y. G. Abundance and diversity of tetracycline resistance genes in soils adjacent to representative swine feedlots in China. **Environmental Science & Technology**, 44, 6933–6939. 2010.

YANG, Q.; ZHANG, H.; GUO, Y.; TIAN, T. Influence of chicken manure fertilization on antibiotic-resistant bacteria in soil and the endophytic bacteria of pakchoi. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, 13, 662. 2016.

ZHU, Y.; JOHNSON, T. A.; SU, J.; QIAO, M.; GUO, G.; STEDTFELD, R. D.; HASHSHAM, S. A.; TIEDJE, J. M. Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 1109, 3435–3440. 2013.

5 CAPÍTULO III

PERSISTÊNCIA DE GENES DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DURANTE O PROCESSO DE COMPOSTAGEM DE CAMA DE AVIÁRIO

5.1 RESUMO

A cama de aviário é um resíduo oriundo da produção avícola amplamente utilizado na agricultura. E, embora proporcione benefícios ao solo e conseqüentemente às plantas, se não bem manejada, pode ser um veículo de contaminação ambiental de patógenos natural da microbiota intestinal das aves, resíduos de antimicrobianos e metais pesados que são administrados em animais para diferentes finalidades e não são totalmente metabolizados no organismo, bactérias resistentes e genes de resistência a antimicrobianos. A compostagem é uma prática de manejo difundida e muito utilizada com comprovada eficácia para reduzir possíveis contaminantes, especialmente microrganismos patogênicos. Entretanto, estudos anteriores demonstram que não há uma eficácia garantida na eliminação total de determinantes de resistência a antimicrobianos. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da compostagem da cama de aviário na persistência de genes de resistência a antimicrobianos por um período de 120 dias. O processo foi conduzido em composteira com capacidade de 98 L, a qual foi adicionada 45 Kg de cama de aviário. As amostras foram coletadas no tempo 0, 30, 60, 90 e 120 dias seguida da extração de DNA total e amplificação do gene 16S rDNA e os dos genes de resistência a β -lactâmicos (*bla_{ampC}*), sulfonamidas (*sul1* e *sul2*) e colistina (*mcr-1*) pela técnica da reação em cadeia da polimerase. O gene *bla_{ampC}* que foi detectado somente no tempo 0 dias, porém os genes *sul1*, *sul2* e *mcr-1* foram detectados mesmo após 120 dias de compostagem. Uma vez que a máxima temperatura alcançada na compostagem foi de 56° C, variando de 41 °C a 56 °C, por 27 dias, sugere-se que esta pode não ter sido suficiente para eliminação dos genes *sul1*, *sul2* e *mcr-1*. Além disso, a presença e estabilidade de antimicrobianos e metais pesados podem favorecer a manutenção, disseminação e persistência destes genes de resistência. Esta informação é crucial para reiterar a necessidade de implementar normas para a gestão de resíduos e estabelecer parâmetros de qualidade para sua reutilização na agricultura, uma vez que o efeito da compostagem não é padronizado nos diferentes contaminantes e é dependente das condições e materiais utilizados no processo.

Palavras chaves: *bla_{ampC}*. *mcr-1*. *sul1*. *sul2* Contaminação ambiental. Produção avícola

5.2 ABSTRACT

The poultry manure is a residue derived from poultry production widely used in agriculture. Although it provides benefits to the soil and consequently to plants, if not well managed, can be a vehicle of environmental contamination of pathogens natural intestinal microbiota of poultry, residues of antimicrobials and heavy metals that are used in animals for different purposes and are not fully metabolized in the organism, resistant bacteria and antimicrobial resistance genes. Composting is a widespread and widely used practice with proven efficacy to reduce possible contaminants, especially pathogenic microorganisms. However, previous studies show that there is no guaranteed efficacy in the total elimination of resistance determinants to antimicrobials. In this context, this study aimed to evaluate the effect of poultry manure composting on the persistence of antimicrobial resistance genes for a period of 120 days. The process was conducted in a compost bin with capacity for 98 L, in which was added 45 Kg of poultry manure. The samples were collected at 0, 30, 60, 90 and 120 days followed by total DNA extraction and amplification of the 16S rDNA gene and those of the resistance genes β -lactamics (*bla_{ampC}*), sulfonamides (*sul1* and *sul2*) and colistin (*mcr-1*) using the polymerase chain reaction technique. The *bla_{ampC}* gene was detected only at 0 days, however the genes *sul1*, *sul2* and *mcr-1* were detected even after 120 days of composting. Since the maximum temperature achieved in composting was 56 °C, ranging from 41 °C to 56 °C, for 27 days, it is suggested that this may not have been enough to eliminate the genes *sul1*, *sul2* and *mcr-1*. Furthermore, the presence and stability of antimicrobials and heavy metals may favor the maintenance, dissemination and persistence of these resistance genes. This information is crucial to emphasize the need to implement standards for waste management and to establish quality parameters for its reuse in agriculture, since the effect of composting is not standardized on different contaminants and depends on the conditions and materials used in the process.

Keywords: *bla_{ampC}*. *mcr-1*. *sul1*. *sul2*. Environmental contamination. Poultry production

5.3 INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de aviário com 48.426.232 matrizes de corte em 2017 (ABPA, 2017). Entretanto, a alta produção tem como consequência a geração de grande quantidade de cama de aviário como resíduo, com volume anual estimado em torno de 8-10 milhões de toneladas ano⁻¹ (DALÓLIO et al., 2017). A geração desses resíduos é uma preocupação para o setor agrícola que busca cada vez mais alternativas sustentáveis para sua disposição no ambiente.

A principal destinação da cama de aviário é seu uso como fertilizante orgânico devido ao seu alto potencial de aporte nutricional e incremento de matéria orgânica melhorando as características físico-químicas do solo (BLUM et al., 2003). Entretanto, a cama de aviário contém muitos gêneros de bactérias, que são comuns da microbiota intestinal das aves, capazes de causar doenças em humanos e que podem sobreviver até onze semanas fora do sistema digestivo sendo *Escherichia coli*, *Salmonella* e *Campilobacter* os principais presentes (HAAPAPURO et al., 1997; OAKLEY et al., 2014). Esses patógenos são conhecidos por carregarem plasmídeos com genes de resistência a antimicrobianos contribuindo para sua disseminação no ambiente representando um risco à saúde humana e animal (PAL et al., 2015).

Neste sentido, é preconizado a busca de alternativas de manejo que resultem na redução ou eliminação de patógenos e compostos indesejáveis para garantir a seguridade do seu uso como fertilizante. A compostagem é um processo natural de decomposição de matéria orgânica por microrganismos aeróbicos sob condições controladas, que viabiliza a ciclagem de macro e micronutrientes (INÁCIO & MILLER, 2009). O processo consiste em três fases, a saber: mesofílica, termofílica e de maturação. Os primeiros microrganismos a colonizarem a pilha dos resíduos sólidos são as bactérias mesofílicas, actinobacteria, fungos e protozoários devido ao potencial de crescimento ótimo entre 10 e 45 °C (COOPERBAND, 2000). Em consequência da atividade microbiana na quebra dos componentes que são mais facilmente degradáveis como açúcares e aminoácidos ocorre um aumento da temperatura variando entre 45 a 60 °C acarretando a substituição dos microrganismos mesofílicos pelos termofílicos dentro de 24 a 72 horas após a formação da pilha. À medida que os substratos se tornam um fator limitante para atividade microbiana a temperatura diminui e os microrganismos mesofílicos recolonizam a pilha iniciando a fase de maturação. O composto é considerado estável quando a temperatura do núcleo da pilha atinge níveis próximos ao do ambiente e a concentração de oxigênio permanece maior que 5% por vários dias (COOPERBAND, 2000).

