

AVALIAÇÃO DE ELEMENTOS GENÉTICOS DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS EM ÁREA SOB INFLUÊNCIA DA FERTIRRIGAÇÃO COM EFLUENTE TRATADO DE UMA GRANJA DE SUINOCULTURA

GERUSA LEITE CAETANO¹; ANDRÊSSA REZENDE PEREIRA² E SILVANA DE QUEIROZ SILVA³

¹ Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Ouro Preto, Campus Universitário Morro do Cruzeiro, 35400-000, Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil, gerusa.caetano@aluno.ufop.edu.br

² Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Ouro Preto, Campus Universitário Morro do Cruzeiro, 35400-000, Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil, andressa.rezende@engenharia.ufjf.br

³ Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Campus Universitário Morro do Cruzeiro, 35400-000, Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil, silvana.silva@ufop.edu.br

1 RESUMO

Uma granja de suinocultura que concede seu efluente tratado para fertirrigação de milho, foi escolhida para monitoramento de genes de resistência a antibióticos. Foram investigados a ocorrência e abundância dos genes de resistência aos antibióticos beta-lactâmicos (*blaTEM*), macrolídeos (*ermB*), quinolonas (*qnrB*), tetraciclina (*tetA*) e sulfonamidas (*sulI*), além do elemento genético móvel integrase classe 1 (*intI1*) e do gene que estima bactérias totais (*RNAr 16S*), em amostras do efluente tratado, do solo fertirrigado, do solo sem histórico de fertirrigação direta, e de água de um açude, ambos localizados à jusante da área fertirrigada. Foram realizadas quatro campanhas amostrais, com coleta de 1L efluente tratado, cinco amostras de 250 g de cada solo, além de 2L de água do açude. A quantificação dos genes foi realizada por qPCR com os *primers* correspondentes a cada gene. Todos os genes investigados e o elemento genético móvel *int1* foram detectados em todas as campanhas amostrais dos solos, da água do açude e do efluente tratado. O gene de resistência à sulfonamida foi o mais abundante entre as amostras, com exceção das amostras do açude. Comparativamente, os genes *sulI* e *tetA* foram estatisticamente mais abundantes no solo fertirrigado do que no solo não fertirrigado, em todas as coletas. Isso indica que a utilização do efluente de suinocultura, mesmo que tratado, pode causar a disseminação de resistência a antibióticos para o ambiente.

Keywords: genes de resistência, irrigação, dejetos suínos

CAETANO, G. L.; PEREIRA, A. R.; SILVA, S. Q.
EVALUATION OF GENETIC ELEMENTS FOR ANTIBIOTIC RESISTANCE
IN AREA UNDER INFLUENCE OF FERTIRRIGATION WITH TREATED
EFFLUENT FROM A PIG FARM

2 ABSTRACT

A swine farm that provides its treated effluent for irrigation of corn was chosen to monitor antibiotic resistance genes. The occurrence and abundance of resistance antibiotics genes to

beta-lactams (*blaTEM*), macrolides (*ermB*), quinolones (*qnrB*), tetracyclines (*tetA*) and sulfonamides (*sulI*), as well as the mobile genetic element integrase class 1 (*intI1*) and the gene that estimates total bacteria (16S rRNA) were analyzed. Samples of treated effluent, fertigated soil, soil without a direct fertigation, and water from a pond, both located downstream of the fertigated area, were collected during four sampling campaigns. A total of 1 L of treated effluent, five samples of 250 g of each soil, and 2L of water from the pond were sampled. The quantification of genes was performed by qPCR with primers corresponding to each gene. All investigated genes and the mobile genetic element *int1* were detected in all soil samples, pond water and treated effluent. The *sulI* gene was the most abundant among the samples, but not at the pond water. Comparatively, the *sulI* and *tetA* gene were statistically more abundant in the fertigated soil than in the non-fertigated soil, in all sampling collections. This indicates that the use of swine farming effluent, even if treated, can cause the spread of antibiotic resistance to the environment.

Keywords: resistance genes, swine manure, soil.

3 INTRODUÇÃO

O reuso de efluentes da suinocultura na irrigação tornou-se uma atividade comum e amplamente difundida. Em áreas de confinamento de suínos usualmente há elevada concentração de animais por área, gerando assim um volume concentrado de estrume, composto por fezes, urina e pelos.

Considerando que na prática de manejo da suinocultura há o oferecimento de antibióticos aos animais, tanto para fins terapêuticos quanto como promotores de crescimento (ZEINELDIN, ALDRIDGE; LOWE, 2019), especula-se que os dejetos dos animais possam conter microrganismos resistentes a estes fármacos, e que, com a prática de fertirrigação do solo com esses dejetos (brutos ou tratados), há, portanto, um risco de disseminação destas bactérias, bem como dos seus genes de resistência a antibióticos (GRAs) no meio ambiente.

É sabido que tratamentos convencionais de efluentes não foram desenvolvidos para remover contaminantes em pequena concentração como antibióticos, GRAs e bactérias resistentes. A remoção ou redução desses poluentes depende diretamente do tipo de tecnologia utilizada, tamanho e composição do efluente (CHEN; ZHANG, 2013; OSIŃSKA *et al.*, 2017).

A capacidade que bactérias tem em resistir a antibióticos depende da presença de genes cromossomais ou plasmidiais que conferem habilidades tais como inativação dos antibióticos por enzimas ou alteração estrutural, redução da concentração do fármaco ou prevenção de seu acúmulo e alteração do receptor da droga (CHEN; CHOPRA; KAYE, 2011; SANTOS, 2014). Esses GRAs, têm sido utilizados como parâmetros durante o monitoramento de águas, esgotos e dejetos da pecuária (ARAÚJO *et al.*, 2020; PEREIRA *et al.*, 2021).

No entanto, a abordagem a respeito do efeito da aplicação de efluente tratado na perspectiva da resistência a antibióticos ainda é escassa e controversa na literatura, sendo mais comuns os estudos referentes a solos irrigados com efluente bruto ou com aplicação de estrume de animais, em que parte apresentam maior abundância de GRAs após esse tipo de tratamento no solo, comparado a solos controle (HAN *et al.*, 2016; HEUER *et al.*, 2011; PENG *et al.*, 2015). Em outros estudos não foram observados aumento significativo da abundância relativa de GRAs, tais como daqueles que conferem resistência a sulfonamidas, tetraciclina e eritromicina, em solos que receberam efluente tratado,

mesmo em experimentos à longo prazo, 6 a 18 anos (BEN *et al.*, 2017; NEGREANU *et al.*, 2012). Entretanto, outros estudos apontaram aumento na abundância relativa a sulfonamidas, fluoroquinolonas, beta-lactâmicos, tetraciclinas e o elemento genético móvel integrase I entre outros genes em solos irrigados com águas residuárias (CHEN *et al.*, 2014; KAMPOURIS *et al.*, 2021).

