



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE
UNIDADE ACADÊMICA DE SAÚDE
CURSO BACHARELADO EM FARMÁCIA

MARIA DAS GRAÇAS MORAIS DE MEDEIROS

**ANÁLISE METAGENÔMICA DE POPULAÇÕES BACTERIANAS EM SOLO DA
CAATINGA E A PROSPECÇÃO DE LINHAGENS RESISTENTES AOS
ANTIMICROBIANOS**

CUITÉ – PB

2019

MARIA DAS GRAÇAS MORAIS DE MEDEIROS

**ANÁLISE METAGENÔMICA DE POPULAÇÕES BACTERIANAS EM SOLO DA
CAATINGA E A PROSPECÇÃO DE LINHAGENS RESISTENTES AOS
ANTIMICROBIANOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de farmácia da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Igor Luiz Vieira de Lima Santos

CUITÉ – PB

2019

M488a Medeiros, Maria das Graças Morais de.

Análise metagenômica de populações microbianas em solo da caatinga e a prospecção de linhagens resistentes aos antimicrobianos. / Maria das Graças Morais de Medeiros. – Cuieté: CES, 2019.

54 fl.

Monografia (Curso de Graduação em Farmácia) – Centro de Educação e Saúde / UFCG, 2019.

Orientação: Dr.º Igor Luiz Vieira de Lima Santos.

1. Bactérias resistentes. 2. Análise genética. 3. Sequenciamento. I. Título.

MARIA DAS GRAÇAS MORAIS DE MEDEIROS

**ANÁLISE METAGENÔMICA DE POPULAÇÕES BACTERIANAS EM SOLO DA
CAATINGA E A PROSPECÇÃO DE LINHAGENS RESISTENTES AOS
ANTIMICROBIANOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de farmácia da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Igor Luiz Vieira de Lima Santos

APROVADO EM: 20 /11/2019

BANCA EXAMINADORA:



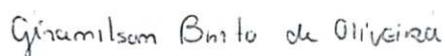
Prof. Dr. Igor Luiz Vieira de Lima Santos

(Orientador/UABQ/CES/UFCG)



Marcus José Conceição Lopes

(Examinador/UABQ/CES/UFCG)



Givanilson Brito de Oliveira

(Examinador/UAS/CES/UFCG)

*Dedico este trabalho primeiramente a Deus, pela fé e força,
a meus pais, Avani e Evandro, por sempre estarem me
apoiando e estando ao meu lado em toda minha vida, e aos
meus amigos por todos os momentos tão preciosos.*

AGRADECIMENTOS

Creio que primeiro o certo seja agradecer a Deus sobre todas as coisas, Aquele que tudo pode e nada teme. Nele em quem confiei meus objetivos, conquistas, medos, inseguranças e principalmente os dias difíceis. Obrigada Deus e Nossa Senhora do Perpétuo Socorro pelas bênçãos e proteção.

Agradeço imensuravelmente a minha família, em especial meus pais, Avaní e Evandro, por nunca me deixarem faltar absolutamente nada, do exemplo aos esforços que nunca mediram para me ajudar a ser quem sou hoje. Agradeço ao meu avô Agrício, obrigada por toda ajuda durante esses anos e por sempre se mostrar orgulhoso de mim. E é claro, obrigada a Costelinha, nosso menininho, por ser nosso porto seguro, por ser uma reserva absoluta de pureza e alegria para todos nós.

Agradeço ao Prof. Dr. Igor Santos, pela oportunidade de fazer parte desta pesquisa, por ter a honra de participar da criação do nosso grupo de pesquisa, nossa BASE, literalmente. Obrigada pelo repasse de todos os conhecimentos e ensinamentos desde o primeiro período, desde aquela primeira aula com o documentário sobre Mendel (que inclusive, cheguei atrasada pois estava escolhendo os livros de genética), pelos conselhos, pelos cuidados, puxões de orelha, em resumo, pelo título de “a filha de Igor”.

Agradeço também ao grupo BASE (Biotecnologia Aplicada à Saúde e Educação) por todas as oportunidades e conhecimentos, momentos de ciência e também de descontração em nossa querida Dubai. Agradeço em especial a Amanda, minha primeira irmã de pesquisa, minha sucessora, minha pupila de pesquisa, obrigada pelos dias de coleta das amostras literalmente no “pingo do meio dia”, pelas manhãs, tardes e noites no laboratório, pelos finais de semana, pelas mensagens de conforto e por ser sempre muito proativa em me ajudar e aprender, amo você.

Gratidão aos meus alunos de monitoria, em especial aos que se tornaram verdadeiros amigos. Gabi, você em particular é um dos meus maiores “projetos”, ajudei a vencer seus medos e hoje trabalha comigo me enchendo de orgulho, obrigada por ser minha outra irmã de BASE e de vida, amo você.

Agradeço a todos os professores do curso de Farmácia da UFCG e aos que fizeram parte da minha vida acadêmica antes da graduação, bem como meus supervisores de estágios

(obrigatórios e não obrigatórios), saibam que seus ensinamentos de cada um foram essenciais para que eu me torne uma boa profissional.

Agradeço ao CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil pelo programa PIBIC/CNPq-UFCG na manutenção da minha bolsa de Iniciação Científica, a Universidade Federal de Campina Grande campus Cuité-PB pela disponibilização do Laboratório H-01, bem como a Universidade Federal de Pernambuco pelas análises realizadas no Laboratório FAMA (Fisiologia Animal Molecular Aplicada) e no laboratório LGBS (Genoma-Laboratório de Genética, Bioquímica e Sequenciamento de DNA).

Gratidão extrema as minhas amoras Thaísia, Jéssica, Tainá e Ianne por nossa essa irmandade, por tudo durante esses anos. Por sempre proporcionarem os melhores momentos das sempre tão curtas férias, pelos cafés da tarde, rodas de conversa na sorveteria, pelas partidas de UNO, filmes, e acima de tudo pelos votos de confiança e esperança em mim, em resumo: por existirem. Amo-as como irmãs.

As minhas pessoas, meus presentes de Cuité, meu grupão, são vocês: Sayuri, Marcus, César, Camila, Lucas, Bruna e Carol por compartilharem comigo os melhores e os piores momentos da minha vida, pelas noites de estudo, pelos almoços, pelas noites de diálogos sobre os mais diversos assuntos, pelas teorias, pelas revisões de provas, pelas farras, pelos melhores cinco anos da minha vida. Como eu sempre disse, vocês apareceram no pior momento da minha vida porque Deus precisava de um jeito para me lembrar que a vida é boa, que tenho motivos para sempre seguir em frente, e que “o carrossel nunca para de girar”.

Deus é tão bom o tempo todo que fez questão de colocar mais pessoas incríveis em minha vida, são vocês: Letícia, Sabrina, Thaynara, Iara, Ricardo, Ítalo, Fernando, Carlos, Arielly, Francisco (“Chico”), Josué e Karine. Obrigada por serem tão especiais comigo, por tantos momentos por tanto carinho. Outras, ele apenas recolocou, fortalecendo ainda mais laços da infância, à você Othon, muito obrigada por tudo.

Agradeço aos componentes do famoso apartamento 498: Camila, Lucas, Carol e Sayuri, obrigada pelos momentos tão incríveis (todos), vocês foram essenciais para tudo. Cada refeição, cada discussão, cada TPM, cada papo mais maluco, cada momento foi essencial. Do fundo do coração agradeço em especial a ela, Camila, pois foi através de você que ganhei muitos dos meus presentes, que aprendi que “vai dar certo”, que os problemas um dia viram motivos de risada, e que a gente consegue sim o que deseja. Será impossível comer uma empadinha doce e não lembrar de vocês (risos). Obrigada por tudo, vocês são incríveis demais.

A primeira que me acolheu, que tanto me ensinou, que cuidou de mim não só como uma irmã, também como uma mãe. Amanda Nóbrega, muito obrigada por exatamente tudo o que fez e faz por mim. Um anjo na minha vida.

A Lala e família, minha segunda família em Cuité, obrigada por me acolherem como integrante da família de vocês, por me dar a honra de todos aqueles momentos, por todos os cuidados e atenção, serei grata eternamente.

Agradeço a minha eterna duplinha Sayuri, por todas as nossas histórias, tantas conversas, comprinhas e por todas as incontáveis ajudas. Todos os momentos serão sem dúvidas inesquecíveis. Minha gêmea de outra origem, minha irmã, minha pessoa em Cuité. Sinto tanta gratidão por nossa amizade.

Creio que de todos, um esteve comigo desde o primeiro dia de aula até o último, e para toda vida, amém. Uma das únicas pessoas que conseguiu me fazer gritar de raiva de verdade, mas também um dos que mais me fez sorrir durante todo esse tempo. Alguém que eu vi crescer como ser humano e profissional, aquele que sempre foi sincero comigo. Aquele que me cativa tanto orgulho e agradecimento. Sinto tanto orgulho da pessoa que você tem se tornado meu menino, Marcus Vinícius. Muito obrigada por sua amizade e existência.

Por fim, de uma maneira completa, quero agradecer a minha turma, ou melhor, A TURMA, Turma XVI de farmácia, aos eternos feras, a turma mais incrível que todos já viram, a turma mais inovadora do CES. Cada um de vocês é essencial e incrível, o mundo é nosso.

Creio que de um modo geral posso dizer que sou extremamente grata a Deus por todos os momentos e por todas as pessoas que entraram e criaram raízes na minha vida. Pude aprender e ensinar a “matar um leão de cada vez”, a dar e receber os melhores sentimentos que um ser humano consegue. AMO VOCÊS!

“O que realmente somos é resultado da genética de nossos pais, do pensamento e educação de quem nos criou e do local em que nascemos ”

Tiago Vilas Boas

RESUMO

As bactérias estão presentes nos mais diversos ambientes, tais como a água, os alimentos, plantas, animais e também no solo. O solo atua como um sistema de abrigo para diversos microrganismos, proporcionando um habitat natural, já os antibióticos estão entre as classes farmacológicas mais importantes. O objetivo geral foi realizar um estudo de identificação de microrganismos bacterianos presentes em solo da caatinga e analisar a presença de linhagens e genes que conferem resistência a antibióticos nessa população. A metodologia foi baseada na utilização de técnicas da biologia molecular e da bioinformática como diluições seriadas, plaqueamento e contagem, extração, Reação em Cadeia da Polimerase, Eletroforese em Gel com Gradiente de Desnaturação e sequenciamento, com o propósito inicial de prospectar populações presentes em três amostras de solo da caatinga. Como resultados, foram observadas populações microbianas patogênicas e não patogênicas, similaridades e dissimilaridades entre locais de amostras, além da presença evidente de resistência aos antimicrobianos, convergindo para preocupações com relação ao uso indiscriminado de antibióticos e sobre sua resistência. O isolamento e a identificação de microrganismos presentes no solo da caatinga são de grande importância científica, social e econômica, pois auxiliam na busca por mecanismos de resistência aos antimicrobianos e em como encontrar soluções para essa problemática.