A compostagem, quando bem conduzida, elimina a maioria dos patógenos presentes, o que reduz o risco de contaminação do ambiente. Todavia, não há um consenso sobre seu efeito na eliminação dos genes de resistência a antimicrobianos, que tem variado em função do tipo do material, que pode ser proveniente de bovino, frango, porco, cavalo, e outros, e das condições de condução da compostagem (CUI et al., 2016).

Com isso, o objetivo deste capítulo foi avaliar o efeito da compostagem de cama de aviário, corriqueiramente utilizada como fertilizante orgânico, na persistência de genes de resistência a antimicrobianos.

5.4 MATERIAL E MÉTODOS

A coleta das amostras de cama de aviário, a condução do processo da compostagem e a caracterização físico-química e de elementos-traço foram realizadas pela discente de Doutorado do Curso de Pós-graduação em Agronomia – Ciências dos Solos, Camila da Costa Barros de Souza, orientada do prof. prof. Nelson Moura Brasil do Amaral Sobrinho.

5.4.1 Caracterização da Compostagem e Amostragem

A compostagem foi realizada na área experimental da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, utilizando o resíduo de cama de aviário oriundo de granjas da cidade de São José do Vale do Rio Preto, principal centro avícola do Estado do Rio de Janeiro. Foi adicionado uma quantidade de 45 kg de material em composteiras com capacidade de 50 kg, o qual foi compostado por um período de 120 dias. A homogeneização do composto foi realizada por revolvimento manual de acordo com a temperatura da mesma. A temperatura foi continuamente monitorada durante o processo utilizando um termômetro de mercúrio. A umidade do composto foi mantida em torno de 60% através da adição de água.

Amostras representativas foram coletadas no tempo 0, 30, 60, 90 e 120 dias de compostagem.

5.4.2 Extração de DNA de Bactérias Utilizadas como Controle positivo

Os controles positivos das reações de PCR foram obtidos a partir da extração de DNA de cepas de *Escherichia coli* resistentes a sulfonamida e colistina isoladas de aves provenientes de granjas avícolas do estado do Rio de Janeiro, pelo, então doutorando, Ramon Loureiro Pimenta, do curso de Pós-graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária, sob a orientação da professora Miliane Moreira Soares de Souza.

Para extração de DNA, cinco isolados em duplicatas foram cultivados em 5 mL do meio de cultura líquido BHI (*Brain Heart Infusion*) à temperatura ambiente a 150 RPM. Após 16 h, 1,5 mL de cada cultura foram transferidos para microtubos e centrifugados a 16.873g por 1 min, para sedimentar as células (HE, 2011). Esse processo foi repetido por três vezes para concentrar o maior número de células possível. Após o descarte do sobrenadante, o precipitado foi ressuspenso em 600 µL de tampão de lise (TE - 10 mM de Tris-HCl pH 8,0 e 1 mM de EDTA, SDS 10% e 20 mg/mL⁻¹ proteinase K) e incubado a 37 °C por 1 h (HE, 2011). Após esfriar a temperatura ambiente, foram adicionados 600 µL de clorofórmio álcool isoamílico (24:1), foram homogeneizadas por 2 min, e centrifugadas a 14.549g por 10 min. Aproximadamente 600 µL do sobrenadante de cada amostra foram transferidos para um novo microtubo para adição de igual volume de clorofórmio álcool isoamílico (24:1). Em seguida as amostras foram centrifugadas a 14.549g por 10 min e aproximadamente 400 µL do sobrenadante foram transferidos para um novo microtubo com o mesmo volume de isopropanol gelado. As amostras foram incubadas a -20°C, para precipitação do DNA, e após 12 horas foram centrifugadas a 14.549g por 30 min. O precipitado foi lavado com 200 µL de etanol 70% por duas vezes e após secar a temperatura ambiente, foi ressuspenso em 30 µL de água ultrapura.

5.4.3 Extração de DNA Diretamente do Composto

A extração do DNA total do composto foi realizada utilizando o kit PowerSoil DNA Isolation (MO BIO Laboratories INC.) segundo protocolo fornecido pelo fabricante.

5.4.4 Avaliação da Quantidade e Qualidade do DNA Total

Após a extração, as amostras foram armazenadas a -20°C , e a quantidade e a qualidade do DNA obtido também foram avaliadas por espectrofotômetro (Nano Drop ND-1000 Spectrophotometer - Thermo Fisher Scientific). A integridade do DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 0,8% acrescido de SYBR green (Invitrogen), a fim de realizar estimativas de concentração, comparando a intensidade da banda da amostra com a intensidade da banda do marcador fago Lambda (λ) (Pomega), nas concentrações de 25 e 50 ng. O gel foi visualizado sob luz UV 254 nm e as imagens foram capturadas com a utilização do sistema de fotodocumentação L-PIX EX (Loccus Biotecnologia). Para amplificação do DNA total das amostras de compostagem, estas foram diluídas em água ultrapura para que fosse obtido concentrações de DNA entre $10\text{ ng }\mu\text{L}^{-1}$ a $20\text{ ng }\mu\text{L}^{-1}$ e diminuir a concentração de possíveis contaminantes que podem estar presentes nas amostras, inibindo consequentemente a reação de PCR.

5.4.5 Amplificação dos Genes de Resistência a Antimicrobianos

O gene 16S rDNA e os genes que conferem resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos (*bla_{ampC}*), sulfonamida (*sul1* e *sul2*) e colistina (*mcr-1*) foram detectados através da técnica de PCR, utilizando os *primers* descritos na Tabela 1. Para as reações de PCR foram utilizados 1X de tampão de reação, 1 U de Taq DNA polimerase, 2,5 mM de MgCl_2 , 0,2 mM de dNTP e 0,4 μM de cada *primer*. A condição de amplificação para o gene 16S rRNA foi realizada com os seguintes parâmetros: 5 min de desnaturação inicial a 94°C , 30 ciclos de 94°C por 1 min, 55°C por 1 min, 72°C por 1 min, seguida de uma elongação final a 72°C por 10 min. Para os genes de resistência *bla_{ampC}*, *sul1* e *sul2* os parâmetros foram: 5 min de desnaturação inicial a 95°C , 40 ciclos de 95°C por 30 s, 60°C por 30 s, 72°C por 30 s, seguida de uma elongação final a 72°C por 7 min. E para o gene *mcr-1* a condição de amplificação foi: 15 min de desnaturação inicial a 94°C , 25 ciclos de 94°C por 30 s, 58°C por 90 s, 72°C por 60 s, seguida de uma elongação final de 72°C por 10 min. Os produtos das reações de PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1,5% sob luz UV no sistema de fotodocumentação L-PIX EX (Loccus Biotecnologia).

Tabela 1. Sequência de primers utilizados na amplificação do gene 16S rDNA e dos genes que codificam resistência a β -lactâmico, sulfonamida e colistina

<i>Primers</i>	Sequência 5'-3'	Tamanho do amplicon	Referência
27-F 1512-R	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG ACGGCTACCTTGTTACGACT	1500pb	SUZUKI & GIOVANNONI, 1996; KANE et al. 1993)
ampC-F ampC-R	CCCCGCTTATAGAGCAACAA TCAATGGTCGACTTCACACC	634 pb	SOBIA et al., 2011
Sul1-F Sul1-R	CGCACCGGAAACATCGCTGCAC TGAAGTTCGCCGCAAGGCTCG	162 pb	PEI et al., 2006
Sul2-F Sul2-R	TCCGGTGGAGGCCGGTATCTGG CGGGAATGCCATCTGCCTTGAG	190 pb	PEI et al., 2006
mcr-1F mcr-1R	CGGTCAAGTCCGTTTGTTC CTTGGTCCGGTCTGTAGGG	309 pb	LIU et al., 2015

5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O gene 16S rDNA foi detectado em todas as amostras evidenciando a presença de DNA em quantidade e qualidade suficiente para ser utilizado como molde para amplificação dos genes que codificam resistência aos antimicrobianos. O gene *bla_{ampC}* foi detectado somente no tempo zero de compostagem. Já os genes *sul1*, *sul2* e *mcr-1* foram detectados até 120 dias de compostagem (Tabela 2).