Dessa forma, sabendo que a resistência a antimicrobianos está entre os maiores riscos para a saúde global (WHO, 2015), o presente trabalho teve como objetivo avaliar a ocorrência de GRAs em amostras ambientais (efluente, solo e água) de uma área submetida à fertirrigação com efluente tratado de uma granja de suinocultura.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras e análises físico-químicas

Foram realizadas quatro campanhas amostrais de solo na área fertirrigada (solo 1, código S1) e da mesma forma, foi selecionada uma área à jusante, sem histórico de descarga direta de efluentes, denominado solo 2 (código S2) (CAETANO, 2021). O solo do estudo é caracterizado como latossolo vermelho amarelo distrófico, que compreende um solo de baixa fertilidade, baixo teor de fósforo e baixa quantidade de água disponível às plantas (ALMEIDA; SANTOS; ZARONI,

2021). Em cada campanha amostral foram coletadas aproximadamente 250 g de solo, em uma camada de 10 cm de profundidade, em cinco pontos aleatórios nas áreas de estudo, conforme descrito em documento da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (FILIZOLA; GOMES; SOUZA, 2006). Paralelamente foram coletadas amostras do efluente tratado da saída da tubulação de irrigação que é direcionado à plantação de milho (código E, volume 1L) e de amostras da água de um açude, compreendendo uma amostra composta, localizado à jusante da irrigação (código A, volume 2L) (CAETANO, 2021). Foram realizadas análises de pH, carbono orgânico total (COT), nitrogênio total (NT), argila, silte e areia, conforme apresentado na Tabela 1. Para análises de COT e NT no efluente, as amostras foram filtradas em membrana de filtração 0,45 µm e 47 mm e diluídos 50 vezes com água ultrapura.

Todas as amostras foram preservadas para a análise molecular. Para isso, procedeu-se com o congelamento de 10 g das amostras do solo (-20°C), após duas lavagens em solução PBS (*phosphate buffer solution*, 140 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, 3 mM KCl, pH 7,2), seguida de centrifugação à 4.500 rpm por 10 minutos. Para as amostras líquidas utilizou-se 300 mL de amostra que, após centrifugação e lavagem do pellet nas mesmas condições descritas anteriormente, foram congeladas à -20°C.

Tabela 1. Caracterização físico-química das amostras de solo e do efluente.

Parâmetros	Método/ Equipamento	Solo 1	Solo 2	Efluente tratado
pH	pHmetro AZ	6,28	8,02	-
COT (mg.g ⁻¹ ou mg.L ⁻¹)	TOC-	28,65	17,88	659,30
NT (mg.g ⁻¹ ou mg.L ⁻¹)	LCPH/CPN (Shimadzu®)	0,31	0,12	2534,50
Argila (%)		26,64	13,41	NA
Silte (%)	NBR NM248.	20,29	14,27	NA
Areia (%)		53,06	72,32	NA

Fonte: Caetano (2021).

COT: Carbono Orgânico Total, NT: Nitrogênio Total; NA: não aplicável. Desvio padrão para solo 1 (n=20): 0,3; 4,2 e 0,2 (para análises de pH, COT e NT respectivamente). Desvio padrão do solo 2(n=20) :0,5; 7,8; 0,1(para análises de pH, COT e NT respectivamente).

4.2 Extração de DNA e quantificação dos genes de resistência a antibióticos, integrase e RNAr 16S

Foram utilizadas 0,25 g de cada amostra previamente preservadas, as quais foram submetidas à extração de DNA utilizando o kit DNeasy PowerSoil (QIAGEN®), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Posteriormente, o DNA genômico extraído de cada amostra foi quantificado em espectrofotômetro e então submetido a diluições a fim de normalizar todas as amostras a uma concentração de 5 ng.µL⁻¹.

A amplificação e quantificação de GRAs foram obtidas utilizando PCR em Tempo Real 7500 (*Applied Biosystems*). Foram utilizados iniciadores contendo genes de resistência a beta-lactâmicos, eritromicina, sulfonamidas, tetraciclina e fluoroquinolonas (genes *blaTEM*, *ermB*, *sul1*, *tetA* e *qnrB*, respectivamente), além do elemento genético móvel integrase 1 (*intI*) e da fração 16S do gene RNA ribossomal que representa o domínio bactéria (RNAr 16S) (Tabela 2). Para cada reação foi adicionado: 3,8 µL de água ultrapura, 5,0 µL de PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix, 0,1 µL de cada par de primers (30 µM) e 1,0 µL de amostra de DNA.

Tabela 2. Lista de primers

Gene	Primer	Sequência	Temp (°C)	Amplicon (pb)
<i>tetA</i>	<i>tetA</i> fw	GCTACATCCTGCTTGCCTTC	54,6	210
	<i>tetA</i> rv	CATAGATCGCCGTGAAGAGG		
<i>sulI</i>	<i>sulI</i> fw	CGCACCGGAAACATCGCTGCAC	55,8	163
	<i>sulI</i> rv	TGAAGTTCCGCCGCAAGGCTCG		
<i>ermB</i>	<i>ermB</i> fw	CGTGCGTCTGACATCTATCTGA	56,8	190
	<i>ermB</i> rv	CTGTGGTATGGCGGGTAAGTT		
<i>qnrB</i>	<i>qnrB</i> fw	GCGACGTTTCAGTGGTTTCAG	54,7	148
	<i>qnrB</i> rv	TGTCCAACCTTAACGCCTTGTA		
<i>bla_{TEM}</i>	<i>bla_{TEM}</i> fw	GCACGAGTGGGTTACATCGA	48	311
	<i>bla_{TEM}</i> rv	GGTCCCTCCGATCGTTTGTCAG		
<i>intI</i>	<i>intI</i> fw	CCTCCCGCACGATGATC	60	280
	<i>intI</i> rv	TCCACGCATCGTCAGGC		
RNAr 16S	1055 fw 1392 rv	ATGGCTGTCGTCAGCT ACGGGCGGTGTGTAC	53	337

Fonte: Caetano (2021); Referências: 1- Mao et al. (2015); 2 - Tao *et al.* (2014); 3 – Goldstein *et al.* (2001); 4- Ferris, Muyzer e Ward *et al.* (1996)

A quantificação absoluta dos genes foi obtida utilizando curvas de calibração com os controles para cada gene analisado. Esses foram obtidos pela clonagem de cada gene específico em um vetor plasmidial (kit pGem Easy Vector, Promega), seguido de transformação em *Escherichia coli* JM109. As curvas padrão de cada gene do estudo foram concebidas, contendo seis pontos, com diluição seriada 1:10 dos controles. Para cada curva padrão, a equação foi obtida através do cruzamento do log da concentração de cada ponto (concentração inicial dos controles positivos) e (Ct) Ciclo *Threshold* para cada um dos pontos. O Ct corresponde ao momento da reação de qPCR em que a fluorescência refletiva em cada amostra é detectada, em que é possível quantificar o número de cópias de DNA gerado.