Palavras-chave: Bactérias resistentes, Análise genética, Sequenciamento.

ABSTRACT

Bacteria are present in the most diverse environments, such as water, food, plants, animals and also in the soil. The soil acts as a shelter system for various microorganisms, providing a natural habitat, while antibiotics are among the most important pharmacological classes. The objective was to carry out a study of identification of bacterial microorganisms present in caatinga soil and to analyze the presence of strains and genes that confer resistance to antibiotics in this population. The methodology was based on the use of molecular biology and bioinformatics techniques such as serial dilutions, plating and counting, extraction, Polymerase Chain Reaction, Denaturation Gradient Gel Electrophoresis and sequencing, with the initial purpose of prospecting populations present in three caatinga soil samples. As a result, pathogenic and non-pathogenic microbial populations were observed, similarities and dissimilarities between sample sites, as well as the evident presence of antimicrobial resistance, converging to concerns regarding the indiscriminate use of antibiotics and their resistance. The isolation and identification of microorganisms present in the caatinga soil are of great scientific, social and economic importance, as they help in the search for mechanisms of antimicrobial resistance and how to find solutions to this problem.

Keywords: Resistant bacteria, Genetic analysis, Sequencing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa da cidade de Cuité-PB evidenciando os pontos de coleta das amostras.....	32
Figura 2 - Fórmula para o cálculo do coeficiente de Jaccard.....	35
Figura 3 - Amostras de solo coletadas de três pontos do município de Cuité-PB. Amostra 01: Hospital Municipal Nossa Senhora das Mercês. Amostra 02: Proximidades da estrada que dá acesso ao município de Nova Floresta-; Amostra 03: Proximidades da escola Orlândio Venâncio PB.....	36
Figura 4 - Amostras de bactérias de pontos de coleta da caatinga crescendo em meio de cultivo LB após inoculação com água diluída do solo.....	37
Figura 5 - Amostras isoladas de bactérias dos três pontos de coleta da caatinga crescendo em meio de cultivo LB adicionado de 100µg/mL do antibiótico Ampicilina.....	37
Figura 6 - Amostras isoladas de bactérias dos três pontos de coleta da caatinga crescendo em meio de cultivo LB adicionado dos antibióticos Ampicilina - 100µg/mL, Higromicina - 150µg/mL e Kanamicina - 10µg/mL.....	38
Figura 7 - Extração de DNA das amostras ambientais e de <i>E. coli</i> isolada como controle positivo. CP: <i>E. coli</i> ; P1: Ponto 1; P2: Ponto 2; P3: Ponto 3.....	39
Figura 8 - Ponto 1 amplificado com WABI; 2: Ponto 2 amplificado com WABI; 3: Ponto 3 amplificado com WABI; 4: Marcador de Peso Molecular 100pb; 5: Ponto 1 amplificado com ISBA; 6: Ponto 2 amplificado com ISBA; 7: Ponto 3 amplificado com ISBA.....	40
Figura 9 - DGGE das amostras analisadas dos três pontos. CN: Canaleta sem Amostra; P1: Amostra do Ponto 1; P2: Amostra do Ponto 2; P3: Amostra do Ponto 3.....	41
Figura 10 - Dendograma de similaridade entre as amostras P1, P2 e P3.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Matriz de presença e ausência dos fragmentos observados no DGGE.....	42
Tabela 2 – Coeficientes das três amostras analisadas, sendo o 4 um controle negativo.....	43
Tabela 3 – Identificação bacteriana com base na sequência 16S rDNA utilizando os primers ISBA.....	45

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Análise populacional de UFC ⁻³ das amostras P1, P2 e P3.....	44
--	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ARDRA	Análise de Restrição de DNA Ribossomal Amplificado
ARGs	Resistência aos Antibióticos
BASE	Biociência Aplicada à Saúde e Educação
CES	Centro de Educação e Saúde
CGEN	Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
CTAB	Brometo de Cetil Trimetil Amônio
DGGE	Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DNA _g	DNA genômico
DNA _m	Ácido Desoxirribonucléico metagenômico
ESBLs	β -lactamases de espectro estendido
FAMA	Fisiologia Animal Molecular Aplicada
FAME	Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos
GNB	Bacilos Gram-Negativos
HGT	Transferência Gênica Horizontal
ISBA	Primers 16S rDNA desenvolvidos pelo grupo de pesquisa
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
LB	Luria Bertani
LGBS	Genoma-Laboratório de Genética, Bioquímica e Sequenciamento
mA	Miliampere
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
Mim	Minutos
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OMS	Organização Mundial da Saúde

P1	Ponto de coleta 01 – Proximidades do Hospital Municipal de Cuité-PB
P2	Ponto de coleta 02 – Saída para Nova-floresta-PB
P3	Ponto de coleta 03 – Proximidades da Escola Orlando Venâncio
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PCR-DGGE	Reação em Cadeia da Polimerase e Eletroforese em Gel com Gradiente desnaturante
PFGE	Eletroforese em Campo Pulsado
PLFA	Perfis de Ácidos Graxos Fosfolipídicos
RAPD	Amplificação Aleatória de DNA Polimórfico
RDP	Ribosomal Database Project
RISA	Análise de Espaçadores Intergênicos de RNA Ribossômico
rRNA	Ácido Ribonucléico ribossômico
SARST	Análise Seriada de Sequência Ribossômica
SISGen	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético
SSCP	Polimorfismo de conformação de fita simples
T-RFLP	Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição Terminal
UAS	Unidade Acadêmica de Saúde
UFMG	Universidade Federal de Campina Grande
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UV	Ultravioleta
V	Volts
VRE	<i>Enterococcus</i> Resistente à Vancomicina
WABI	Conjunto de primers universais

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	18
2.	JUSTIFICATIVA	21
3.	OBJETIVOS	23
3.1.	Objetivo Geral	23
3.2.	Objetivos Específicos.....	23
4.	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	24
4.1	Importância das Bactérias	24
4.2	Técnicas moleculares para identificação bacteriana.....	24
4.3	Crise mundial dos antibióticos e bactérias resistentes.....	24
4.4	Metagenômica.....	30
4.5	Caatinga.....	31
5.	METODOLOGIA	32
5.1.	Coletas e locais de amostragem.....	32
5.2.	Contagem e cultivo de microorganismos.....	32
5.3.	Extração de DNA Metagenômico (DNAm)	33
5.4.	Construção dos Primers para PCR.....	33
5.5.	Reações de PCR	34
5.6.	PCR-DGGE (Eletroforese em Gel com Gradiente de Desnaturação).....	34
5.7.	Sequenciamento de DNA	35
5.8.	Viabilidade.....	35
6.	Resultados e discussão	36
6.1	Cultivo microbiano.....	36
6.2	Extração de DNA metagenômico.....	36
6.3	Reações PCR com o gene 16S rDNA	36
6.4	PCR-DGGE.....	41
6.5	Análise populacional.....	43
6.6	Análise de bactérias resistentes	44
7.	CONCLUSÕES.....	47
8.	PERSPECTIVAS	48
	Referências	49

1. INTRODUÇÃO

As bactérias estão presentes nos lugares mais variados como o ar, a água, em humanos ou animais, plantas, até mesmo no solo, e possuindo um curto tempo de reprodução são capazes de responder de maneira rápida as mudanças e condições ambientais (GUIMARÃES, 2010; FRACAROLLI, OLIVEIRA e MARZIALE, 2017).

Contemplando uma imensa e diversificada variedade microbiana o solo é um sistema complexo portador de diversas características químicas e biológicas, sendo considerado alvo de vários estudos relacionados à ação e resistência microbiana sendo bastante estudado nas análises de determinação da diversidade e de genes de resistência biótica. Além de atuar como habitat, o solo atua favorecendo a troca de material genético e conseqüentemente favorece a disseminação dos genes entre as populações bacterianas (MINOTTO, 2014; NESME & SIMONET, 2015).

Sendo assim, estruturas de comunidades bacterianas presentes no solo podem ser medidas de modo tradicional a partir de perfis de ácidos graxos fosfolipídicos – PLFA. Porém, atualmente o sequenciamento combinado às técnicas de metabarcodificação possibilitaram novos estudos dessas estruturas independentes de cultivo. Esses estudos podem contar com o auxílio da análise do gene 16S rDNA que é estruturalmente diferente entre os microrganismos possibilitando sua identificação em nível molecular (ORWIN et al., 2018).

Devido possuírem uma notável plasticidade genética, as bactérias conseguem responder a uma ampla gama de ameaças ambientais, incluindo a presença de moléculas de antibióticos que podem comprometer sua existência (MUNITA e ARIAS, 2016). Os antibióticos por sua vez causam efeitos quando introduzidos no meio, pois sua presença permite a obtenção de respostas rápidas pelas bactérias e conseqüentemente adaptações que resultam em mecanismos de resistência às drogas, a partir de mutações ou assimilação de alterações genéticas dos mais diversos tipos propiciando a multiplicação dessas bactérias agora resistentes (GUIMARÃES, 2010; FRACAROLLI, OLIVEIRA e MARZIALE, 2017).

De modo que, tal classe farmacológica é considerada a revolução médica do século XX, pois os antibióticos representam uma das classes mais importantes no contexto histórico de redução de vítimas de patologias infecciosas (BÉRDY, 2005; NESME e SIMONET, 2015). Sendo clara a observação que seu uso indevido apresenta riscos à saúde populacional de modo geral humana, animal e vegetal, bem como ao meio ambiente e em alguns casos à economia

(DA COSTA e JUNIOR, 2017). A prevalência de resistência aos antibióticos é intimamente dependente de seu uso e consumo indiscriminado no cotidiano humano, podendo possibilitar a presença de organismos resistentes individualmente, ou seja, no paciente, mas também pode estimular maior resistência presente na comunidade microbiológica global, onde neste caso considera-se uma grande ameaça à saúde pública (BOADA, 2018; ROUSHAM, 2018).

Tal fato é explicado, onde:

“O mau uso desses fármacos acelera o processo natural de resistência das bactérias contra os antibióticos, devido ao fato de que no ambiente natural esses antimicrobianos são produzidos por populações microbianas como ferramenta de competição por recursos nutricionais e espaço dentro do micro-habitat que ocupam” (DA COSTA e JUNIOR, 2017, p. 45-57).