Tabela 2. Detecção dos genes 16S rDNA, *bla_{ampC}*, *sul1*, *sul2* e *mcr-1* nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 dias de compostagem

Tempo (dias)	16S rDNA	<i>bla_{ampC}</i>	<i>sul1</i>	<i>sul2</i>	<i>mcr-1</i>
0	+	+	+	+	+
30	+	-	+	+	+
60	+	-	+	+	+
90	+	-	+	+	+
120	+	-	+	+	+

Presença (+) e ausência (-) de gene.

Vários fatores podem afetar a prevalência de genes de resistência a antimicrobianos durante o processo de compostagem. Dentre os principais, podemos citar a concentração de antimicrobianos e metais pesados e a temperatura da compostagem (LIAO et al., 2017; AWASTHI et al., 2019).

Em média, 80% dos antimicrobianos administrados em animais para fins profilático, terapêutico ou aditivo zootécnico não são metabolizados completamente no organismo e são usualmente excretados como substância inalterada ou como metabólitos que ainda podem estar ativos, sendo descarregados no ambiente através de esterco animal (HEUER et al., 2011).

A degradação dos antimicrobianos é inversamente proporcional à sua concentração no solo. Demoling et al. (2009) aplicaram uma concentração de sulfametoxazole de 500, 20 e 1 mg Kg⁻¹ de solo e após 5 semanas observaram concentração de 153, 1,5 e 0,04 mg Kg⁻¹, representando uma redução de 70, 92,5 e 96%, respectivamente. Uma tendência similar foi observada por Cui et al. (2014) em doses crescentes de ciprofloxacina de 1, 5 e 50 mg Kg⁻¹ de solo seco que teve redução na degradação de aproximadamente 60, 54 e 28%, respectivamente, em 40 dias. A maior concentração dos antimicrobianos pode prolongar sua persistência no solo devido à inibição de atividade de alguns microrganismos, especialmente, àqueles relacionados à sua degradação (PAN & CHU, 2016). Além disso, a maior concentração de antimicrobianos acarreta a seleção de microrganismos resistentes o que favorece a manutenção, circulação e disseminação de genes de resistência a antimicrobianos no ambiente.

É comum a prática de suplementação de metais pesados nos alimentos para animais de produção com intuito de promover saúde e crescimento (AARESTRUP & HASMAN, 2004; HEJNA et al., 2017). E como acontece com os antimicrobianos, grande quantidade do que é administrado aos animais é excretado. Em estudo realizado nos EUA para caracterizar o papel da suplementação alimentar com metal pesado observou-se que cerca de 90% de cobre e zinco que foram adicionados na alimentação foram encontrados nas fezes (MEDARDUS et al., 2014).

A presença de metal pesado também pode contribuir para a seleção de bactérias resistentes a antimicrobianos através de mecanismos de co-resistência e resistência cruzada (IMRAM et al., 2019). Lu e colaboradores (2015) investigando os fatores que influenciam na

manutenção e propagação dos genes de resistência a sulfonamidas (*sul1*, *sul2* e *sul3*) observaram uma correlação positiva entre os genes de resistência e os metais pesados Cr, Co, Ni, Cu, Zn e Pb tendo estes um coeficiente de correlação maior do que o observado com a presença do antimicrobiano. Jia et al. (2012) também observaram que os níveis de genes de resistência a sulfonamidas foi relativamente independente das concentrações do antimicrobiano, porém foi fortemente associado com os níveis dos metais pesados Cu, Zn e Hg no esterco e solo. Berg et al. (2005) objetivando determinar se adubação com Cu afeta a frequência de resistência a esse micronutriente e padrões de resistência a antimicrobianos em bactérias nativas do solo observaram que houve diferença significativa para resistência contra β -lactâmicos e sulfanilamida, ou seja, além da seleção de resistência ao Cu o incremento deste metal no solo seleciona indiretamente resistência a antimicrobianos em bactérias resistentes ao cobre. O cobre também tem sido relacionado a seleção e expansão do gene *mcr-1* em clones de *Salmonella* tolerantes a este metal, carreando o gene *pcoD* + *silA* no cromossomo (CAMPOS et al., 2016). A correlação de genes de resistência a metais pesados e antimicrobianos é alarmante uma vez que os metais pesados não são degradados o que permite a conservação e circulação dos genes de resistência a antimicrobianos no ambiente.

A temperatura tem sido considerada um fator crucial na eliminação de genes de resistência a antimicrobianos na compostagem, porém não há uma definição da temperatura necessária para eliminação completa dos genes. Alguns autores afirmam que um período de 15 dias à temperatura acima de 70 °C, alcançada em compostagem hipertermófila, contribui para a maior eficiência no tratamento devido à completa desnaturação de DNA e degradação de genes de resistência a antimicrobianos (LAPARA & DIEHL, 2010; LIAO et al., 2017). Outros sugerem que, durante a fase termofílica, caracterizada por temperaturas acima de 45°C, pode ocorrer a morte de muitas espécies de bactérias e degradação do DNA liberado reduzindo consequentemente a abundância de alguns genes de resistência (YOUNGQUIST et al., 2016).

No presente trabalho, durante o processo de compostagem, temperaturas acima de 40°C foram atingidas em 2 dias tendo esta fase duração total de 30 dias. Após esse período teve início a fase mesofílica caracterizada por variação de temperatura no composto de 26°C a 34°C com duração de 30 dias. Com substrato se tornando limitante ocorre a diminuição da atividade microbiana seguida da diminuição da temperatura, a qual se equiparou com a temperatura ambiente registrando o início da fase de maturação até os 120 dias (Figura 1).

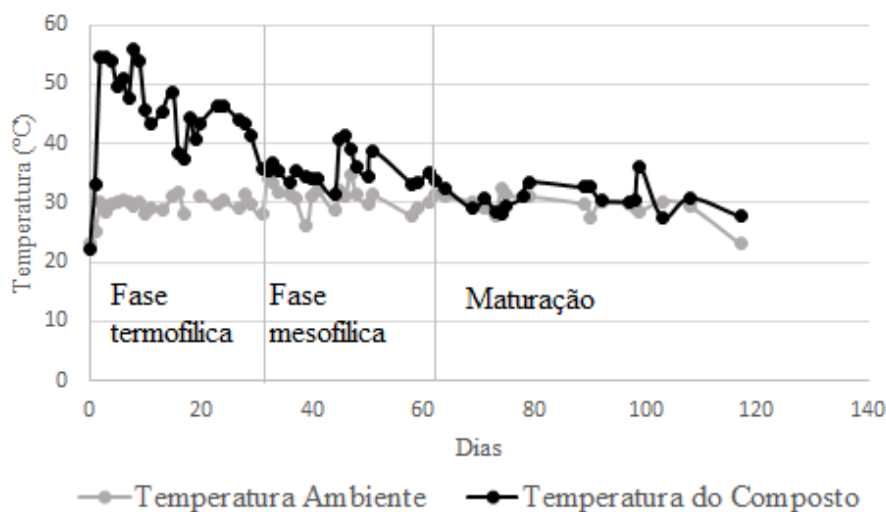


Figura 1. Temperatura do da cama de aviário durante 120 dias de compostagem.