Foram consideradas curvas ideais quando foi atingido $R^2 > 0,99$, inclinação da reta entre -3,1 e -3,6 e eficiência entre 90 e 110%. Cada análise foi realizada em triplicata para curva e amostras, adicionando-se amostra “branco” com

ausência de *template*. Para estimar a quantificação de cópias de genes por μL e por grama de cada amostras, substitui-se o Ct nas equações de cada curva padrão, com posterior correção, observando-se o volume, quantificação de DNA estimada e real (após a extração), as massas de solo e *pellet* e o teor de sólidos das amostras líquidas. Dessa forma, foi obtido a abundância absoluta, representada pela quantidade cópias de genes por mL de amostra líquida ou grama de solo. Já a quantificação relativa foi determinada pela razão da abundância absoluta (n° cópias gene. mL^{-1} ou g de amostra) de cada gene pela quantificação das bactérias totais (n° cópias RNAr 16S. mL^{-1} de amostra ou g de solo). Maiores detalhes podem ser encontrados em Caetano (2021).

4.3 Análise estatística

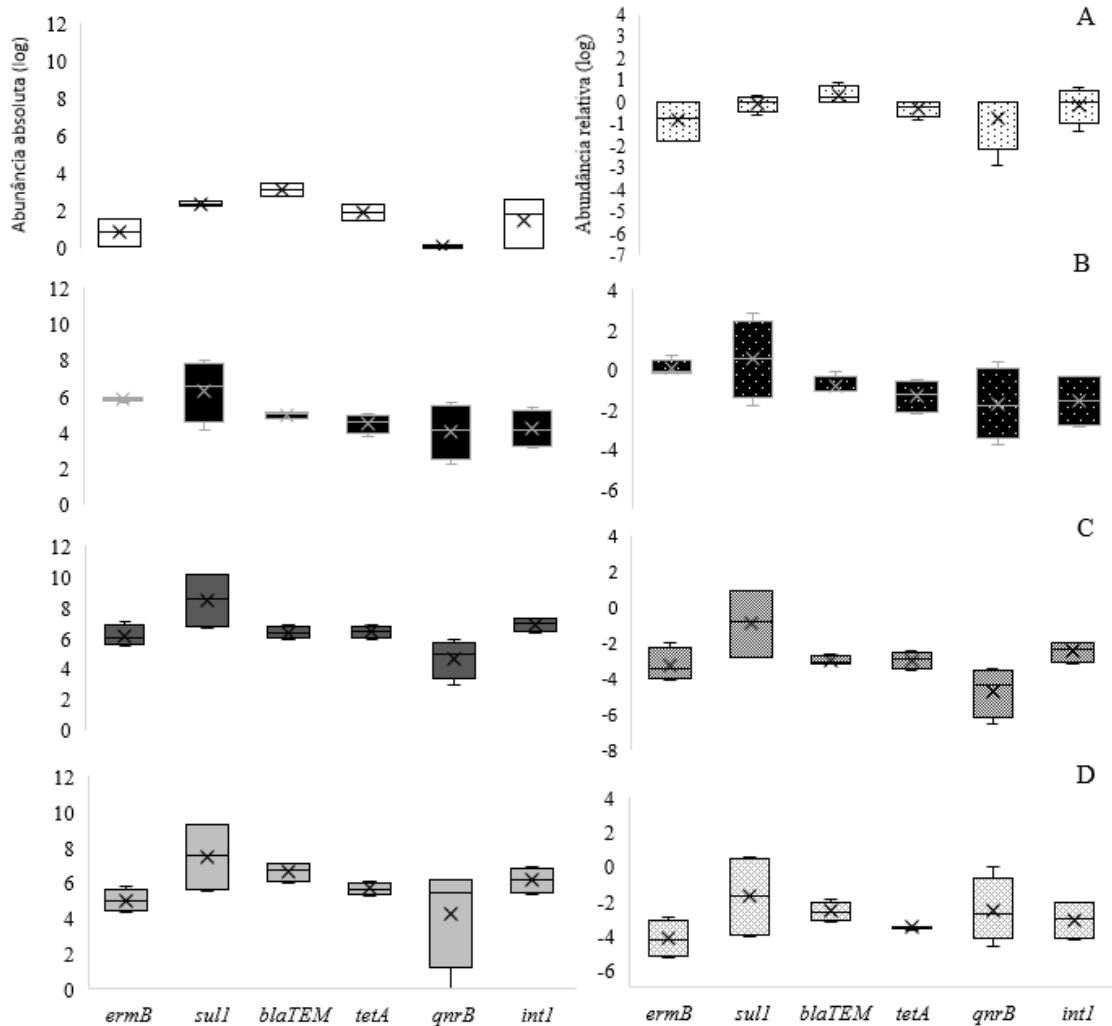
Na análise estatística foi utilizado o teste Shapiro-Wilk para avaliar a normalidade dos dados, teste T de Student para dados paramétricos, Mann-Whitney para dados não paramétricos, teste Wilcoxon

para comparação dos dados físico-químicos do solo e o coeficiente de correlação de Spearman, além do teste Kruskal para análise estatística da abundância relativa das amostras de solo e efluente tratado.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os genes investigados (*ermB*, *tetA*, *sul1*, *int1*, *qnrB*, *blaTEM*) e o elemento genético móvel *int1* foram detectados em todas as campanhas no S1, S2, A e E (Figuras 1 e 2) com exceção do gene *qnrB*, que esteve abaixo do limite de detecção do método analítico no S2 na coleta 1 e do S1 e S2 em 80% das réplicas das coletas 3 e 4.