Um fato incontestável é que o crescimento da resistência bacteriana é diretamente proporcional aos gastos com tratamentos de saúde e internações. A Organização Mundial da Saúde (OMS) passou a considerar a resistência bacteriana atualmente como um problema mundial (SAMPAIO et al., 2018). Esse problema é ampliado pela dificuldade para reproduzir a diversidade microbiana em escala laboratorial e assim poder estudá-la. Sendo assim, são necessárias técnicas baseadas ou não no cultivo para posterior análise de modificações genéticas nas populações microbianas, isto resultará em informações e conhecimentos sobre o comportamento ambiental e populacional desses microrganismos (SANTOS et al., 2009). Com relação ao bioma Caatinga, o mesmo abrange uma área que representa 10,7% da área do Brasil, sendo composta por florestas tropicais sazonalmente secas da região neotropical. A biodiversidade desse bioma sempre foi dita como pobre e repleta de baixos níveis de endemismo, porém mudanças sobre esse pensamento têm sido vistas progressivamente ao longo dos anos. Tais pensamentos em conjunto implicam no interesse em buscar novos estudos relacionados as populações microbianas do solo deste bioma (ERNESTO et al., 2018; ROTHEÁ et al., 2019).

O isolamento ou identificação dos microrganismos do solo deste bioma é de grande importância científica, social econômica, auxiliando assim na busca por mecanismos de resistência aos antimicrobianos e em como resolver tal demanda. O objetivo geral da pesquisa foi realizar um estudo inicial de identificação de microrganismos bacterianos presentes em solo da caatinga e analisar a presença de genes que conferem resistência aos antibióticos nessa

população utilizando e otimizando técnicas e processos da biologia molecular para alcançar esses objetivos.

2. JUSTIFICATIVA

Diversas espécies bacterianas têm apresentado resistência a algum tipo de antibiótico e isso é de conhecimento e preocupação global. Acredita-se que entre dez bactérias isoladas pelo menos oito apresentam resistência, pelos mais diversos mecanismos, a algum tipo de antibiótico conhecido. Atualmente, tem se notado um grande esforço dos cientistas no interesse em descobrir tais mecanismos de atuação e elucidação de genes e vias bioquímicas responsáveis por esta resistência.

A pressão evolutiva e a seleção imposta pelo meio sofrida por esses organismos desde as épocas ancestrais tornaram-nos possuidores de um armamento bioquímico eficiente, permitindo sua sobrevivência devido a sua capacidade adaptativa extremamente rápida. A descoberta do último antibiótico descrito, a ceftarolina, ocorreu em 2010 e em 2011 já foi identificada uma linhagem de *Staphylococcus* resistente a este tipo de cefalosporina. Nesse contexto, é de suma importância a busca do entendimento dos mecanismos de adaptação das bactérias.

O bioma caatinga entra na questão por ser pouco estudado e os organismos nele presentes podem possuir novas estratégias de sobrevivência. É possível que nesse importante bioma as bactérias presentes também estejam sofrendo alguma pressão seletiva obrigando-as a se adaptar utilizando toda maquinaria molecular disponível para sua sobrevivência, como a captação de DNA exógeno e a guerra biológica responsável muitas vezes pela resistência aos antimicrobianos.

Dito isto, é de extrema importância a análise coordenada das populações presentes neste solo e também as possíveis fontes para o surgimento e a transmissão de genes que conferem resistência aos antibióticos conhecidos. Pesquisas dessa natureza permitem um maior entendimento de como a resistência aos antimicrobianos é transmitida entre diferentes classes de microrganismos. Isto pode possibilitar a obtenção de informações endereçadas às agências governamentais para focalizar em estudos que revelem tais mecanismos e que possam contribuir para o controle desenfreado do aparecimento de microrganismos resistentes que afetam a saúde humana nos mais diversos locais ou até mesmo monitorá-los. Além disso, esta pesquisa permitirá o desenvolvimento de recursos humanos especializados da universidade para o mundo focados em encontrar meios para minimizar estes problemas atuais que afetam a sociedade global. A exemplo de um caso de bactéria resistente descrito agora em agosto de 2019 na cidade de Currais Novos-RN, bem como, uma não bactéria, mas um parasita resistente aos tratamentos anti-leishmaniose tem ocorrido em Sergipe com 150 novos casos tratando-se

de um novo organismo identificado por análise genética molecular. As pesquisas nesta área auxiliarão no engrandecimento não só do meio acadêmico, mas também da sociedade de modo geral, procurando estabelecer técnicas para entender e identificar com eficiência formas de resolver ou minimizar tais problemas objetivando a aplicabilidade.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

- Realizar um estudo de identificação de microrganismos bacterianos presentes em solo da caatinga e analisar a presença de genes que conferem resistência aos antibióticos nessa população.

3.2. Objetivos Específicos

- Desenvolver um estudo populacional molecular das bactérias presentes no solo do bioma caatinga;
- Realizar um estudo de genética molecular para identificação das espécies presentes;
- Identificar possíveis bactérias resistentes aos antibióticos neste solo.

4. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

4.1 Importância das Bactérias

As bactérias podem ser consideradas como repositórios naturais de substâncias com elevado valor biotecnológico. No Brasil, diversos esforços significativos foram feitos na pesquisa de toxinas bacterianas por instituições científicas de renome, como o Instituto Butantan, a Fundação Ezequiel Dias e os centros localizados nas Universidades de São Paulo, Campinas, Federal do Rio de Janeiro e Estadual de Londrina. Nesse contexto, essas instituições contribuíram para o progresso nesse campo da ciência e para o estabelecimento da Sociedade Brasileira de Toxinologia, instituição dedicada à aquisição de conhecimentos sobre toxinas animais, vegetais e microbianas (LOPES, 1997).

A exemplo disso estão a aplicação das reações anaeróbias da fermentação do açúcar por várias bactérias e a conversão do leite, onde ambas produzem diferentes produtos finais. Da mesma forma, a produção de etanol por leveduras é explorada pela indústria cervejeira há milhares de anos e é usada na produção de combustíveis. Bactérias específicas realizam a oxidação do álcool em ácido acético na produção de vinagre. Outros processos de fermentação geram produtos ainda mais valiosos. Compostos orgânicos, como acetona, isopropanol e ácido butílico, são produzidos na fermentação por vários *Clostridium* espécies e pode ser preparado em escala industrial. Outros produtos e reações bacterianas foram descobertos em organismos de ambientes extremos. Atualmente existe um interesse considerável nas enzimas isoladas de bactérias termofílicas, nas quais as reações podem ser realizadas a taxas mais altas devido às temperaturas mais altas nas quais elas podem ocorrer (KARA e KADNER, 2019).

Além das aplicações citadas, uma das principais é a que diz respeito aos estudos para criação de novos antibióticos, a exemplo primordial da penicilina. Onde, a partir dos estudos de colônias estafilocócicas Fleming fez tal descoberta, sendo tal fato considerado o marco inicial para um rápido crescimento na descoberta e desenvolvimento de novos antibióticos (GUIMARAES; MOMESSO e PUPO, 2010; PEREIRA e PITA, 2018).

Já no que diz respeito as bactérias patogênicas que invadem a corrente sanguínea, estas podem usar vários mecanismos para evitar o sistema imunológico do hospedeiro, incluindo a formação de longas cadeias lipopolissacarídicas para fornecer resistência a um grupo de proteínas imunes séricas, chamadas complemento, que normalmente retardam a bactéria. A reestruturação patogênica das proteínas da superfície bacteriana impede que os anticorpos

produzidos pelo animal reconheçam o patógeno e, em alguns casos, dá ao patógeno a capacidade de sobreviver e crescer nos glóbulos brancos fagocitários. Muitas bactérias patogênicas produzem toxinas que as ajudam a invadir o hospedeiro. Entre essas toxinas estão proteases, enzimas que quebram as proteínas dos tecidos e lipases, enzimas que quebram lipídios (gordura) e danificam as células, rompendo suas membranas. Outras toxinas interrompem as membranas celulares, formando um poro ou canal. Algumas toxinas são enzimas que modificam proteínas específicas envolvidas na síntese de proteínas ou no controle do metabolismo das células hospedeiras; exemplos incluem toxinas da difteria, cólera e coqueluche (LOPES, 1997).

Comumente são listados na literatura que alguns microrganismos importantes na infecção humana, como os bacilos Gram-negativos (GNB), incluindo enterobactérias como *Enterobacter sp.* e outros GNBs, como os fermentadores sem glicose, por exemplo, *P. aeruginosa*, podem persistir por longos períodos no ambiente. Os coliformes fecais (*E. coli*) têm sua resistência em condições extra intestinais menor quando comparada com o trato intestinal, portanto, sua presença pode ser tomada como indicação à contaminação fecal recente. Outras enterobactérias, incluindo coliformes não fecais e outros grupos de BNGs (não fermentadores e grupos nutricionalmente pouco exigentes), além dos enterococos (especialmente agentes importantes de infecções hospitalares), podem manter-se por períodos prolongados em ambientes como corpos d'água, instituindo vias de contaminação (LOPES, 1997).

O ambiente natural é reconhecido como um importante reservatório de bactérias resistentes a antibióticos, as atividades antropogênicas como a agricultura, resíduos de antibióticos e eliminação de águas residuais potencializam a transferência horizontal de genes de resistência (ROUSHAN et al., 2018). A diversidade microbiana tem papel fundamental na manutenção da qualidade dos solos (LOOD et al., 2018).

Apesar dessa imensa diversidade microbiana a maioria dos microrganismos não pode ser cultivada nos meios de cultura convencionais sua identificação só será possível utilizando técnicas avançadas de biologia molecular, associadas às técnicas de bio e eco informática, para análise de grandes bancos de dados (WANG et al., 2018).

4.2 Técnicas Moleculares para Identificação Bacteriana

Para entender melhor a função de uma população bacteriana é necessária uma descrição detalhada do ecossistema microbiano por métodos e técnicas de biologia molecular. Avanços recentes na análise molecular de ecossistemas bacterianos permitiram uma melhor compreensão dos microrganismos específicos (HOU et al., 2015). Por exemplo, a clonagem e o sequenciamento dos fragmentos do gene 16S rDNA fornecem informações sobre a filogenia dos microrganismos.

Juntamente com a bioinformática as análises estatísticas e filogenéticas são vistas como as mais promissoras ferramentas nos estudos visando à caracterização das comunidades microbianas e como elas estão se comportando em diferentes condições ambientais (JAKA et al., 2018). Além dessa, o DGGE – Eletroforese em Gel com Gradiente de Desnaturação e o SSCP - Polimorfismo de conformação de fita simples oferecem possibilidades simples, baratas e sensíveis para detectar se os fragmentos de DNA são ou não idênticos em sequência e pode reduzir significativamente a quantidade de sequenciamentos de DNA necessários para identificação molecular tornando o processo menos oneroso (GHAI et al., 2018).