A compostagem tem potencial de reduzir a concentração e a biodisponibilidade de antimicrobianos, bem como de bactérias e genes de resistência presentes (YOUNGQUIST et al., 2016). Porém, devido às variações inerentes aos diferentes resíduos (na concentração de antimicrobianos, metais pesados, diversidade bacteriana, dentre outros), variações nos métodos de condução da compostagem, que levam a variações nas máximas temperaturas atingidas, não há ainda um consenso de um método otimizado que garanta a eliminação de genes de resistência durante este processo.

Selvam e colaboradores (2012) afirmaram que a compostagem foi um método eficiente na eliminação de genes de resistência a sulfonamida, tetraciclina e ciprofloxacina em esterco de suínos após 42 dias. Storteboom et al. (2007) estudaram o efeito da alta e baixa intensidade das técnicas de manejo na abundância de genes de resistência a antimicrobianos em esterco de cavalo contaminado com clortetraciclina, tilosin e monesin e observaram que embora a intensidade do manejo tenha influenciado na taxa de disseminação dos genes de resistência, não foi um fator significativo na redução dos níveis de genes de resistência a antimicrobianos, e a diminuição nos genes de resistência *tet* (W) e *tet* (O) ocorreu somente após seis meses de tratamento. Porém, outros estudos relatam que a compostagem aumenta a abundância de ARG. Qian et al (2016) exploraram o efeito da compostagem de esterco bovino com adição de diferentes concentrações de oxitetraciclina e sua capacidade de atenuar ARGs e encontraram que a abundância relativa dos ARGs *tet* (C), *tet* (X), *sul1*, *sul2* e *int1* aumentou enquanto a abundância relativa de *tet*(Q), *tet*(M), *tet*(W) diminuiu.

Neste estudo, mesmo após 120 dias de compostagem foi possível detectar os genes *sul1*, *sul2* e *mcr-1*. Nossa hipótese é que a máxima temperatura alcançada, em torno de 56° C, e o período de constância, entre 41 °C e 56 °C por 27 dias, pode não ter sido suficiente para eliminação destes genes. Além disso, a presença de antimicrobianos e metais pesados neste resíduo pode ter favorecido a manutenção, disseminação e persistência destes genes de resistência.

A utilização de resíduos da produção animal na agricultura é uma prática de manejo ambientalmente e economicamente viável que contribui para sustentabilidade a longo prazo, uma vez que estes resíduos contêm nutrientes essenciais para o desenvolvimento das plantas e pode repor ou complementar a fertilização mineral em muitos tipos de sistema de produção agrícola (JIN et al., 2015). Porém, pode ser fontes de contaminantes como antimicrobianos, bactérias resistentes a antimicrobianos e genes de resistência a antimicrobianos (CHEN et al., 2016). Com isso, o manejo apropriado dos resíduos é fundamental para manter a miríade de benefícios proporcionados pelo incremento de matéria orgânica e ciclagem de nutrientes disponibilizados por este material, e deve ser levado em conta neste processo, a eliminação deste contaminantes que podem disseminar a resistência a antimicrobianos, que é um problema de saúde pública de âmbito global.

5.6 CONCLUSÕES

Após 30 dias de compostagem da cama de aviário o gene *bla_{ampC}* que confere resistência ao antimicrobiano da classe dos β -lactâmicos não foi mais detectado, indicando a eficiência do processo na eliminação deste gene.

Os genes *sul1*, *sul2* e *mcr-1* que codificam resistência para a classes de antimicrobianos sulfonamida e colistina, respectivamente, foram detectados até os 120 dias de compostagem.

5.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARESTRUP, F. M. & HASMAN, H. Susceptibility of different bacterial species isolated from food animals to copper sulphate, zinc chloride and antimicrobial substances used for disinfection. **Veterinary Microbiology**, v. 100, n. 1–2, p. 83–89, 2004.

ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. 2017. Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/mercado-mundial>>. Acesso em: 24 de novembro de 2018.

AWASTHI, M. K.; LIU, T.; CHEN, H.; VERMA, S.; DUAN, Y.; AWASTHI, S. K.; WANG, Q.; REN, X.; ZHAO, J.; ZHANG, Z. The behavior of antibiotic resistance genes and their associations with bacterial community during poultry manure composting. **Bioresource Technology**, v. 280, n. February, p. 70–78, 2019.

BERG, J.; TOM-PETERSEN, A.; NYBROE, O. Copper amendment of agricultural soil selects for bacterial antibiotic resistance in the field. **Letters in Applied Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 146–151, 2005.

BLUM, L. E. B.; AMARANTE, C.V.T.; GÜTTLER, G.; MACEDO, A. F.; KOTHE, D. M.; SIMMLER, A. O.; PRADO, G.; GUIMARÃES, L.S. Produção de moranga e pepino em solo com incorporação de cama aviária e casca de pinus. **Horticultura Brasileira**, v. 21, n. 4, p. 627–631, 2003.

CAMPOS, J.; CRISTINO, L.; PEIXE, L.; ANTUNES, P. MCR-1 in multidrug-resistant and copper-tolerant clinically relevant *Salmonella* 1,4,[5], 12:i:- and S. Rissen clones in Portugal, 2011 to 2015. **Eurosurveillance**, v. 21, n. 26, p. 1–5, 2016.

CHEN, Q.; AN, X.; LI, H.; SU, J.; MA, Y.; ZHU, Y. G. LONG-TERM field application of sewage sludge increases the abundance of antibiotic resistance genes in soil. **Environment International**, v. 92–93, p. 1–10, 2016.

COOPERBAND, L. R. Composting: Art and Science of Organic Waste Conversion. **Laboratory Medicine**, v. 31, n. JUNE, p. 283–290, 2000.

CUI, E.; WU, Y.; ZUO, Y.; CHEN, H. Effect of different biochars on antibiotic resistance genes and bacterial community during chicken manure composting. **Bioresource Technology**, v. 203, p. 11–17, 2016.

CUI, H.; WANG, S. P.; FU, J.; ZHOU, Z. Q.; ZHANG, N.; GUO, L. Influence of ciprofloxacin on microbial community structure and function in soils. **Biology and Fertility of Soils**, v. 50, n. 6, p. 939–947, 2014.

DALÓLIO, F. S.; SILVA, J. N.; OLIVEIRA, A. C. C.; TINÔCO, I. F. F.; BARBOSA, R. C.; RESENDE, M. O.; ALBINO, L. F. T.; COELHO, S. T. Poultry litter as biomass energy: A review and future perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 76, n. March, p. 941–949, 2017.

DEMOLING, L. A.; BÅÅTH, E.; GREVE, G.; WOUTERSE, M.; SCHMITT, H. Effects of sulfamethoxazole on soil microbial communities after adding substrate. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 41, n. 4, p. 840–848, 2009.

HAAPAPURO, E. R.; BARNARD, N. D.; SIMON, M. Haapapuro, E. R. Review Article Waste Used as Livestock Feed Dangers to Human Health. **Preventive Medicine**, v. 602, p. 599–602, 1997.

HE, F. *E. coli* Genomic DNA Extraction. **Bio-protocol**, [s.l.], v. 1, n. 14, p.1-3, 2011.

HEUER, H., SOLEHATI, Q., ZIMMERLING, U., KLEINEIDAM, K., SCHLOTTER, M., MÜLLER, T., FOCKS, A., THIELE-BRUHN, S., SMALLA, K. Accumulation of sulfonamide resistance genes in arable soils due to repeated application of manure containing sulfadiazine. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 7, p. 2527-2530, 2011.