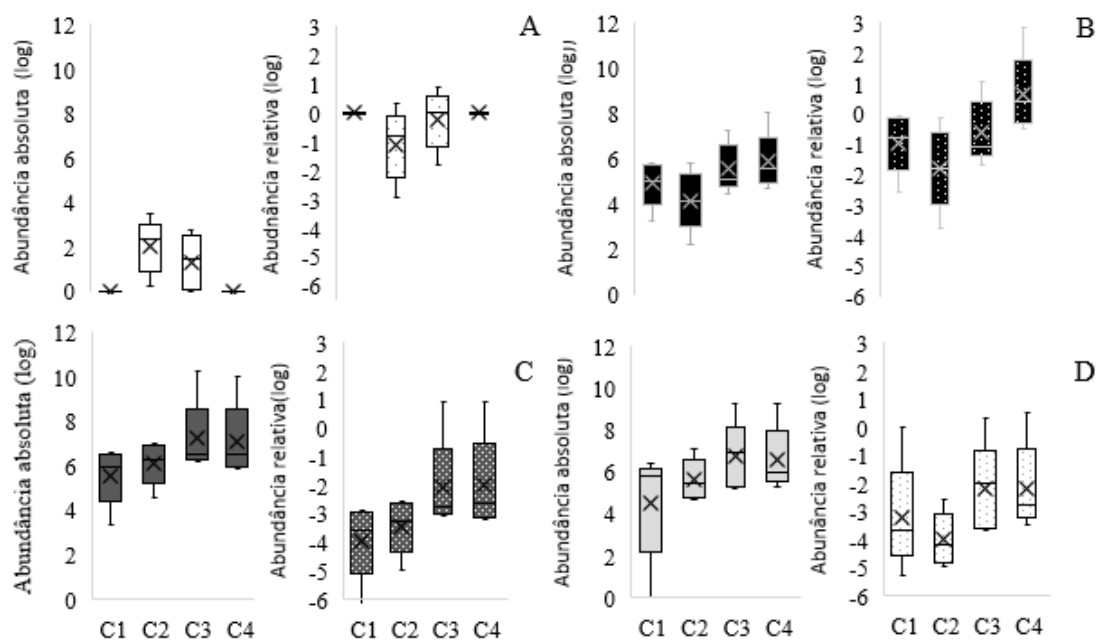
Figura 1. Abundância absoluta e relativa de cada gene de resistência a antibióticos investigados e do gene da integrase nas amostras de solo, água do açude e efluente tratado



Fonte: a autora.

A: Número de cópias de genes/g mL de amostras de água do açude; B: número de cópias de genes/g mL de amostras de água do efluente tratado; C: Número de cópias de genes amostras de solo 1 e D:solo 2 gene/g amostra) (n=20)

Figura 2. Abundância relativa e absoluta do total de genes de resistência a antibióticos por coleta



Fonte: a autora.

A: Número de cópias de genes/g mL de amostras de água do açude; B: número de cópias de genes/g mL de amostras de água do efluente tratado; C: Número de cópias de genes amostras de solo 1 e D: solo 2 gene/g amostra). Genes: *ermB*, *sull*, *tetA*, *qnrB* e *blaTEM*. C1: coleta 1 (jan/2020), C2: coleta 2 (ago/2020), C3: efluente tratado da coleta 3 (mar/2020), C4: efluente tratado da coleta 4 (abr/2020). Devido à problemas analíticos, não foi possível quantificar as amostras da coleta 1 e 4.

5.1 Genes de resistência a antibióticos na água do açude

A abundância absoluta média de GRAs nas amostras de água do açude variou de $-0,12$ a $3,23 \log_{10}$ de cópias gene.mL^{-1} de amostra (Figura 1-A). As amostras de água do açude apresentaram um padrão diferenciado das outras amostras em estudo, com maior abundância absoluta e relativa referente aos genes *blaTEM* ($3,1$ e $0,62 \log_{10}$ respectivamente), seguido dos seguintes elementos genéticos para a abundância absoluta e relativa: *blaTEM* > *sull* > *int1* > *tetA* > *ermB* > *qnrB*. Já a abundância relativa dos GRAs variou de $-3,22$ a $0,69 \log_{10}$ cópias de GRAs/rRNA 16S.

Dong *et al.* (2019), detectaram abundâncias relativas menores em um sedimento de um lago urbano na China (aproximadamente -2 a $-4 \log_{10}$ cópias de

GRAs/rRNA 16S). Arsand *et al.* (2020) encontraram o gene *blaTEM* como o mais abundante em amostras de um rio no Brasil. Diferente do observado, em alguns estudos com corpos hídricos receptores, circundantes a suinoculturas, foi observada uma predominância do gene *sull* à jusante de lançamentos de águas residuárias, (HSU, 2014). O mesmo fenômeno também já foi observado em amostras de lagos, em que o gene *sull* foi mais bem explicado pela proximidade de estações de tratamentos de águas residuais e efluentes de hospitais, variando de -3 a $-1 \log_{10}$ cópias de *sull*, valores menores do que os encontrados no presente estudo (CZEKALSKI *et al.*, 2015).

5.2 Genes de resistência a antibióticos no efluente tratado

A abundância absoluta média de todos os GRAs no efluente tratado variou de

4,97 a 7,47 \log_{10} de cópias de gene. mL^{-1} de efluente tratado entre as coletas (Figura 1-B). O gene *sul1* deteve a maior quantificação nas amostras (7,47 \log_{10}), com ordem: *sul1*>*ermB*>*qnrB*>*blaTEM*>*int1*>*tetA*, com abundância absoluta média superior à abundância do gene *RNAr16S*, que representa as bactérias totais presentes nas amostras (5,9 \log_{10} , variando de 5,2 a 6,1 \log_{10}).

Houve variação da abundância relativa na faixa de -0,17 a 2,23 \log_{10} de cópias de GRAs/ RNAr 16S, acima da faixa de detecção encontrado por Kampouris *et al.* (2021) cerca de -8 a -2 \log_{10} que também contemplaram em seus estudos os genes *int1*, *sul1*, e *blaTEM* em águas residuárias tratadas. Em outro estudo, genes de resistência a tetraciclinas e sulfonamidas (*tetM*, *tetO*, *tetW*, *sul1* e *sul2*) foram detectados em menor abundância relativa do que a média do efluente tratado do presente estudo (cerca de -2,0 \log_{10}) em efluentes residuários de suínos (BEN *et al.*, 2017).

Negreanu *et al.* (2012) também observaram abundâncias relativas de genes *sul1* e *ermB* aparentemente inferiores às deste estudo (aproximadamente -3 a -2 \log_{10} de *sul1*, e -4 a -6 \log_{10} do gene *ermB*) em amostras de efluente residuário de planta de tratamento de esgoto.