Associado a estas áreas o estudo da microbiota do solo tem sido realizado por diferentes técnicas dentre elas podemos citar: PLFA (ORWIN et al., 2018), FAME, SSCP (MACGREGOR e AMANN, 2006), ARDRA, T-RFLP (POLYMENAKOU et al., 2005), RAPD (EFTEKHAR e NOURI, 2015; FARIVAR et al., 2018), RISA (BORIN et al., 2006), SARST, sequenciamento de clones de rDNA e hibridização em micro arranjos (NEUFELD et al., 2006), PFGE (ABDALRAHMAN et al., 2015; VITALE et al., 2018), PCR-DGGE (LIU et al., 2017).

Justamente pela existência de inúmeras técnicas disponíveis que existe um crescente interesse no estudo de um grande número de comunidades de microrganismos de forma independente de cultura, através do metagenoma (VENTOSA et al., 2015; HOVER et al., 2018; HULTMAN et al., 2018). Técnicas metagenômicas permitem a investigação da biodiversidade evitando a grande contagem de placas e extensas reações de PCR (VERA-GARGALLO e VENTOSA, 2018). Sequências de DNA genômico (DNAg) e DNA metagenômico (DNAm) provenientes de populações bacterianas nativas presentes no solo, sedimento e areia podem ser amplificadas pelo uso da reação em cadeia da polimerase (PCR) (POPOWSKA et al., 2011). Essas reações de PCR, tendo como alvo a região 16S rDNA, são direcionadas e têm sido utilizadas extensivamente para estudar a diversidade procariótica permitindo sua identificação

bem como a predição de relações filogenéticas. O produto de PCR resultante pode ser separado por diferentes metodologias dentre as quais o DGGE (VERA-GARGALLO et al., 2018).

O DGGE foi primeiramente utilizado para a identificação de mutações pontuais tendo o seu uso posteriormente expandido para o estudo da diversidade genética microbiológica em amostras ambientais sem necessidade de cultura (MUYZER et al., 1993). No entanto, com a introdução e o avanço em tecnologias de sequenciamento e estudos genômicos, a análise da comunidade microbiana atingiu uma nova era com o auxílio de técnicas independentes de cultura (VALÁŠKOVÁ e BALDRIAN, 2009). Apesar disso, a eletroforese em gel de gradiente desnaturante ou DGGE ainda é uma ferramenta poderosa e de baixo custo para estudos de ecologia microbiana (LIU et al., 2017).

Até o momento não está evidente a busca de estudos utilizando metodologias moleculares com a finalidade de isolar e avaliar a dinâmica populacional microbiana com perspectivas ao isolamento de potenciais alvos para produção de agentes farmacêuticos ou biotecnológicos em solo do bioma brasileiro caatinga.

4.3 Crise Mundial dos Antibióticos e Bactérias Resistentes

A poluição por antibióticos pode facilitar o desenvolvimento e a disseminação da resistência a antibióticos (Martinez 2008). Os antibióticos usados na medicina humana e veterinária podem entrar no ambiente por meio de efluentes de estações de tratamento de efluentes, efluentes de hospitais e unidades de processamento, aplicação de resíduos agrícolas e biossólidos nos campos e vazamentos de contêineres e aterros sanitários (KÜMMERER, 2009; SARMAH et al., 2006). Uma das dificuldades de relacionar níveis aumentados de resistência no ambiente à poluição por antibióticos, no entanto, é o fato de que genes de resistência a antibióticos podem ser co-liberados no ambiente com compostos antibióticos (KÜMMERER, 2009). A questão então é se um aumento observado na resistência emergiu como resultado da pressão seletiva do antibiótico no ambiente ou se emergiu no hospedeiro tratado.

Considera-se que nos encontramos na “Era pós-antibiótico”, pois no ano de 2014 a Organização Mundial de Saúde advertiu que a crise de resistência a antibióticos está se tornando bastante preocupante. A disseminação da resistência é global, incluindo *Streptococcus pneumoniae* e *Mycobacterium tuberculosis*. Patógenos Gram-negativos são particularmente

preocupantes, pois estão se tornando resistentes a várias classes de medicamentos disponíveis (VENTOLA, 2015).

O amplo uso desses medicamentos, os antibióticos, nos campos da terapia médica, pecuária e controle de doenças de plantas e animais durante os últimos 65 anos resultaram no rápido crescimento e prevalência global de microrganismos com multirresistência a antibióticos carregando muitos genes com esta finalidade (RAFRAF et al., 2016; SELVARAJ et al., 2018; BARANCHESHME e MUNIR, 2018). A resistência aos antibióticos contra as drogas disponíveis é uma das principais razões para procurar drogas novas como antibióticos de origem natural para combater patógenos multirresistentes (BÉRDY et al., 2005). É amplamente aceito que novas drogas, especialmente antibióticos, são urgentemente necessárias e que os microrganismos são a fonte mais propícia desse produto (MIYAZAKI e KITAHARA, 2018).

Para Wu et al. (2018) três caminhos existem para a resistência dos organismos primeiro, a liberação de antibióticos na dose de sub-inibição resultante de atividades antrópicas exercendo uma pressão seletiva de longa duração sobre a comunidade microbiana ambiental. Em segundo lugar, bactérias resistentes podem continuar proliferando, disseminando e persistindo no meio ambiente. Em terceiro lugar, o transporte de genes de resistência aos antibióticos (ARGs) entre bactérias de diferentes espécies via transferência gênica horizontal (HGT) persistindo na comunidade microbiana ambiental. Coutinho et al. (1999) encontraram plasmídeos presentes em microrganismos de solo no estado da Paraíba com resistência a metais pesados, este é um dos únicos relatos deste tipo para este estado, ainda assim não se fala sobre resistência bacteriana.

O aparecimento de resistência as drogas, em específico, aos antibióticos é um dos grandes problemas da medicina, pois é causada a partir da mutação espontânea juntamente com os mecanismos de recombinação genética, criando assim uma variabilidade genética onde se faz presente a atuação da seleção natural. Com relação ao termo “resistente” este está relacionado aos microrganismos que não se inibem pelas concentrações plasmáticas normalmente alcançadas, ou ainda, aqueles que apresentam mecanismos de resistência específicos para determinado agente (MOTA et al., 2005).

Dentre os principais dados disponíveis ficou evidente que existe uma maior preocupação da resistência a carbapenêmicos pelas *Enterobacteriaceae*, uma grande presença de colonizações por *S. aureus* também é preocupante havendo a necessidade de medidas de controles de infecções hospitalares mais adequadas e minuciosas (BECKETT; HARBARTH; HUTTNER, 2015). Delcaru et al. (2017) relatam que os organismos mais comumente isolados

nesses casos são *E. coli* (60%), seguida por *Enterococcus spp.* (15%) e *Klebsiella spp.* (8,2%). Outros estudos corroboram esses achados identificando a presença das mesmas espécies em 50-60% dessas infecções. Outras espécies enterobacterianas como *Proteus spp.*, *Enterobacter spp.*, *Serratia marcescens* e *Morganella morganii* também foram registradas. Organismos Gram-positivos, como *Enterococcus spp.*, são menos comuns no geral, mas são vistos com frequência crescente em ambientes de saúde e em adultos com cateteres nos quais *Pseudomonas spp.*, com sua resistência intrínseca, também é problemática (DELCARU et al., 2017).

Clemens et al (2016) revelaram em seus estudos que a resistência mais comum de espécies de *Pseudomonas* foi contra meropenem (30,4% / 158 isolados) piperacilina / tazobactam (10,6% / 55 isolados) e ceftazidima (4,2% / 22 isolados), além disso, 16 isolados (3,1% / 16 isolados) foram multirresistentes.

Estudos recentes destacam o surgimento de cepas de *K. pneumoniae* multirresistentes com resistência à colistina, antibiótico de última linha, e tal processo acontece através da inativação mutacional do gene regulador *mgrB* (TIMOTHY et al., 2017).

A resistência bacteriana pode ser transferida por diversos mecanismos, podendo estabelecer-se entre microrganismos de uma mesma população, bem como entre microrganismos de diferentes populações. Tal processo aparece, pois, o conjunto de genes das bactérias, ou seja, o genoma bacteriano é dinâmico, mesmo sendo também bastante pequeno e econômico, quando comparado ao genoma humano. A resistência antimicrobiana pode ser de origem genética ou não. Onde, quando se dá por origem não genética a bactéria adquire resistência a determinada droga momentaneamente não conseguindo transmiti-la para os indivíduos de sua progênie. Já a do tipo cromossômica ou de origem genética, surge através de mutações espontâneas, por exemplo, trocas simples de nucleotídeo, pela alteração ou superprodução do alvo, mudanças na síntese proteica ligadas à permeabilidade, sendo de extrema importância que tal processo não a torne inviável (MOTA et al., 2005).

Alguns exemplos de resistência surgem o tempo todo como a *Enterococcus* resistente à vancomicina (VRE), a *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), bactérias gram-negativas produtoras de resistência do tipo β -lactamases de espectro estendido (ESBLs) e *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) são casos significativos (EFTEKHAR e NOURI, 2015; HOU et al., 2015; BOADA et al., 2018; SIMNER et al., 2018; UZ ZAMAM et al., 2018). Além de tantos outros com resistência beta lactâmica também encontrada em *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Moraxella spp.* (YANG et al., 2011). Organismos anaeróbios também apresentam resistência tais como as

espécies do grupo *Bacteroides fragilis*, cepas de *Prevotella*, *Porphyromonas* spp., *Bilophila wadsworthia*, *Fusobacterium* spp. e *Clostridium* spp. (GHAI e GHAI, 2018; PALMER et al., 2018; ZOTHANPUIA et al., 2018).