HEJNA, M.; GOTTARDO, D.; BALDI, A.; DELL'ORTO, V.; CHELI, F.; ZANINELLI, M.; ROSSI, L. Nutritional ecology of heavy metals. **Animal**, v. 12, n. 10, p. 2156-2170, 2017.

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

INÁCIO, C. T. & MILLER, P. R. Compostagem – Ciência e prática para a gestão de resíduos orgânicos. Rio de Janeiro: **Embrapa Solos**, 154 p. 2009.

JIA, A.; WAN, Y.; XIAO, Y.; HU, J. Occurrence and fate of quinolone and fluoroquinolone antibiotics in a municipal sewage treatment plant. **Water Research**, v. 46, n. 2, p. 387–394, 2012.

JIN, J.; SUN, K.; WANG, Z.; HAN, L.; PAN, Z.; WU, F.; LIU, X.; ZHAO, Y.; XING, B. Characterization and phthalate esters sorption of organic matter fractions isolated from soils and sediments. **Environmental pollution**, v. 206, p. 24-31, 2015.

KANE, M. D.; POULSEN, L. K.; STAHL, D. A. Monitoring the enrichment and isolation of sulfate-reducing bacteria by using oligonucleotide hybridization probes designed from environmentally derived 16S rRNA sequences. **Applied and Environment Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 682-686, 1993.

LAPARA, T. M. & DIEHL, D. L. Effect of temperature on the fate of genes encoding TC resistance and the integrase of class 1 integrons within anaerobic and aerobic digesters treating municipal wastewater solids. **Environmental Science and Technology**, v. 44, n. 23, p. 9128–9133, 2010.

LIAO, H.; LU, X.; RENSING, C.; FRIMAN, V. P.; GEISEN, S.; CHEN, Z.; YU, Z.; WEI, Z.; ZHOU, S.; ZHU, Y. Hyperthermophilic Composting Accelerates the Removal of Antibiotic Resistance Genes and Mobile Genetic Elements in Sewage Sludge. **Environmental Science and Technology**, v. 52, n. 1, p. 266–276, 2017.

LIU, Y. Y.; WANG, Y.; WALSH, T. R.; YI, L. X.; ZHANG, R.; SPENCER, J.; DOI, Y.; TIAN, G.; DONG, B.; HUANG, X.; YU, L. F.; GU, D.; REN, H.; CHEN, X.; LV, L.; HE, D.; ZHOU, H.; LIANG, Z.; LIU, J. H.; SHEN, J. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 2, p. 161-168, 2015.

LU, Z.; NA, G.; GAO, H.; WANG, L.; BAO, C.; YAO, Z. Fate of sulfonamide resistance genes in estuary environment and effect of anthropogenic activities. **Science of the Total Environment**, v. 527, p. 429-438, 2015

MEDARDUS, J. J.; MOLLA, B. Z.; NICOL, M.; MORROW, W. M.; RAJALA-SCHULTZ, P. J.; KAZWALA, R.; GEBREYES, W. A. In-feed use of heavy metal micronutrients in U.S. swine production systems and its role in persistence of multidrug-resistant salmonellae. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 7, p. 2317–2325, 2014.

MO BIO Laboratories INC. **Power Soil DNA Isolation Kit**. Disponível em: <<https://mobio.com/media/wysiwyg/pdfs/protocols/12888.pdf>> Acesso em: 05 de novembro de 2017

NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.8. **User's Manual**, 2010. Disponível em: <<http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/nd-1000-v3.8-users-manual-8%205x11.pdf>> Acesso em: 15 de junho de 2018.

OAKLEY, B. B.; LILLEHOJ, H. S.; KOGUT, M. H.; KIM, W. K.; MAURER, J. J.; PEDROSO, A.; LEE, M. D.; COLLET, S. R.; JOHNSON, T. J.; COX, N. A. The chicken gastrointestinal microbiome. **FEMS Microbiology Letters**, v. 360, n. 2, p. 100–112, 2014.

PAL, C.; BENGTSSON-PALME, J.; KRISTIANSOON, E.; LARSSON, D. J. Co-occurrence of resistance genes to antibiotics, biocides and metals reveals novel insights into their co-selection potential. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 1–14, 2015.

PAN, M. & CHU, L. M. Leaching behavior of veterinary antibiotics in animal manure-applied soils. **Science of the Total Environment**, v. 579, p. 466–473, 2016.

PEI, R.; KIM, S. C.; CARLSON, K. H.; PRUDEN, A. Effect of river landscape on the sediment concentrations of antibiotics and corresponding antibiotic resistance genes (ARG). **Water research**, v. 40, n. 12, p. 2427-2435, 2006.

QIAN, X.; SUN, W.; GU, J.; WANG, X. J.; SUN, J. J.; YIN, Y. N.; DUAN, M. L. Variable effects of oxytetracycline on antibiotic resistance gene abundance and the bacterial community during aerobic composting of cow manure. **Journal of Hazardous Materials**, v. 315, p. 61–69, 2016.

SELVAM, A.; ZHAO, Z.; WONG, J. W. C. Composting of swine manure spiked with sulfadiazine, chlortetracycline and ciprofloxacin. **Bioresource Technology**, v. 126, p. 412–417, 2012.

SOBIA, F.; SHAHID, M.; SINGH, A.; KHAN, H. M.; SHUKLA, I.; MALIK, A. Occurrence of *bla_{ampC}* in Cefoxitin-resistant 'Escherichia coli' and 'Klebsiella pneumoniae' Isolates from a North Indian Tertiary Care Hospital. **New Zealand Journal of Medical Laboratory Science**, v. 65, n. 1, p. 5, 2011.

STORTEBOOM, H. N.; KIM, S. C.; DOESKEN, K. C.; CARLSON, K. H.; DAVIS, J. G.; PRUDEN, A. Response of antibiotics and resistance genes to high-intensity and low-intensity manure management. **Journal of Environmental Quality**, v. 36, n. 6, p. 1695-1703, 2007.

SUZUKI, M. T. & GIOVANNONI, S. J. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. **Applied Environment Microbiology**, v. 62, n. 2, p. 625-630, 1996.

YOUNGQUIST, C. P.; MITCHELL, S. M.; COGGER, C. G. Fate of Antibiotics and Antibiotic Resistance during Digestion and Composting: A Review. **Journal of Environment Quality**, v. 45, n. 2, p. 537, 2016.

6 CONCLUSÕES GERAIS

Este trabalho consistiu na pesquisa de genes de resistência a antimicrobianos em solos agrícolas que recebem cama de aviário fresca como complementação da adubação, a disseminação desses genes para áreas de reserva legal localizadas próximas às áreas de produção e a persistência desses genes no tempo 0, 30, 60, 90 e 120 dias de compostagem da cama de aviário.

Embora se confirmou que o uso de esterco animal pode incrementar genes de resistência no solo, o que favorece a disseminação desses genes no ambiente, a adubação com esterco animal é uma estratégia sustentável para destinar resíduos da produção animal. Assim é crucial que sejam estabelecidas práticas para eliminar os determinantes de resistência a antimicrobianos destes compostos para que eles sejam aplicados de forma segura nos solos.

A prática da compostagem é promissora para eliminação de patógenos e determinantes de resistência a antimicrobianos, entretanto foi observado que são necessárias adequações no processo para aumentar a eficiência na eliminação destes genes.