A abundância relativa média do gene *sul1* no efluente tratado foi de aproximadamente 2,23 \log_{10} de cópias de gene *sul1/RNAr 16S* (variando de -1,81 a 2,82 \log_{10} entre coletas), enquanto do gene *ermB* variou de -0,23 a 0,68 \log_{10} entre as médias de abundância relativa das coletas. A abundância relativa com valor positivo pode indicar a possibilidade de haver mais de um gene por bactéria ou que parte dos genes de resistência persistem no ambiente mesmo após a morte das bactérias, e poderiam estar livres no ambiente, como fragmentos genéticos.

5.3 Genes de resistência a antibióticos nas amostras de solo

A abundância absoluta média de GRAs no S1 variou de 6,06 a 9,85 cópias gene. g^{-1} de amostra. Os genes com maior abundância absoluta nas mostras de solo S1 (n=20) foram *sul1* e *int1*, com média total de 9,8 e 7,0 \log_{10} n° de cópias gene/g amostra, respectivamente, seguindo a ordem *sul1*>*int1*>*ermB*>*tetA*>*blaTEM*>*qnrB*.

As amostras do S1 apresentaram variação da abundância relativa na faixa de -3,32 a 0,47 \log_{10} de cópias de GRAs/ RNAr 16S (Figura 1-C). O gene *sul1* destacou-se pela maior quantificação, com média de 0,47 \log_{10} , maior que a encontrada em alguns estudos envolvendo solo fertirrigado como os Negreanu *et al.* (2012), cerca de -6 a -3 \log_{10} e das abundâncias relativas encontradas por Wang *et al.* (2014) e Kampouris *et al.* (2021), aproximadamente -3 \log_{10} de *sul1/RNAr 16S*.

O gene *qnrB* foi o menos abundante nas amostras de S1, com média de 6,0 \log_{10} . É importante ressaltar que entre as 20 (vinte) amostras de solo coletadas, apenas 11 estavam acima do limite de detecção para o gene *qnrB* (coleta 1: $4,0 \times 10^2$, coleta 3 e 4: $8,0 \times 10^5$). Nas amostras S2, 13 (treze) amostras tiveram quantificação do gene *qnrB* abaixo do limite de detecção da reação.

Genes *sul1* e *tetA* foram mais abundantes estatisticamente ($p < 0,05$) no S1 do que no S2, quando a análise estatística foi realizada com todas as replicatas de todas as coletas. Ao analisar cada coleta separadamente, percebeu-se um padrão diferente quanto aos genes *tetA* e *ermB*, em que a abundância relativa do gene *ermB* foi maior ($p < 0,05$) no solo fertirrigado nas coletas 1, 2 e 3 e de *tetA* foi maior apenas nas coletas 3 e 4, além do gene *int1*, que esteve em maior ($p < 0,05$) quantificação nas coletas 1, 2 e 4 nessas amostras.

A abundância do gene *sul1* foi estatisticamente maior no solo fertirrigado do que no solo não fertirrigado

em todas as coletas. Dessa forma, a fertirrigação pode estar contribuindo para o aumento dos genes *ermB*, *tetA* e *sull* e *int1* no solo.

Apesar de não receber efluente tratado irrigado diretamente, todos os genes estudados também foram detectados nas amostras do S2 (Figura 1-D). A abundância absoluta média de GRAs no S2 variou de 5,53 a 8,95 n° de cópias gene/g de amostra de solo. O gene *sull* também foi o gene mais abundante entre os genes investigados com abundância média absoluta e relativa de 7,33 \log_{10} respectivamente, seguido de *blaTEM* e *int1* (6,45 e 6,07 \log_{10}) com *ranking* de genes *sull* > *blaTEM*, *int1* > *qnrB* > *tetA* > *ermB*.

A quantificação relativa dos GRAs no S2 variou de -0,43 a -4,06 n° de cópias de GRAs/rRNA 16S. A abundância relativa do gene *sull* (0,25 \log_{10}) foi consideravelmente maior do que a encontrada em outros estudos na literatura, como os de Negreanu *et al.* (2012), Ben *et al.* (2017) e Kampouris *et al.* (2021), que encontraram abundância relativa em torno de -4 a -8 \log_{10} em solos não irrigados com efluente tratado.

A considerável abundância dos mesmos genes detectados no S1, nas amostras do solo S2, deve-se à proximidade com a câmara do biodigestor de dejetos. Nas proximidades desse equipamento foi observada uma área de vazamento direto de dejetos brutos no solo. Assim, é possível que devido à ocorrência de chuva os GRAs da lavagem do efluente bruto transitem dessa área ao Solo 2 estudado, contribuindo para o aumento de GRAs no solo.

É importante ressaltar que também já foram detectadas quantificações de GRAs expressivas em solos considerados intocados pela atividade antrópica como em solos na Antártica e em solos tibetanos inexplorados (WANG *et al.*, 2016, LI *et al.*, 2020). Foi encontrada abundância relativa em solos tibetanos prístinos na faixa de -1,3 a -0,55 \log_{10} cópias de GRA/cópias de genes 16 rRNA, dentro da faixa encontrada no presente estudo no S1 e no S2. Os GRAs

encontrados no solo tibetano supracitado conferem resistência a antibióticos menos comuns, como a glicopetideos e rifampicina. Já em ambientes de impacto humano direto, inclusive em solo tibetano sob influência antrópica, há uma tendência de GRAs mais comumente encontrados na literatura, como fosmidomicina, bem como aminoglicosídeo, bacitracina com destaque aos macrolídeo-lincosamida-estreptogramina, fluoroquinolona e tetraciclina (LI *et al.*, 2020).

5.4 Comparação da abundância de genes de resistência entre amostras de solo, efluente tratado e de água do açude

A abundância média de GRAs total neste estudo foi representada pelo somatório das médias dos genes *blaTEM*, *ermB*, *qnrB*, *sull* e *tetA* das amostras de efluente tratado, solo e de água do açude. A abundância de GRAs total do efluente tratado foi de 4.24×10^6 ($6.62 \log_{10} \pm 7 \times 10^6$ cópias de GRAs). No solo 1, a abundância referente à média de todas as coletas (n=20) foi de aproximadamente 3.10×10^{10} ($10.5 \log_{10}$) $\pm 3.18 \times 10^{10}$. Quanto ao solo 2, foi de 4.5×10^9 ($9.6 \log_{10}$) $\pm 4.5 \times 10^9$ e do açude 4.18×10^3 ($3.62 \log_{10}$) $\pm 3.59 \times 10^3$.