Dentre todos os organismos vivos, o filo Actinobacteria representa atualmente o grupo mais prospectivo de microrganismos para a descoberta de compostos bioativos, como antimicrobianos, agentes antitumorais, antiparasitários, agentes anticancerígenos e enzimas. Foi demonstrado que 45% de todos os compostos bioativos de origem microbiana são produzidos por actinobactérias, mais de 70% dos quais são produzidos pelo maior gênero do Filo as *Streptomyces* (BULL et al., 2007; NESME et al., 2015; XIE et al., 2018; ZOTHANPUIA et al., 2018). Desde a descoberta do primeiro antibiótico a partir de actinobactérias em 1940, a actinomicina, a exploração destes microrganismos resultou no isolamento de antibióticos naturais até hoje. Actinobactérias foram extensivamente relatadas em solo, água doce, marinha e endofíticas de plantas e foram investigadas por suas possíveis contribuições para a indústria farmacêutica, demonstrando assim a importância em estudos e isolamentos de novos gêneros de interesse biotecnológico nos mais diversos ambientes (NESME et al., 2015). Bactérias predominantes de solo alcalino e seco estão sendo exploradas para várias aplicações biomédicas, ambientais e com fins industriais. Os diferentes biomas mostram um potencial recurso natural para descoberta de novas bactérias devido a sua alta diversidade de espécies (ARUMUGAM et al., 2017).

Apesar dessas observações, houve um sério declínio significativo na taxa da descoberta de novas substâncias ou processos antimicrobianos nos últimos anos. Portanto, a exploração de potenciais fontes em habitats inexplorados é uma abordagem importante para descobrir novos antibióticos para atender a atual e necessária demanda da sociedade na busca por soluções para tais problemas. Devido a isto há uma exigência incessante na busca por novos compostos bioativos em ambientes inexplorados como é o caso da caatinga.

4.4 Metagenômica

A metagenômica é uma ciência estratégica que surgiu como um novo ramo das ciências genômicas, referente ao estudo do metagenoma de um nicho específico, pode ser definido como o DNA total de uma amostra ambiental. Dados atuais denotam que diversos metagenomas de vários ambientes foram investigados, o que inclui ecossistemas aquáticos, minas, solos agrícolas e florestais. Cada estudo demonstrou diferentes aspectos para estudar e analisar, incluindo a descoberta de novos elementos genéticos que poderia ter aplicação na indústria, e a

contribuição de novos aspectos da ecologia microbiana em um ecossistema em particular (MARTINI, 2012).

O DNA metagenômico pode ser clonado em vetores e expresso em variados hospedeiros procarióticos, dependendo dos objetivos de cada estudo. O material genético pode codificar atividades metabólicas novas ou promover melhoramentos, bem como serem utilizados em análises de sequenciamento em massa (FAORO, 2010).

A Metagenômica possibilitou o acesso a essa vasta diversidade genética permitindo a análise direta do DNA de comunidades bacterianas. Sendo capaz também de atuar na superação de seus limites, uma vez que o DNA extraído diretamente de uma amostra ambiental, como solos, sem a necessidade de isolamento e cultivo, ampliando as chances de obter de novas e melhores enzimas, com características desejáveis para aplicação em biocatálise (HERNÁNDEZ-LEÓN ET AL., 2010).

4.5 Caatinga

A Caatinga é um bioma brasileiro localizado na região nordeste do país, ocupando cerca de 800.000 km². Limitado a leste e noroeste pelo Atlântico e Amazônia, e ao sul pelas savanas do Cerrado (CALDAS et al., 2016).

Caracterizada por sofrer influência do clima semiárido e coberta por vegetação xerófila, a região é composta por árvores e arbustos adaptados a grandes períodos de estiagem, apresentando características únicas que o tornam um bioma exclusivamente brasileiro (RIBEIRO, 2017). Extensos períodos de secas naturais promovem impactos socioeconômicos significativos para a população. As chuvas se concentram entre três a quatro meses do ano, resultando em um balanço hídrico negativo e alta aridez em regiões altamente adensadas, possuindo um solo com características particulares (RIBEIRO, 2017).

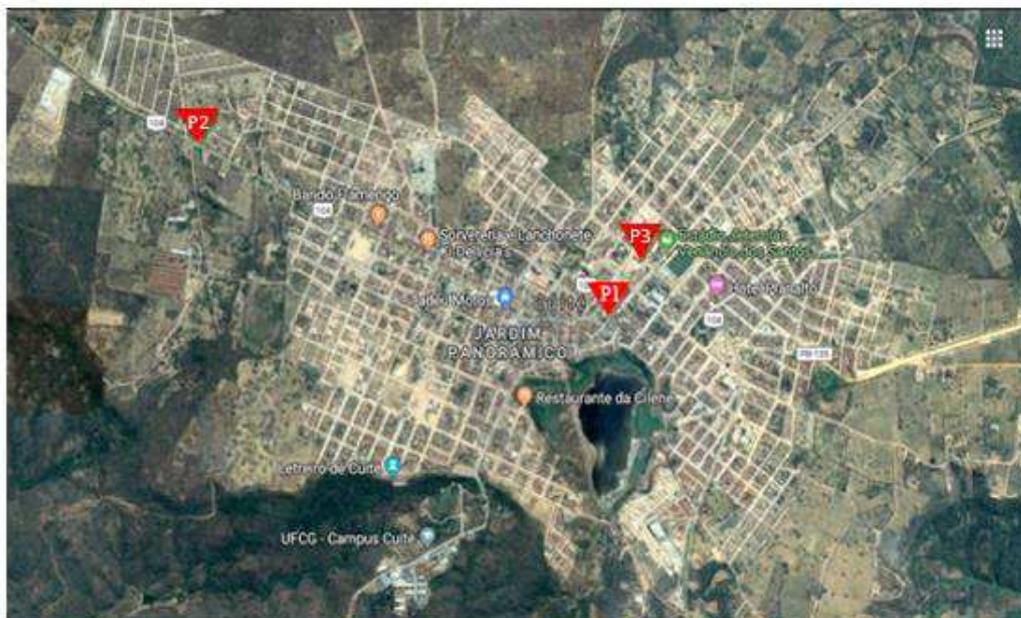
Apesar das condições estressantes presentes nas regiões componentes deste bioma limitarem o crescimento populacional microbiano, alguns microrganismos a exemplo das actinobactérias compõem um grupo significativo com relação a riqueza e diversidade nestes solos. As actinobactérias estão, portanto, presentes em abundância e de forma bastante diversificada (LIMA et al., 2014; BRITO et al., 2015; SILVA et al., 2015; MEDEIROS et al., 2018).

5. METODOLOGIA

5.1. Coletas e locais de amostragem

As amostras de solo utilizadas neste trabalho foram coletadas a 15 cm de profundidade com as mãos protegidas por luvas de látex em tubos de 50 mL. As coletas foram realizadas no município de Cuité-PB, cidade com coordenadas de $6^{\circ}29'43.8''\text{S}$ $36^{\circ}09'33.8''\text{W}$, em três pontos distintos com coordenadas $6^{\circ}29'07.6''\text{S}$ $36^{\circ}09'06.8''\text{W}$, $6^{\circ}29'01.8''\text{S}$ $36^{\circ}09'02.5''\text{W}$ e $6^{\circ}28'42.0''\text{S}$ $36^{\circ}10'10.2''\text{W}$. O município de Cuité situa-se na região centro-oeste do Estado da Paraíba, mesorregião do Agreste Paraibano e microrregião do Curimataú Ocidental. Os três locais de amostragens são de região de caatinga: P1 e P3 são de áreas antropizadas enquanto a P2 é de uma área mais afastada do centro urbano e preservada sem ação antrópica aparente, como mostra a Figura 1.

Figura 1: Mapa da cidade de Cuité-PB evidenciando os pontos de coleta das amostras: P1 – Proximidades do hospital municipal de Cuité-PB; P2 – Saída para Nova Floresta-PB; P3 – Proximidades da escola Orlando Venâncio.



Fonte: Google Maps

5.2. Contagem e cultivo de microorganismos

As comunidades microbianas gerais foram quantificadas pelo procedimento de diluições seriadas em placas de petri contendo meio de cultivo rico LB (Luria Bertani) composto de 10g de Bacto Triptona, 5g de Extrato de Levedura, 10g NaCl e 1ml de NaOH 1N (Opcional), quando sólido foi utilizado 15g de Ágar Bacteriológico para 1L.

Para o crescimento das bactérias resistentes foi utilizado o mesmo meio de cultivo acrescido do antibiótico específico. Os antibióticos e suas concentrações de teste foram definidos a partir do momento que foram realizados os isolamentos e as identificações moleculares das espécies, sendo utilizados no estudo os respectivos antibióticos, Kanamicina, Higromicina, Ampicilina, Azitromicina, Rifampicina e Tetraciclina, os quais foram utilizados nas concentrações finais de 10ug/mL, 150ug/mL, 100ug/mL, 100ug/mL, 50ug/mL e 100ug/mL.

Finalmente os cálculos necessários foram realizados para obter o valor final das unidades formadoras de colônias (UFCs/g de solo), a partir da média das colônias obtidas através das triplicatas de cada amostra. Sempre sendo realizado o controle negativo para cada plaqueamento todos os meios de cultivo foram autoclavados a 121°C por 20 minutos.

5.3. Extração de DNA Metagenômico (DNAm)

O DNA metagenômico foi extraído em triplicata utilizando a metodologia com uso do CTAB - Brometo de Cetil Trimetil Amônio. O DNA extraído foi quantificado por espectrofotometria observando-se a OD_{260/280nm} para uso nas reações de PCR para os genes 16S rDNA, após isso os DNAs foram diluídos para uma concentração final de 40ng/μl.

5.4. Construção dos Primers para PCR

Construiu-se uma base de dados composta por centenas de seqüências 16S rDNA dos Bancos de Dados GenBank (NCBI – National Center for Biotechnology Information) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e do (RDP-II – Ribosomal Database Project (release-11) (<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>) (COLE et al., 2014).

Após alinhadas pelo programa Clustal-Omega (THOMPSON et al., 1994) (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) foram visualizadas pelo programa BioEdit v7.0.4 (Tom Hall, Ibis Therapeutics, Carlsbad, CA, USA) (HALL, 1999) (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Posteriormente, as seqüências foram submetidas aos programas para a construção dos *primers* do NCBI (Pick Primers) e também pelo Primrose (ASHELFORD et al., 2002).

Os pares de oligonucleotídeos gerados foram confrontados com o banco de dados do release-11 do RDP-II através da ferramenta *probe match* permitindo a escolha dos que melhor se adequariam aos testes *in vitro*. Nas reações de PCR foram utilizados os *primers* 16S rDNA.

Após a confirmação *in vitro* da eficiência dos primers desenvolvidos, estes foram modificados para poder realizar as análises por PCR-DGGE. Assim, sintetizou-se um grampo

de GC com 40 nucleotídeos no primer forward para servir de ancoragem para a migração em gel de poliacrilamida com gradiente de desnaturação Uréia-Formamida 5' CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G 3' (NAKATSU et al., 2000).