Os resultados aqui apresentados sinalizam a importância do entendimento das vias de disseminação de genes de resistência a antimicrobianos em áreas de produção agrícola, bem como os fatores que interferem na persistência e disseminação desses genes no ambiente, e reiteram que estratégias para reduzir a resistência antimicrobiana em animais e humanos devem incluir a prevenção do fluxo de genes de resistência antimicrobianos de/e para reservatórios ambientais, reforçando a importância do conceito de Saúde Única.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABPA. **Associação Brasileira de Proteína Animal**. 2017. Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/mercado-mundial>>. Acesso em: 24 de novembro de 2018.
- ADDISON, J. B. Antibiotics in sediments and run-off waters from feedlots. In: Residue reviews. **Springer**, New York, /N. p. 1-28. 1984.
- ALONSO, A.; SANCHEZ, P.; MARTINEZ, J. L. Environmental selection of antibiotic resistance genes. **Environmental Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 1–9, 2001.
- BAPTISTA, M.G.F.M. Mecanismos de Resistência aos Antibióticos. 2013. 51 f. Dissertação (Mestrado) - **Curso de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas**, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, Lisboa, 2013.
- BETTIOL, W. & GHINI, R. Solos supressivos. **Embrapa Meio Ambiente** – Capítulo em livro científico (ALICE), 2005.
- BOLAN, N. S.; SZOGI, A. A.; CHUASAVATHI, T.; SESHADRI, B., ROTHROCK, M. J.; PANNEERSELVAM, P. Uses and management of poultry litter. **World's Poultry Science Journal**, v. 66, n. 4, p. 673-698, 2010.
- BLUM, L. E. B.; AMARANTE, C.V.T.; GÜTTLER, G.; MACEDO, A. F.; KOTHE, D. M.; SIMMLER, A. O.; PRADO, G.; GUIMARÃES, L.S. Produção de moranga e pepino em solo com incorporação de cama aviária e casca de pinus. **Horticultura Brasileira**, v. 21, n. 4, p. 627–631, 2006.
- BRASIL, 2017. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Plano Nacional para a Prevenção e o Controle da Resistência Microbiana nos Serviços de Saúde. 2017.
- BRASIL, 2009. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 26 de 9 de julho de 2009**. Regulamento técnico para a fabricação, o controle de qualidade, a comercialização e o emprego de produtos Antimicrobianos de uso veterinário. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumospecuarios/alimentacao-animal/arquivos-alimentacao-animal/legislacao/instrucao-normativa-no-26-de-9-de-julho-de-2009.pdf/view>>. Acesso em: 20 de julho de 2018.
- BRASIL, 2015. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 44 de 15 de dezembro de 2015**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/produtos-veterinarios/legislacao-1/instrucoes-normativas/instrucao-normativa-sda-mapa-ndeg-44-de-15-12-2015.pdf/view>>. Acesso em: 23 de julho de 2017.
- BRASIL, 2016a. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 45 de 22 de novembro de 2016**. Diário Oficial da União. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/arquivos-alimentacao-animal/legislacao/instrucao-normativa-no-45-de-22-de-novembro-de-2016.pdf/view>>. Acesso em: 23 de julho de 2017.

BRASIL, 2016b. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/noticias/uso-de-substancia-antimicrobiana-em-racoes-animais-e-proibido>> Acesso em: 23 de abril de 2018

BRASIL, 2018. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria nº 171 de 13 de dezembro de 2018**. Informa sobre a intensão de proibição de uso de antimicrobianos com a finalidade de aditivos melhoradores de desempenho de alimentos e abre prazo manifestação. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 19 dez. 2018.

BRASIL, 2012. Novo Código Florestal. **Lei n 12.651, de 25 de maio de 2012**. Brasília, Diário Oficial da União. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2011-2014/2012/lei/112651.htm>, 2012. Acesso em: 20 de junho de 2012.

BRASIL, 1997. **Lei nº 9.433, de 8 de janeiro de 1997**. Institui a Política Nacional de Recursos Hídricos. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L9433.htm. Acesso em: 20 de junho de 2018.

BRASIL, 2003. **Lei n. 10.831, de 23 de dezembro de 2003**. Dispõe sobre a agricultura orgânica e dá outras providências. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 24 dez. 2007. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 20 de junho de 2018.

BRASIL, 1991. **Lei nº 8.171, de 17 de janeiro de 1991**. Dispõe sobre a política agrícola. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 1991. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sustentabilidade/tecnologia-agropecuaria/arquivos-de-legislacoes-de-tecnologias/lei-no-8-171-de-17-de-janeiro-de-1991.pdf/view>>. Acesso em: 20 de junho de 2018.

CAUMO, K.; DUARTE, M.; CARGNIN, S. T.; RIBEIRO, V. B.; TASCA, T.; MACEDO, A. J. Resistência bacteriana no meio ambiente e implicações na clínica hospitalar. **Revista Liberato**, v. 11, n. 16, p. 89-188, 2010.

CHAPMAN, J. S. Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 51, n. 4, p. 271–276, 2003.

CHOPRA, I. Antibiotics. **Encyclopedia of Life Science**. 2002.

COOPERBAND, L. R. Composting: Art and Science of Organic Waste Conversion. **Laboratory Medicine**, v. 31, n. JUNE, p. 283–290, 2000.

COSTA, D. & SHIMA, A. W. T. Tecnologia e competitividade do trabalho na avicultura brasileira. **Revista Economia & Tecnologia**, v. 3, n. 1, 2007.

CYCON, M.; MROZIK, A.; PIOTROWSKA-SEGET, Z. Antibiotics in the Soil Environment - Degradation and Their Impact on Microbial Activity and Diversity. **Frontiers in microbiology**, v. 10, 2019.

D’COSTA V. M.; KING, C. E.; KALAN L.; MORAR M.; SUNG W.W.L.; SCHWARZ, C.; FROESE, D.; ZAZULA, G.; CALMELS, F.; DEBRUYNE, R.; GOLDING, G. B.; POINAR,

H. N.; WRIGHT, G.D. Antibiotic resistance is ancient. **Nature**, 477 (7365), p. 457–461. 2011.

DALÓLIO, F. S.; SILVA, J. N.; OLIVEIRA, A. C. C.; TINÔCO, I. F. F.; BARBOSA, R. C.; RESENDE, M. O.; ALBINO, L. F. T.; COELHO, S. T. Poultry litter as biomass energy: A review and future perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 76, n. March, p. 941–949, 2017.

DAVIES, J. & DAVIES, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 74, n. 3, p. 417-433, 2010.

DIAZ, L. F.; SAVAGE, G. M.; EGGERTH, L. L.; GOLUEKE, C.G. Composting and Recycling, Municipal Solid Waste. **CRC Publishers**, 1993.

DIERIKX, C.; VAN ESSEN-ZANDBERGEN, A.; VELDMAN, K.; SMITH, H.; MEVIUS, D. Increased detection of extended spectrum beta-lactamase producing *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolates from poultry. **Veterinary Microbiology**, v. 145, n. 3-4, p.273-278, out. 2010.

DODD, M. S.; PAPINEAU, D.; GRENNE, T.; SLACK, J. F.; RITTNER, M.; PIRAJNO, F.; O'NEIL, J.; LITTLE, C. T. Evidence for early life in Earth's oldest hydrothermal vent precipitates. **Nature**, v. 543, n. 7643, p. 60, 2017.

DOLLIVER, H.; GUPTA, S.; NOLL, S. Antibiotic Degradation during Manure Composting. **Journal of Environment Quality**, v. 37, n. 3, p. 1245, 2008.

EMBRAPA. Tecnologias de produção de soja—região central do Brasil 2012 e 2013. **Embrapa Soja**, n. 15, p. 261, 2011.