A diminuição dos valores relativos em relação aos valores absolutos das amostras estudadas sugere uma queda na proporção entre os genes de resistência em relação às bactérias no ambiente, possivelmente pela diminuição de cópias do gene de resistência em relação à quantidade de cópias do rRNA 16S. Quanto aos dados relativos, é possível perceber um decaimento de GRAs de até um 1 \log_{10} de número de cópias entre o solo 1 e solo 2, contudo, não houve diferença estatística ($p \leq 0,05$) dos dados relativos dos GRAs ao comparar as duas amostras de solo, que se assemelharam muito.

Apesar de não ser possível comparar a abundância relativa do efluente tratado à da água do açude, devido ao pequeno número

amostral, nota-se em primeira análise uma menor quantificação de GRAs no ambiente do açude do que nos demais, sendo esse ambiente um possível sumidouro de GRAs (GAO *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2021).

Ao se comparar a abundância relativa do efluente tratado e o solo que recebeu esse efluente, nota-se uma diferença de até 3 log₁₀ de GRAs, refletindo uma maior quantificação significativa ($p \leq 0,05$) quanto aos genes *ermB*, *blaTEM* e *tetA* no efluente do que no solo 1 (com decaimento de 3,06; 3,15 e 2,31 log₁₀ da abundância relativa respectivamente). Esses resultados podem levar à hipótese de que ocorre uma diminuição da quantidade de GRAs após o lançamento do efluente tratado no solo, possivelmente ocasionado pela mudança das condições ambientais, diferença do microbioma, temperatura, entre outros fatores e que a fertirrigação direta não parece ter influenciado na quantificação de GRAs totais no solo 1, já que uma quantidade semelhante foi encontrada no solo 2.

Apesar do gene *sull* ter sido detectado em maior abundância nas amostras S1, S2 e E (média de 9,81 e 8,95 log₁₀ cópias de genes *sull*/g de solo e 7,47 log₁₀ gene/mL de amostra, respectivamente) não foi encontrado aumento ou diminuição significativa ($p \leq 0,05$) desse gene entre a abundância relativa das amostras. Contudo, já foi encontrada correlação positiva entre o gene *sull* e a intensidade de irrigação com água residuária (KAMPOURIS *et al.*, 2021), além do mesmo gene também ter sido o mais abundante nas amostras investigadas por Ben *et al.* (2017);

Um fato preocupante é que o gene *sull* também já foi encontrado em solos prístinos em alta abundância (PARTRIDGE *et al.*, 2009; WANG, 2014). Esse fato pode sugerir que o gene *sull* seja persistente nos ambientes.

No açude à jusante do solo 1 e solo 2 percebeu-se uma maior abundância relativa do gene *blaTEM* (média de 0,31 log, n=2), mas em menor abundância nas amostras de

solo e do efluente tratado (-2,88, -2,59, -0,57 solos 1 e solo 2 e efluente tratado, respectivamente). Apesar da menor amostragem dos dados (n=2), notou-se que a maior abundância relativa dos genes *blaTEM* (mecanismo enzimático de resistência) e *tetA* (bomba de efluxo) e a integrase *int1* ocorreram no açude. Já os genes *ermB* (mecanismo de alteração no alvo do antibiótico) e *qnrB* (mecanismo enzimático de resistência) apresentaram maior abundância nas amostras de efluente tratado e o gene *sull* (mecanismo de alteração do alvo do antibiótico) apresentou maior abundância relativa nas amostras de solo.

5.5 Correlação entre genes de resistência a antibióticos e o gene da integrase 1 nas amostras de solo

Nas amostras de S1, houve correlação moderada do gene RNAr 16S com ao gene *blaTEM* (0,54), além da correlação forte da integrase *int1* com os genes *ermB*, *sull* e *tetA* (0,71, 0,88 e 0,74 respectivamente). A correlação entre o gene *blaTEM* e bactérias totais pode estar associado ao resistoma natural do solo. Kampouris *et al.* (2021) corroboraram o fato de que os genes *blaTEM* e *blaCTX* são membros estáveis do resistoma natural do solo, já que não foram afetados com a fertirrigação.

Já no S2 também foi observado correlações positivas entre *int1* com o gene *sull* e *ermB* (0,79- forte e 0,60 – moderada, respectivamente), além de correlação forte e negativa quanto ao *int1* e *tetA* (-0,72). Em adição, foram observadas correlações negativas e fracas entre o gene *blaTEM* e a integrase *int1* nas duas amostras de solo (-0,48 no solo 1 e -0,59, $p \leq 0,05$).

Como a integrase *int1* corresponde a um indicador potencial de transferência horizontal de genes *ermB* e *sull* (WANG, 2014), é provável que este elemento móvel esteja envolvido na disseminação desses

genes nas duas áreas de solo amostradas. Khan *et al.* (2013) também encontraram altos níveis de *sull* e *intl*, indicando correlação forte com ambientes contaminados por antimicrobianos. Através de uma análise multifásica, Kampouris *et al.* (2021) concluíram que genes *sull* e *intl* (além dos genes *qnrS* e *blaOXA-58*), foram aumentados pela irrigação com efluente tratado.

Um estudo anterior, realizado com amostras de solos prístinos na Antártica também verificou a existência de 177 genes que conferem resistência a antimicrobianos naturais, contudo, não foram encontrados elementos genéticos móveis, como integrons, transposons e recombinases. A resistência parece ter se dado através de transferência vertical (de geração em geração das bactérias) e não horizontal (VAN GOETHEM *et al.*, 2018).

É importante destacar que em estudo recente também em solos prístinos intocados no Tibete, região do planalto da Ásia, foram encontrados EGM, em que o integron *intl* foi o mais abundante, levando ao entendimento de que tais elementos não são exclusivos de ambientes antropizados (LI *et al.*, 2020).

Concluindo, a presença de genes de resistência a antibióticos sintéticos como os que conferem resistência às sulfonamidas (*sull*) e fluoronoquinolonas (*qnrB*) assim com a presença do elemento genético móvel *intl* pode indicar a ocorrência de transferência horizontal desses genes entre as bactérias do solo, já que bactérias poderiam replicar o gene e transferir a outras bactérias do ambiente bem como bactérias patogênicas, levando a um problema de saúde pública. Não foi possível analisar correlações das amostras de açude, devido ao número pequeno de amostras (n=2) e não foram observadas correlações entre genes nas amostras do efluente tratado (n=4).