5.5. Reações de PCR

As reações de PCR foram realizadas no termociclador (Life Eco - Bioer) contendo as seguintes concentrações 2,5mM de MgCl₂, 10nmole de DNTPs, 40ng de DNA molde, 40pmole de cada *Primer*, 2,5U de Taq DNA Polimerase (TaqLudwing) e 2µl de Tampão de Enzima 10x, para um volume final de 20µl. O programa utilizado para as ampliações dos DNAs consistiu em ciclos sucessivos de: desnaturação inicial de 94°C por 5min, seguida de 35 ciclos de 94°C por 1min, 56°C por 30s, 72°C por 1min, e uma extensão final de 72°C por 10 min. Os amplicons foram analisados em gel de agarose (Amershan Biosciences, Submarine Eletrophoresis Unit) a 1,0% durante 1 hora a 80V e 80mA, corados com corante sybr gold, submetidos ao transiluminador de UV e foto documentados com o aparato da Loccus (L-Pix, Biotecnologia, Brasil).

5.6. PCR-DGGE (Eletroforese em Gel com Gradiente de Desnaturação)

Após a confirmação da especificidade das ampliações os produtos de PCR foram analisados pela técnica de PCR-DGGE utilizando o aparelho DGGE-1001, C.B.S., Scientific Company em parceria com Universidade Federal de Pernambuco no Laboratório FAMA (Fisiologia Animal Molecular Aplicada). A PCR-DGGE foi realizada em poliacrilamida a 8% durante 16 horas a 75V e 75mA, com gradiente de desnaturação Uréia-Formamida de 40% a 70%, considerando uma solução 100% desnaturante aquela possuindo 40% vol/vol de formamida e 7M de Uréia, com a temperatura do tampão de corrida TAE 1x (40mM Tris, 20mM Ácido Acético, 1mM EDTA e pH 8.0) a 60°C. Foi inserido 10µl das reações de PCR em cada canaleta do DGGE corada com Syber Gold e foto documentados de modo similar aos géis de agarose. Com isso foi possível calcular as similaridades filogenéticas com matrizes binárias de presença ou ausência utilizando o Coeficiente de Jaccard, e em seguida agrupadas com o UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages) utilizando o programam DARWin 6.0.

A Figura 2 expressa a fórmula para realização do cálculo do índice de Jaccard, que tem como o objetivo indicar a proporção de similaridades compartilhadas entre as amostras numa análise multivariada.

Figura 2 – Figura que expressa a fórmula para o cálculo do coeficiente de Jaccard.

$$d_{ij} = \frac{b + c}{a + (b+c)}$$

Fonte: Próprio autor, 2019

5.7. Sequenciamento de DNA

Todos os genes amplificados neste trabalho dos organismos isolados foram submetidos ao sequenciamento de DNA pelo método de Sanger utilizando nucleotídeos didesoxi terminadores de cadeia em equipamento MegaBace 1000 (Amershan Bioscience) em parceria com Universidade Federal Rural de Pernambuco no laboratório LGBS (Genoma-Laboratório de Genética, Bioquímica e Sequenciamento de DNA). As sequências obtidas foram analisadas e confrontadas com bancos de dados para identificação das espécies de microrganismos existentes nas amostras por homologia molecular. Adicionalmente dependendo da disponibilidade orçamentária poderá ser realizado um sequenciamento nucleotídico metagenômico em larga escala para acessar de modo global todos os possíveis genes presentes nas amostras ambientais analisadas e também dos isolados encontrados como resistentes pelo cultivo.

5.8. Viabilidade

Este trabalho está em acordo com a Lei Nº 13.123, de 20 de maio de 2015 que define “patrimônio genético” como “informação de origem genética de espécies vegetais, animais, microbianas ou espécies de outra natureza, incluindo substâncias oriundas do metabolismo destes seres vivos” e “conhecimento tradicional associado” como “informação ou prática de população indígena, comunidade tradicional ou agricultor tradicional sobre as propriedades ou usos diretos ou indiretos associada ao patrimônio genético”. Este trabalho segue as normas do CGEN - Conselho de Gestão do Patrimônio Genético. Dito isto, a presente pesquisa cumpre todos os requisitos estabelecidos pela referida lei, bem como já está cadastrada no acesso ao patrimônio genético do SISGen.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Cultivo microbiano

O cultivo microbiano apresentou uma grande heterogeneidade no crescimento em meio LB para todas as amostras analisadas. Isto denota o grande potencial para o reconhecimento de linhagens resistentes a antibióticos presentes no meio, apesar das técnicas baseadas em cultivo celular serem limitadas devido as alterações metabólicas e nutricionais entre as diferentes populações de bactérias presentes no solo. Neste contexto é onde reside a importância da utilização de técnicas moleculares mais efetivas para um maior escaneamento e prospecção dos microrganismos resistentes e genes responsáveis por conferir resistência aos antibióticos em amostras ambientais. A Figura 3 mostra as amostras de solo coletadas de três pontos diferentes do município de Cuité-PB.

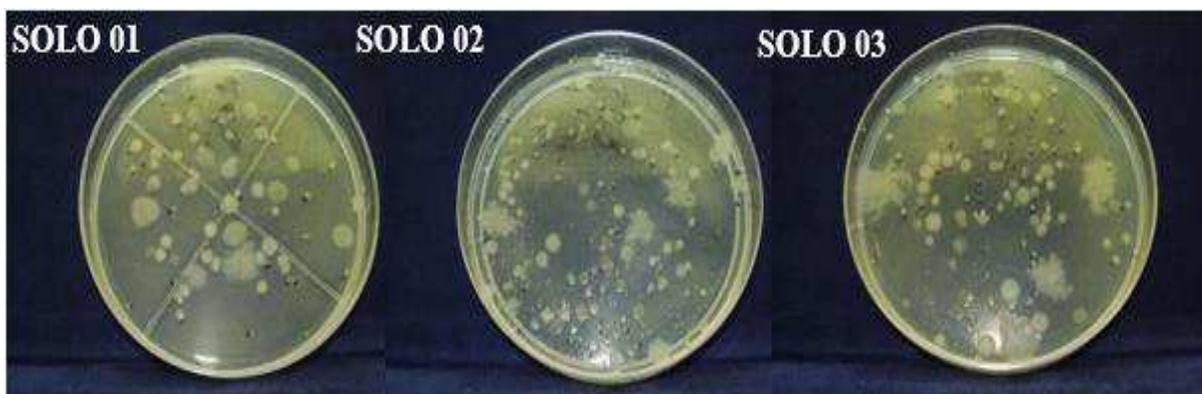
Figura 3 - Amostras de solo coletadas de três pontos do município de Cuité-PB. Amostra 01: Hospital Municipal Nossa Senhora das Mercês. Amostra 02: Proximidades da estrada que dá acesso ao município de Nova Floresta-; Amostra 03: Proximidades da escola Orlândio Venâncio PB.



Fonte: Próprio autor, 2019

A Figura 4 mostra as bactérias de solo crescendo em meio de cultivo rico sem pressão seletiva e formando colônias facilmente observáveis a olho nu com as mais diversas características morfológicas.

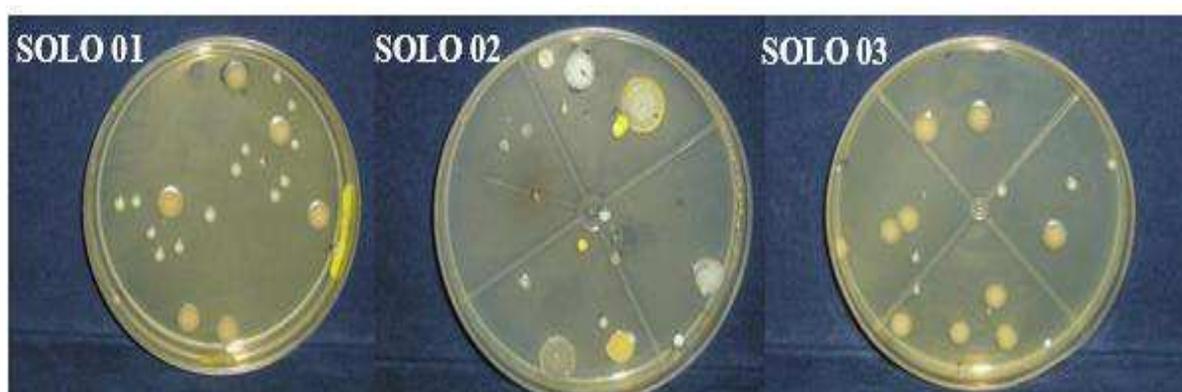
Figura 4 - Amostras de bactérias de pontos de coleta da caatinga crescendo em meio de cultivo LB após inoculação com água diluída do solo.



Fonte: Próprio autor, 2019.

Com o cultivo foi possível observar a complexa gama de bactérias presentes no solo. Importante notar no cultivo com antibiótico no Figura 5, em uma concentração recomendada pela comunidade científica como selecionadora de bactérias resistentes 100ug/mL (HAUHNAR et al., 2018), foi possível perceber uma diminuição do número de colônias disponíveis além da sua reduzida variabilidade morfológica, algumas apresentando tonalidades translúcidas, brancas, amareladas, avermelhadas e marrons.

Figura 5 - Amostras isoladas de bactérias dos três pontos de coleta da caatinga crescendo em meio de cultivo LB adicionado de 100µg/mL do antibiótico Ampicilina.



Fonte: Próprio autor, 2019.

A Figura 6 demonstra a análise em destaque da amostra de solo 03 exposta aos antibióticos Ampicilina - 100µg/mL, Higromicina - 150µg/mL e Kanamicina - 10µg/mL em concentração recomendada pela comunidade científica como selecionadora de bactérias resistentes 100ug/mL (HAUHNAR et al., 2018),

Figura 6 - Amostras isoladas de bactérias do ponto 3 de coleta da caatinga crescendo em meio de cultivo LB adicionado dos antibióticos Ampicilina - 100µg/mL, Higromicina - 150µg/mL e Kanamicina - 10µg/mL.



Fonte: Próprio autor, 2019.

Júnior et al. (2019) citam em sua pesquisa a recém atenção dada ao cultivo e caracterização dos microrganismos presentes em solos da caatinga, e explicam tal fato devido as características únicas e biológicas de tal bioma, permitindo assim a sobrevivência sob condições climáticas severas, como escassez de água e elevadas temperaturas.