EDWARDS, D. R. & DANIEL, T. C. Environmental impacts of on-farm poultry waste disposal—A review. **Bioresource Technology**, v. 41, n. 1, p. 9-33, 1992.

FAJARDO, A. & MARTÍNEZ, J. L. Antibiotics as signals that trigger specific bacterial responses. **Current opinion in microbiology**, v. 11, n. 2, p. 161-167, 2008.

FANG, H.; WANG, H., CAI, L.; YU, Y. Prevalence of antibiotic resistance genes and bacterial pathogens in long-term manured greenhouse soils as revealed by metagenomic survey. **Environmental Science and Technology**, v. 49, n. 2, p. 1095–1104, 2014.

FANG, L.; FANG, H.; WANG, H.; CAI, L.; YU, Y. Co-spread of metal and antibiotic resistance within ST3-IncHI2 plasmids from *E. coli* isolates of food-producing animals. **Scientific Reports**, v. 6, n. May, p. 1–8, 2016.

FROST, L. S.; LEPLAE, R.; SUMMERS, A. O.; TOUSSAINT, A. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 9, p. 722, 2005.

GIBBS, P.A.; PARKINSON, R.J.; MISSELBROOK, T.H.; BURCHETT, S. Environmental impacts of cattle manure composting. **Microbiology of Composting**. Springer Verlag, Heidelberg, p. 445–456, 2002.

GOU, M.; HUA, H. W.; ZHANG, Y. J.; WANG, J. T.; HAYDEN, H.; TANG, Y. Q.; HE, J. Z. Aerobic composting reduces antibiotic resistance genes in cattle manure and the resistome dissemination in agricultural soils. **Science of the Total Environment**, v. 612, p. 1300-1310, 2018.

GRAHAM, DAVID W.; KNAPP, C. W.; CHRISTENSEN, B. T.; MCCLUSKEY, S.; DOLFING, J. Appearance of β -lactam Resistance Genes in Agricultural Soils and Clinical Isolates over the 20 th Century. **Scientific Reports**, v. 6, p. 21550, 2016.

GULLBERG, E.; ALBRECHT, L. M.; KARLSSON, C.; SANDEGREN, L.; ANDERSSON D. I. Antibiotics and Heavy Metals. v. 5, n. 5, p. 19–23, 2014.

HAHLADAKIS, J. N.; VELISA, C. A.; WEBERB, R.; IACOVIDOUA, E.; PURNELL, P. An overview of chemical additives presents in plastics: Migration, release, fate and environmental impact during their use, disposal and recycling. **Journal of Hazardous Materials**, v. 344, p. 179–199, 2018.

HELLMANN, B.; ZELLES, L.; PALOJARVI, A.; BAI, Q. Emission of climate-relevant trace gases and succession of microbial communities during open-windrow composting. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 3, p. 1011–1018, 1997.

HEUER, H. & SMALLA, K. Manure and sulfadiazine synergistically increased bacterial antibiotic resistance in soil over at least two months. **Environmental Microbiology**, v. 9, n. 3, p. 657-666, 2007.

HEUER, H.; SOLEHATI, Q.; ZIMMERLING, U.; KLEINEIDAM, K.; SCHLOTTER, M.; MÜLLER, T.; FOCKS, A.; THIELE-BRUHN, S.; SMALLA, K. Accumulation of sulfonamide resistance genes in arable soils due to repeated application of manure containing sulfadiazine. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 7, p. 2527-2530, 2011.

HOELZER, K.; WONG, N.; THOMAS, J.; TALKINGTON, K.; JUNGMAN, E.; COUKELL, A. Antimicrobial drug use in food-producing animals and associated human health risks: what, and how strong, is the evidence? **BMC veterinary research**, v. 13, n. 1, p. 211, 2017.

HU, Y.; GAO, G. F.; ZHU, B. The antibiotic resistome: gene flow in environments, animals and human beings. **Frontiers of medicine**, v. 11, n. 2, p. 161-168, 2017.

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

JECHALKE, S.; KOPMANN, C.; ROSENDAHL, I.; GROENEWEG, J.; WEICHEL, V.; KRÖGERRECKLENFORT, E.; BRANDES, N.; NORDWIG, M.; DING, G. C.; JAN JIEMENS, S.; HEUER, H.; SMALLA, K. Increased abundance and transferability of resistance genes after field application of manure from sulfadiazine-treated pigs. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 5, p. 1704-1711, 2013.

JL, X.; SHENA, Q.; LIUA, F.; MAB, J.; XUB, G.; WANG, Y.; WU, M. Antibiotic resistance gene abundances associated with antibiotics and heavy metals in animal manures and

agricultural soils adjacent to feedlots in Shanghai; China. **Journal of Hazardous Materials**, v. 235–236, p. 178–185, 2012.

KOTZERKE, A.; SHARMA, S.; SCHAUSS, K.; HEUER, H.; THIELE-BRUHN, S.; SMALLA, K.; SCHLOTTER, M. Alterations in soil microbial activity and N-transformation processes due to sulfadiazine loads in pig-manure. **Environmental Pollution**, v. 153, n. 2, p. 315-322, 2008.

LAUBE, H.; FRIESE, A.; VON SALVIATI, C.; GUERRA, B.; KÄSBOHRER, A.; KREIENBROCK, L.; ROESLER, U. Longitudinal monitoring of extended-spectrum-beta-lactamase/AmpC-producing *Escherichia coli* at German broiler chicken fattening farms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 16, p. 4815-4820, 2013.

LEAL, R. M. P. Ocorrência e comportamento ambiental de resíduos de antibióticos de uso veterinário. 2012. 134 f. Tese (Doutorado) – **Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo**, Piracicaba, 2012.

LIBBY, A. & SCHAIBLE, P.J. Observations on growth responses to antibiotics and arsonic acids in poultry feeds. **Science**, v.121, 733–734, 1955.

LIU, Y. Y.; WANG, Y.; WALSH, T. R.; YI, L. X.; ZHANG, R.; SPENCER, J.; DOI, Y.; TIAN, G.; DONG, B.; HUANG, X.; YU, L. F.; GU, D.; REN, H.; CHEN, X.; LV, L.; HE, D.; ZHOU, H.; LIANG, Z.; LIU, J. H.; SHEN, J. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 2, p. 161-168, 2015.

NICOLAOU, K. C. & MONTAGNON, T. Molecules that Changed the World, **Wiley-VCH: Weinheim**, cap. 13. 2008.

O'NEILL, J. Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations. **The review on antimicrobial resistance**. May 2016. 2016.

PAL, C. ASIANI, K.; ARYA, S.; RENSING, C.; STEKEL, D.J.; D.G. OAKIM LARSSON, D. G.J.; HOBMAN, J. L. Metal Resistance and Its Association with Antibiotic Resistance. **Elsevier**. v. 70, 2017.

PARE, T.; DINELM, H.; SCHNITZERS, M.; DUMONTET, S. Transformations of carbon and nitrogen during composting of animal manure. **Biology and Fertility of Soils**. p. 173–178, 1998.

PENG, S.; WANG, Y.; ZHOU, B.; LIN, X. Science of the Total Environment Long-term application of fresh and composted manure increase tetracycline resistance in the arable soil of eastern China. **Science of the Total Environment**, The, v. 506–507, p. 279–286, 2015.

PERRON, K.; CAILLE, O.; ROSSIER, C.; DELDEN, C V.; DUMAS, J. L.; KOHLER, T. CzcR-CzcS, a Two-component System Involved in Heavy Metal and Carbapenem Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 10, p. 8761–8768, 2004.