5.6 Correlação entre elementos genéticos de resistência e parâmetros COT, NT, pH e granulometria nas amostras de solo

Não foram observadas correlações entre os elementos genéticos de resistência - EGR e os parâmetros COT, NT e pH (n=20, p<0,05) entre as amostras do solo 1, o que pode significar que a quantidade de carbono, nitrogênio e a variação do pH não tem relação com os GRAs investigados no solo fertirrigado. Já no S2, o pH das amostras de S2 foi correlacionado com todos os genes estudados (n=20), destacando-se a correlação positiva forte com os genes *ermB*, *sull* e o gene *intl* (0,72, 0,75 e 0,72); além ser também observada correlação moderada entre o gene RNAr 16S e COT, indicando uma possível relação entre as bactérias totais e matéria orgânica natural do solo 2. Dessa forma, os genes *ermB*, *sull* e o gene *intl* parecem estar mais relacionados ao pH mais alcalino do solo sem fertirrigação direta.

O solo 1 que contém maior teor de argila, na teoria seria mais propício às interações com bactérias do que o solo 2, tendendo a ter uma maior quantificação de bactérias. Todavia, a média dos dois solos em relação às bactérias totais e aos somatórios de GRAs foram bem próximos nas duas amostras (solo 1: 9.3 ± 0.17 e 8.6 ± 1.53 e solo 2: 9.23 ± 0.40 e 8.06 ± 1.21 log₁₀ do número de cópias do gene RNAr 16S e cópias de GRAs/g de solo) levando à conclusão de que a granulometria do solo parece não ter interferido na quantificação de bactérias e GRAs. Quanto ao efluente tratado, também não foram encontradas correlações entre os genes e o pH, COT e NT.

Em resumo, não foi possível perceber um padrão de correlação entre o teor de matéria orgânica no efluente tratado e no solo 1 que recebeu esse efluente tratado nas coletas realizadas, e apesar da provável contribuição da acidez do solo através da fertirrigação e da contribuição do efluente tratado para o aumento de carbono orgânico

total e nitrogênio, esses parâmetros em primeira análise parecem não estar

envolvidos diretamente na quantificação de GRAs através da fertirrigação no solo.

6 CONCLUSÃO

Todos os genes de resistência a antibióticos investigados (*ermB*, *tetA*, *sull*, *intl*, *qnrB*, *blaTEM*) e o elemento genético móvel *intl* foram detectados em todas as campanhas amostrais de solos, efluentes tratados e água de açude. O gene *sull*, relativo à resistência a sulfonamidas, foi o mais abundante entre as amostras, com exceção das amostras do açude em que prevaleceram maior abundância do gene *blaTEM* (resistência a beta-lactâmicos). Genes *sull* e *tetA* foram significativamente mais abundantes no solo diretamente fertirrigado do que no solo sem fertirrigação direta. Como esses genes estavam presentes no efluente tratado, é possível que a fertirrigação esteja contribuindo para o aumento do gene de resistência a sulfonamidas e tetraciclinas nesse ambiente. A presença concomitante do gene da integrase nas amostras de solo, bem como a forte correlação observada deste com o gene de resistência a eritromicina e sulfonamida, sugere que a transferência horizontal de genes esteja envolvida na disseminação de GRAs no solo.

7 AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (código de financiamento nº 001), Fundação Nacional de Saúde (FUNASA - código do projeto: 25100.015.575;2017-86), Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico (CNPq- código 423101/2018-8), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e à Universidade Federal de Ouro Preto.

8 REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, E. P. C.; SANTOS, H. G.; ZARONI, M. J. **Solos tropicais - Latossolos Vermelho-Amarelos**. Brasília, DF: Embrapa, 2021. Disponível em: <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/tematicas/solos-tropicais/sibcs/chave-do-sibcs/latossolos/latossolos-vermelho-amarelos>. Acesso em 20 out. 2021.
- ARAÚJO, J. C. D.; SILVA, S. Q.; AQUINO, S. F.; FREITAS, D. L.; MACHADO, E. C.; PEREIRA, A. R.; PARANHOS, A. G. O.; DIAS, C. P. Antibiotic Resistance in the Environment: Antibiotic resistance, sanitation, and public health. *In*: MANAIA, C. M.; DONNER, E.; VAZ-MOREIRA, I.; HONG, P. (org.). **Antibiotic Resistance in the Environment: A Worldwide Overview**. Cham: Springer Nature, 2020. v. 91, p. 189-216.
- ARSAND, J. B.; HOFF, R. B.; JANK, L.; BUSSAMARA, R.; DALLEGRAVE, A.; BENTO, F. M.; KMETZSCH, L.; FALCÃO, D. A.; PERALBA, M. C. R.; GOMES, A. A.; PIZZOLATO, T.M. Presence of antibiotic resistance genes and its association with antibiotic occurrence in Dilúvio River in southern Brazil. **Science of The Total Environment**, Amsterdam, v. 738, p. 139781, 2020.
- BEN, W.; WANG, J.; PAN, X.; QIANG, Z. Dissemination of antibiotic resistance genes and their potential removal by on-farm treatment processes in nine swine feedlots in Shandong Province, China. **Chemosphere**, Oxford, v. 167, p. 262-268, 2017.