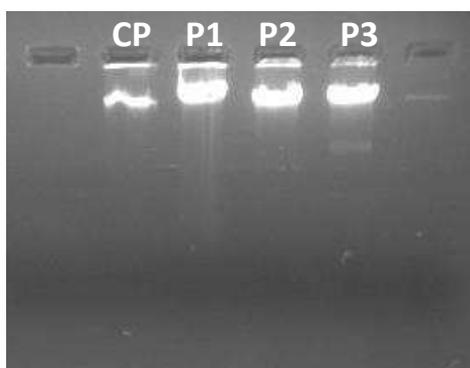
Guennadi, Joseleau-Petit e D'Ari (2007) citam que o meio Luria-Bertani é popularmente usado entre os bacteriologistas pois permite um crescimento rápido, além de bons rendimentos de crescimento para diversas espécies de bactérias encontradas em amostras de solo, por exemplo.

Já Carattoli et al. (2017), utilizaram em seu estudo amostras plaqueadas em diluições seriadas em meio sólido Luria-Bertani agar contendo 2 mg / L de sulfato de colistina e 100 mg/L de rifampicina, como marcadores de resistência para pMCR e CSH26 em *Enterobacteriaceae*, respectivamente.

6.2 Extração de DNA Metagenômico

O protocolo de extração de DNA metagenômico das amostras utilizando CTAB após enriquecimento do solo com meio de cultivo se mostrou eficiente em obter o DNA para as posteriores análises conforme mostrado na Figura 7. Apesar dos rastros observados abaixo das amostras as mesmas se mostraram promissoras nas ampliações dos genes 16S rDNA. Esses rastros podem ser provenientes da própria composição do solo contendo ácidos húmicos e outras substâncias aromáticas dificilmente separadas no protocolo de extração do DNA por CTAB.

Figura 7 - Extração de DNA das amostras ambientais e de *E. coli* isolada como controle positivo. CP: *E. coli*; P1: Ponto 1; P2: Ponto 2; P3: Ponto 3.



Fonte: Próprio autor, 2019.

Segundo Liu et al. (2018), em seu estudo envolvendo o gênero *Bacillus*, foi observada relação direta da dinâmica populacional com a composição da comunidade resistente em 13 genes de resistência a antibióticos e oito elementos genéticos móveis, analisados durante um processo de co-compostagem com gentamicina e resíduos de fermentação de lovastatina. Isso indica que a pressão seletiva gerada por processos de compostagem como temperatura e metabólitos secundários podem tornar mais fortes bactérias ali presentes que sobrevivam ao processo favorecendo também a sua resistência aos antibióticos.

6.3 Reações de PCR com o Gene 16S rDNA

Para as reações com o gene 16S rDNA foram utilizados conjuntos de primers específicos para esse gene. Os genes foram amplificados simultaneamente com os primers desenvolvidos e com os primers já descritos na literatura para o gene 16S rDNA. Os primers universais já descritos para o Domínio Bactéria possuem a sequência: WABI-341f 5` CCT ACG GGN GGC NGC AG 3` e WABI-926r 5` CCN TNA ATT NNT TTN AGT TT 3`, modificado de WATANABE et al., (2001). Os primers desenvolvidos pelo grupo de pesquisa não serão descritos devido a uma possível patente com os mesmos, estes foram denominados de ISBAf e ISBAr. Estes primers foram desenvolvidos utilizando milhares de sequências disponíveis nos bancos de dados do NCBI e do RDP-II e seus resultados têm se mostrado bastante promissores conforme Figura 5. Nesta figura é possível observar a clareza na distribuição dos amplicons com esse primer quando comparado ao conjunto de primer universal WABI. Isto é importante para as posteriores análises por DGGE e também por sequenciamento nucleotídico das linhagens isoladas dos respectivos pontos de coleta.

A análise da Figura 8 mostra que os amplicons possuem os tamanhos esperados para a amplificação do fragmento 16S rDNA pretendido que para os primers WABI é de 585pb,

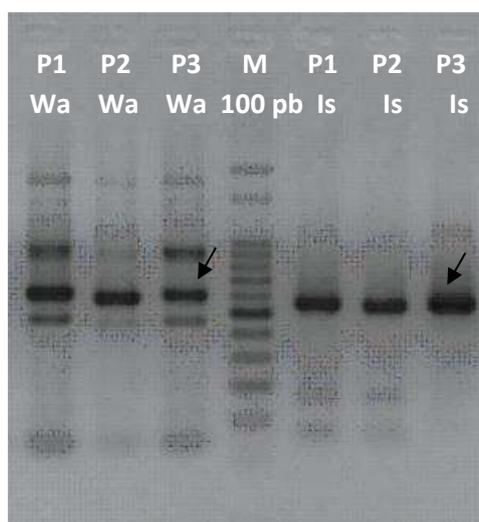
enquanto que para os primers ISBA é de 536pb, isto é facilmente observável com a utilização do marcador molecular na canaleta central do gel de agarose e com as bandas referentes ao ISBA um pouco mais abaixo que as bandas do WABI conforme indicadas pelas setas.

Dias (2015) em seus estudos também desenvolveu primers utilizando as sequências correspondentes aos genes 16S rDNA provenientes de bancos de dados e em seguida submeteu aos alinhamentos múltiplos, utilizando o programa Clustal-Omega e então, o resultado do alinhamento foi editado manualmente com o auxílio do programa BioEdit para a construção final dos primers.

Por outro lado, Silveira (2004) obteve em seu estudo DNAs que foram utilizados para a reação da PCR com oligonucleotídeos específicos para região 16S rDNA que resultavam na amplificação de um fragmento em 1500 pb apropriados para a construção de bibliotecas genômicas, a partir de amostras retiradas do solo.

Sendo assim, a metodologia utilizada para a construção dos primers bem como para sua aplicação, seja para sequenciamento direto ou para construção de bibliotecas genômicas, se mostrou efetiva podendo contribuir substancialmente para o isolamento identificação e análise global de populações microbianas não só no bioma caatinga mas nos diversos tipos de amostras dentre elas hospitalares.

Figura 8 - Ponto 1 amplificado com WABI; 2: Ponto 2 amplificado com WABI; 3: Ponto 3 amplificado com WABI; 4: Marcador de Peso Molecular 100pb; 5: Ponto 1 amplificado com ISBA; 6: Ponto 2 amplificado com ISBA; 7: Ponto 3 amplificado com ISBA.



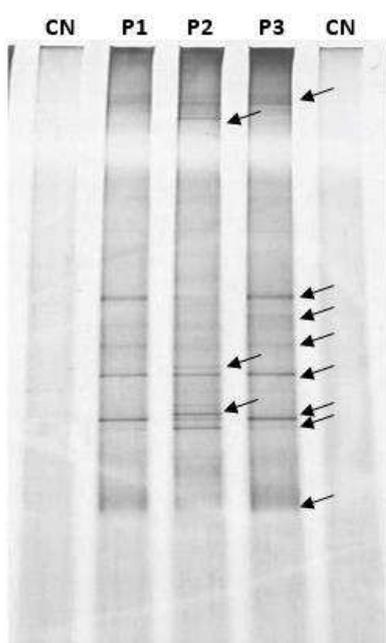
Fonte: Próprio autor, 2019.

O gene 16S rDNA foi usado nos estudos de Kavamura et al. (2013) com a finalidade de quantificar a abundância da comunidade bacteriana. A especificidade dos amplicons purificados foi confirmada no referido estudo sendo em geral o filo *Actinobacteria* dominante.

6.4 PCR-DGGE

Para a realização do DGGE foi sintetizado um grampo de nucleotídeos conforme descrito na metodologia no primer forward da série ISBA. Utilizando esse conjunto para amplificação por PCR e depois corrida em DGGE foi possível observar a variabilidade genética presente nas amostras analisadas como demonstrado na Figura 9. Essas amostras indicam uma alta conservação de sequências entre os três diferentes pontos analisados. Isto pode ser devido a própria pressão seletiva imposta e característica intrínseca deste ecossistema em si favorecendo mais alguns indivíduos em detrimento de outros. Até mesmo a própria resolução e limitação da técnica que não demonstraria toda a comunidade microbiana presente no solo em apenas uma corrida ou mostraria apenas as que mais estão presentes devido à amplificação por PCR. De todo modo, esses dados podem ser utilizados para as mais diversas finalidades como ecológicas, de preservação, saúde pública entre tantas outras, mostrando possivelmente os organismos mais abundantes no solo e se dentre estes existe algum de interesse médico ou biotecnológico.

Figura 9 - DGGE das amostras analisadas dos três pontos. CN: Canaleta sem Amostra; P1: Amostra do Ponto 1; P2: Amostra do Ponto 2; P3: Amostra do Ponto 3.



Fonte: Próprio autor, 2019.

Os resultados do DGGE mostraram um total de 11 bandas diferentes presentes nas três amostras. Com a análise dos fragmentos observados no DGGE foi possível construir uma matriz binária de presença e ausência de bandas que foi utilizada para construir um dendograma de similaridade entre as amostras observadas, como mostra a Tabela 1 e a Figura 10. Foi possível perceber que as maiores similaridades estão entre as amostras P1 e P3. Talvez pelo fato de serem provenientes de ambientes próximos e urbanos no entorno da cidade de Cuité-PB. Isto pode favorecer a similaridade observada nos fragmentos estudados. Um passo importante seria no futuro utilizar esses experimentos como base para a aquisição de informações a respeito de bactérias resistentes em ambientes públicos como hospitais e escolas, propiciando assim a melhor tomada de decisões do poder público frente a essas possibilidades antes que elas aconteçam.

Tabela 1 - Matriz de presença e ausência dos fragmentos observados no DGGE.

Bandas	P1	P2	P3
1	1	1	1
2	0	1	0
3	1	0	1
4	1	1	1
5	1	1	1
6	0	1	0
7	1	1	1
8	0	1	0
9	1	1	1
10	1	1	1
11	1	1	1

Fonte: Próprio autor, 2019

Figura 10 - Dendograma de similaridade entre as amostras P1, P2 e P3.



Fonte: Próprio autor, 2019

A Tabela 2 mostra os coeficientes gerados a partir do coeficiente de dissimilaridade de Jaccard. Tal propriedade permite comparação simultânea entre todas as amostras, sendo a 4 representativa de um controle negativo, isento de bandas. Através dos dados representados na tabela, observa-se maior similaridade entre as amostras de solo 1 e 3 (coeficiente próximo a 1), diferentemente da amostra 2 (coeficiente menor que 1). Essas semelhanças também podem ser verificadas no dendograma de similaridade das amostras na Figura 10.

Tabela 2 - Coeficientes das três amostras analisadas, sendo o 4 um controle negativo.