PRUDEN, A.; LARSSON, D. J.; AMÉZQUITA, A.; COLLIGNON, P.; BRANDT, K. K.; GRAHAM D. W.; TOPP, E. Management options for reducing the release of antibiotics and antibiotic resistance genes to the environment. **Environmental health perspectives**, v. 121, n. 8, p. 878-885, 2013.

QIAN, X., SUN, W.; GUA, J. WANG, X. J.; SUN, J. J., YIN, Y. N.; DUAN, M. L. Variable effects of oxytetracycline on antibiotic resistance gene abundance and the bacterial community during aerobic composting of cow manure. **Journal of Hazardous Materials**, v. 315, p. 61–69, 2016.

RODRIGUES, W. O. P.; GARCIA, R. G.; NÄÄS, I. A.; ROSA, C. O.; CALDARELLI, C. E. Evolução da avicultura de corte no Brasil. **Enciclopédia biosfera, Centro Científico Conhecer**, v. 10, p. 1666, 2014.

ROMERO, J. L.; BURGOS, M. J. G.; PULIDO, R. P.; GÁLVEZ, A.; LUCAS, R. Resistance to Antibiotics, Biocides, Preservatives and Metals in Bacteria Isolated from Seafoods: Co-Selection of Strains Resistant or Tolerant to Different Classes of Compounds. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. August, p. 1–16, 2017.

RYNK, R. On-farm composting handbook. **Natural Resource, Agriculture, and Engineering Service**. Publication number NRAES-54. Ithaca, NY, 1992.

SANTOS, T. M. B.; LUCAS, J. J. R.; SAKOMURA, N. K. Efeitos da densidade populacional e da reutilização da cama sobre o desempenho de frangos de corte e produção de cama. **Revista Portuguesa de Ciência Veterinárias**, v. 100, n° 1, p. 45–52, 2005.

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, 2006.

SCHNEIDER, V. E.; PERESIN, D.; TRENTIN, A. C., BORTOLIN, T. A.; SAMBUICHI, R. H. R. Diagnóstico dos resíduos orgânicos do setor agrossilvopastoril e agroindustriais associadas. **IPEA**, 2012.

SELVAM, A.; ZHAO, Z.; WONG, J. W. C. Composting of swine manure spiked with sulfadiazine, chlortetracycline and ciprofloxacin. **Bioresource Technology**, v. 126, p. 412–417, 2012.

SESA. SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DO PARANÁ. Levantamento do uso e comercialização de medicamentos veterinários em frangos de corte no Estado do Paraná. Curitiba: SESA/ISEP, 25 p. 2005.

SIQUEIRA, J. O. & FRANCO, A. A. Biotecnologia do solo: fundamentos e perspectivas. **Ministério da Educação e Cultura**, 1988. 235 p., 1988.

SOBIA, F.; SHAHID, M.; SINGH, A.; KHAN, H. M.; SHUKLA, I.; MALIK, A. Occurrence of *bla_{amp}C* in cefoxitin-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from North-Indian tertiary care hospital. **New Zealand Journal of Medical Laboratory Science**, v. 65, n. 1, p. 5-9, 2011.

STEPANAUSKAS, R.; GLENN, T. C.; JAGOE, C. H.; TUCKFIELD, R. C.; LINDELL, A. H.; MCARTHUR, J. V. Elevated microbial tolerance to metals and antibiotics in metal-contaminated industrial environments. **Environmental Science and Technology**, v. 39, n. 10, p. 3671–3678, 2005.

SU, J. Q.; OUYANG, W.; WEI, B.; HUANG, F.; ZHAO, Y.; XU, H.; ZHU, Y. G. Antibiotic resistome and its association with bacterial communities during sewage sludge composting. **Environmental science & technology**, v. 49, n. 12, p. 7356-7363, 2015.

THAKUR, S. & GRAY, G. C. The Mandate for a Global “One Health” Approach to Antimicrobial Resistance Surveillance. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 100, n. 2, p. 227, 2019.

THANNER, S.; DRISSNER, D.; WALSH, F. Antimicrobial resistance in agriculture. **MBio**, v. 7, n. 2, p. e02227-15, 2016.

VAN BOECKEL, T. P.; BROWER, C.; GILBERT, M.; GRENFELL, B. T.; LEVIN, S. A.; ROBINSON, T. P.; TEILLANT, A.; LAXMINARAYAN R. Global trends in antimicrobial use in food animals. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 18, p. 5649-5654, 2015.

WEGENER, H. C.; AARESTRUP, F. M.; JENSEN, L. B.; HAMMERUM, A. M.; BAGER, F. Use of antimicrobial growth promoters in food animals and *Enterococcus faecium* resistance to therapeutic antimicrobial drugs in Europe. **Emerging infectious diseases**, v. 5, n. 3, p. 329, 1999.

WELLINGTON, E. M.; BOXALL, A. B.; CROSS, P.; FEIL, E. J.; GAZE, W. H., HAWKEY, P. M.; ROLLINGS, A. S. J.; JONES, D. L.; LEE, N. M. OTTEN, W.; THOMAS, C. M. The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. **The Lancet infectious diseases**, v. 13, n. 2, p. 155-165, 2013.

WEPKING, C.; AVERA, B.; BADGLEY, B.; BARRETT, J. E.; FRANKLIN, J.; KNOWLTON, K. F.; RAY, P. P.; SMITHERMAN, C.; STRICKLAND, M. S. Exposure to dairy manure leads to greater antibiotic resistance and increased mass-specific respiration in soil microbial communities. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 284, n. 1851, p. 20162233, 2017.

WHITMAN, WILLIAM B.; COLEMAN, DAVID C.; WIEBE, WILLIAM J. Prokaryotes: the unseen majority. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 12, p. 6578-6583, 1998.

W.H.O. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global action plan for the prevention and control of noncommunicable diseases 2013-2020. 2013.

WRIGHT, G. D. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. **Nature reviews microbiology**, v. 5, n. 3, p. 175, 2007.

XIE, W.Y.; SHEN, Q.; ZHAO, F. J. Antibiotics and antibiotic resistance from animal manures to soil: a review. **European Journal of Soil Science**, 2017.

YE, J.; RENSING, C.; SU, J.; ZHU, Y. J. From chemical mixtures to antibiotic resistance. **Journal of Environmental Sciences (China)**, v. 62, p. 138–144, 2017.

ZHANG, Y. J.; HU, H.W.; GOU, M.; WANG, J. T.; CHEN, D.; HE, J. Z. Temporal succession of soil antibiotic resistance genes following application of swine, cattle and poultry manures spiked with or without antibiotics. **Environmental Pollution**, v. 231, p. 1621–1632, 2017.

ZHENG, B.; HUANG, C.; XU, H.; GUO, L.; ZHANG, J.; WANG, X.; JIANG, X.; YU, X.; JIN, L.; LI, X.; FENG, Y.; XIAO, Y.; LI, L. Occurrence and genomic characterization of ESBL-producing, MCR-1-harboring *Escherichia coli* in farming soil. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 2510, 2017.

ZHOU, Y.; PAL, C.; ASIANI, K.; ARYA, S.; RENSING, C.; STEKEL, D. J.; LARSSON, D. G. J.; HOBMAN, J. L. Occurrence, abundance, and distribution of sulfonamide and tetracycline resistance genes in agricultural soils across China. **Science of the Total Environment**, v. 599–600, p. 1977–1983, 2017.

ZHU, Y.; ZHU, Y. G.; JOHNSON, T. A.; SU, J. Q.; QIAO, M.; GUO, G. X.; STEDTFELDC, R. D.; HASHSHAMC, S. A.; TIEDJEC, J. M. Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 9, p. 3435–3440, 2013.