- CAETANO, G. L. **Avaliação de elementos genéticos de resistência a antibióticos em área sob influência da fertirrigação com efluente tratado de uma granja de suinocultura.** 2021. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2021.
- CHEN, L. F.; CHOPRA, T.; KAYE, K. S. Pathogens Resistant to Antibacterial Agents. **Medical Clinics of North America**, Philadelphia, v. 95, n. 4, p. 647-676, 2011.
- CHEN, H.; ZHANG, M. Occurrence and removal of antibiotic resistance genes in municipal wastewater and rural domestic sewage treatment systems in eastern China. **Environment International**, New York, v. 55, p. 9-14, 2013.
- CHEN, C.; LI, J.; CHEN, P.; DING, R.; ZHANG, P.; LI, X. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistances in soils from wastewater irrigation areas in Beijing and Tianjin, China. **Environmental Pollution**, Barking, v. 193, p. 94-101, 2014.
- CZEKALSKI, N.; SIGDEL, R.; BIRTEL, J.; MATTHEWS, B.; BÜRGMANN, H. Does human activity impact the natural antibiotic resistance background? Abundance of antibiotic resistance genes in 21 Swiss lakes. **Environment International**, New York, v. 81, p. 45-55, 2015.
- DONG, P.; WANG, H.; FANG, T.; WANG, Y.; YE, Q. Assessment of extracellular antibiotic resistance genes (eARGs) in typical environmental samples and the transforming ability of e ARG. **Environment international**, New York, v. 125, p. 90-96, 2019.
- FERRIS, M. J.; MUYZER, G.; WARD, D. M. Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 62, n. 2, p. 340-346, 1996.
- FILIZOLA, H. F.; GOMES, M. A.F.; SOUZA, M. D. **Manual de procedimentos de coleta de amostras em áreas agrícolas para análise da qualidade ambiental:** solo, água e sedimentos. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2006. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/129660/1/2006OL-008.pdf>. Acesso em: 4 jul. 2021.
- GAO, H.; ZHANG, L.; LU, Z.; HE, C.; LI, Q.; NA, G. Complex migration of antibiotic resistance in natural aquatic environments. **Environmental Pollution**, Barking, v. 232, p. 1-9, 2018.
- GOLDSTEIN, C.; LEE, M. D.; SANCHEZ, S.; HUDSON, C.; PHILLIPS, B.; REGISTER, B.; GRADY, M.; LIEBERT, C.; SUMMERS, A. O.; WHITE, D. G.; MAURER, J. J. Incidence of class 1 and 2 integrases in clinical and commensal bacteria from livestock, companion animals, and exotics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v. 45, n. 3, p. 723-726, 2001.
- HAN, X. M.; HU, H. W.; SHI, X. Z.; WANG, J. T.; HAN, L. L.; CHEN, D.; HE, J. Z. Impacts of reclaimed water irrigation on soil antibiotic resistome in urban parks of Victoria, Australia. **Environmental Pollution**, Barking, v. 211, p. 48-57, 2016.
- HEUER, H.; SOLEHATI, Q.; ZIMMERLING, U.; KLEINEIDAM, K.; SCHLOTER, 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**, Washington, DC, v. 77, n. 7, p. 2527-2530, 2011.
- HSU, J. T.; CHEN, C. Y.; YOUNG, C. W.; CHAO, W. L.; LI, M. H.; LIU, Y. H.; LIN, C.; YING, C. Prevalence of sulfonamide-resistant bacteria, resistance genes and integron-associated horizontal gene transfer in natural water bodies and soils adjacent to a swine feedlot in northern Taiwan. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 277, p. 34-43, 2014.
- KAMPOURIS, I. D.; AGRAWAL, S.; ORSCHLER, L.; CACACE, D.; KUNZE, S.; BERENDONK, T. U.; KLÜMPER, U. Antibiotic resistance gene load and irrigation intensity determine the impact of wastewater irrigation on antimicrobial resistance in the soil microbiome. **Water Research**, New York, v. 193, p. 116818, 2021.
- KHAN, G. A.; BERGLUND, B.; KHAN, K. M.; LINDGREN, P. E.; FICK, JO. Occurrence and abundance of antibiotics and resistance genes in rivers, canal and near drug formulation facilities – a study in Pakistan. **PloS One**, San Francisco, v. 8, n. 6, p. e62712, 2013.
- LI, B.; CHEN, Z.; ZHANG, F.; LIU, Y.; YAN, T. Abundance, diversity and mobility potential of antibiotic resistance genes in pristine Tibetan Plateau soil as revealed by soil metagenomics. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 96, n. 10, p. 1-10, 2020.
- MAO, D.; YU, S.; RYSZ, M.; LUO, Y.; YANG, F.; LI, F.; HOU, J.; MU, Q.; ALVAREZ, P. Prevalence and proliferation of antibiotic resistance genes in two municipal wastewater treatment plants. **Water Research**, New York, v. 85, p. 458-466, 2015.
- NEGREANU, Y.; PASTERNAK, Z.; JURKEVITCH, E.; CYTRYN, E. Impact of treated wastewater irrigation on antibiotic resistance in agricultural soils. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 46, n. 9, p. 4800-4808, 2012.
- OSIŃSKA, A.; KORZENIEWSKA, E.; HARNISZ, M.; NIESTĘPSKI, S. Impact of type of wastewater treatment process on the antibiotic resistance of bacterial populations. **E3S Web of Conferences**, Roubaix, v. 17, n. 70, p. 1-8, 2017.
- PARTRIDGE, S. R.; TSAFNAT, G.; COIERA, E.; IREDELL, J. R. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 33, n. 4, p. 757-784, 2009.
- 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**, Amsterdam, v. 506, p. 279-286, 2015.
- PEREIRA, A. R.; PARANHOS, A. G. D. O.; AQUINO, S. F.; SILVA, S. D. Q. Distribution of genetic elements associated with antibiotic resistance in treated and untreated animal husbandry waste and wastewater. **Environmental Science and Pollution Research**, Brussels, v. 28, n. 21, p. 26380-26403, 2021.
- SANTOS, C. D. S. M. **Visão de futuro para a produção de antibióticos: tendências de pesquisa, desenvolvimento e inovação**. 2014. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.
- TAO, C.; HSU, B.; JI, W.; HSU, T.; KAO, P.; HSU, C.; SHEN, S.; SHEN, T.; WAN, T.; HUANG, Y. Evaluation of five

antibiotic resistance genes in wastewater treatment systems of swine farms by real-time PCR. **Science of The Total Environment**, Amsterdam, v. 496, p. 116-121, 2014.

VAN GOETHEM, M. W.; PIERNEEF, R.; BEZUIDT, O. K.; VAN DE PEER, Y.; COWAN, D. A.; MAKHALANYANE, T. P. A reservoir of 'historical' antibiotic resistance genes in remote pristine Antarctic soils. **Microbiome**, Cham, v. 6, n. 1, p. 1-12, 2018.

ZEINELDIN, M.; ALDRIDGE, B.; LOWE, J. Antimicrobial effects on swine gastrointestinal microbiota and their accompanying antibiotic resistome. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 10, Article 1035, p. 1-14, 2019.

ZHANG, Y.; SHEN, G.; HU, S.; HE, Y., LI, P.; ZHANG, B. Deciphering of antibiotic resistance genes (ARGs) and potential abiotic indicators for the

emergence of ARGs in an interconnected lake-river-reservoir system. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 410, p. 124552, 2021.

WANG, F. H.; QIAO, M.; LV, Z. E.; GUO, G. X.; JIA, Y.; SU, Y. H.; ZHU, Y. G. Impact of reclaimed water irrigation on antibiotic resistance in public parks, Beijing, China. **Environmental Pollution**, Barking, v. 184, p. 247-253, 2014.

WANG, J.; LIN, H.; SUN, W.; XIA, Y.; MA, J.; FU, J.; ZHANG, Z.; WU, H.; QIAN, M. Variations in the fate and biological effects of sulfamethoxazole, norfloxacin and doxycycline in different vegetable-soil systems following manure application. **Journal of hazardous materials**, Amsterdam, v. 304, p. 49-57, 2016.

WHO. **Implementation of the global action plan on antimicrobial resistance**. Geneva: World Health Organization, 2015.