SOLOS	1	2	3	4
1	1			
2	0.636363636363636	1		
3	1.000000000000000	0.636363636363636	1	
4	0.000000000000000	0.000000000000000	0.000000000000000	1

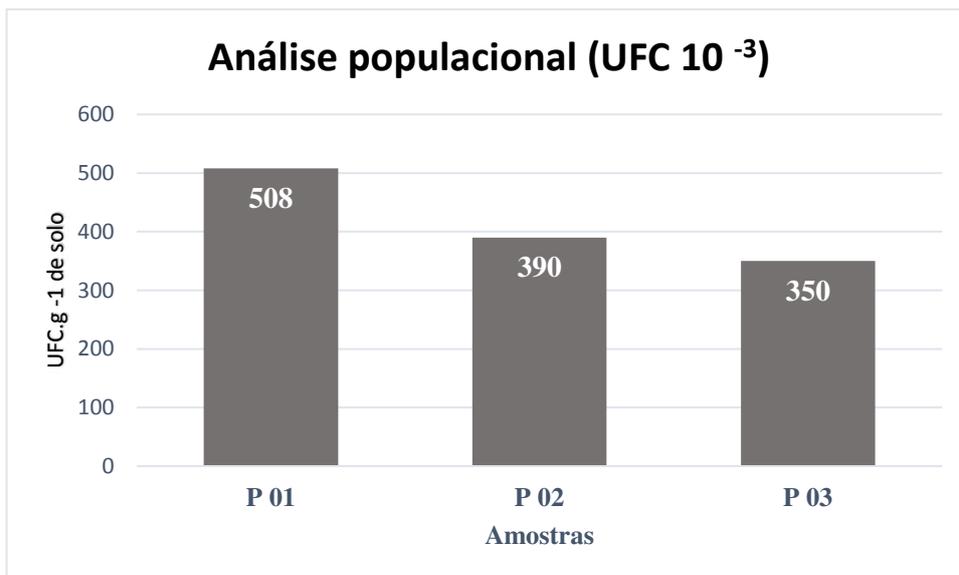
Fonte: Próprio autor, 2019

Os estudos de Videira e Cunha (2017) mostraram-se mais efetivos em uma de suas amostras (região V3 do gene 16S rDNA) o que implica que os dados da literatura que relatam os iniciadores para a região V3 são mais promissores para as análises de comunidades bacterianas em amostras ambientais, pois demonstram maior eficiência na amplificação por PCR, vasta cobertura taxonômica, além de diversidade e reprodutibilidade das análises. O primer desenhado para estes estudos denominado de ISBA compreende as regiões V3 a V6 do gene 16S rDNA.

6.5 Análise populacional

Foi possível observar a partir da análise populacional das Unidades Formadoras de colônia por grama de solo, utilizando uma diluição de 10^{-3} e a média das triplicatas de cada amostra, onde as amostras 01 e 02 apresentaram maiores quantidades de colônias, enquanto a amostra 03 expressou o menor valor, como mostra o gráfico 1.

Gráfico 1 – Médias dos valores de unidades formadoras de colônia (UFC/g de solo) após 48 horas de incubação em meio nutriente LB das amostras P1, P2 e P3.



Fonte: Próprio autor, 2019

Os estudos de Bueno et al. (2018) também mostrou similaridades em duas áreas quando comparadas a uma terceira. Os autores justificaram tal resultado devido à região possuir uma agroflorestal mais recente, refletindo uma menor atividade e composição microbiana. Representação essa da diversidade que pode ser vislumbrada também nas amostras em questão onde são provenientes de ambientes com atividades humanas diversas.

6.6 Análise das bactérias resistentes

Após a extração de DNA e as reações de PCR com os primers ISBA de dez bactérias isoladas os fragmentos de PCR foram submetidos a técnica de sequenciamento nucleotídico visando a identificação molecular desses organismos presentes no solo. Os resultados estão indicados na Tabela 3.

Tabela 3 - Identificação bacteriana com base na sequência 16S rDNA utilizando os primers ISBA das amostras do ponto de coleta 3.

Espécie	Query Coverage	E-Value	Identity
<i>Bacillus thuringiensis</i> strain VKK-AG-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	90%	0	96,24%
<i>Bacillus cereus</i> strain CaG6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	85%	0	96,04%
<i>Bacillus</i> sp. MR81 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	88%	5,00E-175	93,93%
<i>Klebsiella aerogenes</i> strain DAS50 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	89%	0	100,00%
<i>Klebsiella aerogenes</i> strain DAS50 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	89%	0	100%
<i>Staphylococcus epidermidis</i> strain 4S02 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	92%	0	98,76%
<i>Klebsiella aerogenes</i> strain DAS50 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	89%	0	99,57%
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> strain C10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0	95,66%
<i>Moellerella wisconsensis</i> JCM 5896 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	92%	0	95,96%
<i>Providencia alcalifaciens</i> strain Sal4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	92%	2-e56	77,34%

Fonte: Próprio autor, 2019.

Esta tabela mostra a existência de microrganismos potencialmente patogênicos para a sociedade como é o caso de linhagens dos gêneros *Staphylococcus* e *Klebsiella* que podem causar transtornos patológicos sérios na população. Com isso fica evidente que os microrganismos estão dispersos nas mais diversas partes do mundo só esperando o momento de serem expostos as condições favoráveis para assim expressarem todo seu potencial patogênico, principalmente quando as pressões seletivas são impostas artificialmente no meio tornando-os resistentes aos antibióticos.

Aliciei, Gelinski e Minotto (2016) mostraram um perfil de bactérias resistentes à Ampicilina (73,92%). Enquanto Da Silva et al. (2018) revelaram em seu antibiograma que as bactérias obtidas a partir de amostras do solo da caatinga foram consideradas resistentes a pelo menos quatro antibióticos testados pelo grupo (ampicilina, cloranfenicol, gentamicina, neomicina, estreptomina, eritromicina, rifampicina, vancomicina e ácido nalidíxico), sendo o gênero *Bacillus* resistente a ampicilina.

Estudos de Faganello (2019) em testes de triagem para a produção de β -lactamase de espectro estendido, 30,4% das amostras apresentaram resistência à pelo menos um antibiótico. Sendo 10,7% à ceftazidima, 25% à cefotaxima, 8,9% à ceftriaxona e 23,2% ao aztreonam.

7. CONCLUSÕES

A partir dos resultados observados, conclui-se que as técnicas utilizadas se mostraram bastante eficazes na identificação metagenômica das populações microbianas presentes nas amostras coletadas, bem como na análise da resistência aos antimicrobianos.

Além disso, observaram-se fatores preocupantes no âmbito comunitário, uma vez que foram encontradas diversos gêneros e variadas espécies de bactérias, sendo estas patogênicas e não patogênicas de um modo geral resistentes aos meios contendo antibióticos e algumas como *Moellerella wisconsensis*, por exemplo, normalmente se encontram relacionadas a presença de fezes, além de água e alimentos contaminados.

Também ficou evidente a similaridade dos solos nos pontos P1 e P3, diferindo do P2 provavelmente devido à ação antrópica e isto já indica que a sociedade afeta sobremaneira os microrganismos presentes no solo.

Adicionalmente é possível imaginar que tendo em vista que no município de Cuité-PB existe um alto consumo de água obtida através de poços perfurados no solo e alimentos cultivados na região, podem existir dúvidas com relação à segurança dos consumidores, gerando grande preocupação quanto ao estado e manutenção da saúde desses indivíduos, mas isso requer estudos complementares.

Nesse sentido, também se faz importante a preocupação com relação ao uso indiscriminado de antibióticos pela sociedade, uma vez que é clara a presença de microrganismos resistentes no meio ambiente contra os mais diversos medicamentos dessa classe farmacológica.

8. PERSPECTIVAS

Dentre as perspectivas esperadas para continuação deste trabalho estão a ampliação do conhecimento e treinamento para as mais diversas áreas como hospitais, feiras e ambientes públicos através do novo PIBIC. Além disso, também serão realizadas as análises de outras 10 amostras coletas no município de Cuité em pontos distintos, resultado sempre na continuação das produções bibliográficas envolvendo os componentes do grupo de Biotecnologia Aplicada a Saúde e Educação.

Referências

- GUIMARÃES, D. O.; Momesso, L. D. S.; Pupo, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.
- ABDALRAHMAN, L.; Stanley, A.; Wells, H.; Fakhr, M. Isolation, virulence, and antimicrobial resistance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) strains from Oklahoma retail poultry meats. **International journal of environmental research and public health**, v.12, n.6, p.6148-6161, 2015.
- ALCHIERI, M. S.; Gelinski, J. M. L. N.; Minotto, E. Caracterização bioquímica de isolados bacterianos de solo de cultivo de videira (*Vitis* sp.). **Evidencia**, v. 16, n. 2, p. 101-112, 2016.
- ARUMUGAM, T.; Kumar, P. S.; Kameshwar, R.; Prapanchana, K. Screening of novel actinobacteria and characterization of the potential isolates from mangrove sediment of south coastal India. **Microbial pathogenesis**, v.107, p.225-233, 2017.
- BARANCHESHME, F. e Munir, M. Strategies to combat antibiotic resistance in the wastewater treatment plants. **Frontiers in microbiology**, v.8, p.2603, 2017.
- BECKETT, C. L.; Harbarth, S.; Huttner, Benedikt. Special considerations of antibiotic prescription in the geriatric population. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 21, n. 1, p. 3-9, 2015.
- BERDY, Janos. Bioactive microbial metabolites. **The Journal of antibiotics**, v. 58, n. 1, p. 1, 2005.
- BOADA, A.; Pons-Viqués, M.; Real, J.; Grezner, E.; Bolibar, B.; Llor, C. Previous antibiotic exposure and antibiotic resistance of commensal *Staphylococcus aureus* in Spanish primary care. **European Journal of General Practice**, v.24, n.1, p.125-130, 2018.
- BORIN, S.; Marzorati, M.; Brusetti, L.; Zilli, M.; Cherif, H.; Hassen, A; Daffonchio, D. Microbial succession in a compost-packed biofilter treating benzene-contaminated. **Air Biodegradation**, v.17, n.2, p.79-89, 2006.
- BRITO, F. A. E.; Ramos, K. A.; DA Silva, R. M.; Martins, C. M.; Martins, S. C. S. Actinobacteria from rizospheric soil in the caatinga biome. **Enciclopédia Biosfera**, v. 11, p. 1992-2004, 2015.
- BUENO, P. A. A.; De Oliveira, V. M. T.; Gualdi, B. L.; Silveira, P. H. N.; Pereira, R. G.; Freitas, C. E. S.; Schwarcz, K. D. Indicadores microbiológicos de qualidade do solo em recuperação de um sistema agroflorestral. **Acta Brasiliensis**, v. 2, n. 2, p. 40-44, 2018.
- BULL, A. T; Stach, J. E.M. Marine actinobacteria: new opportunities for natural product search and discovery. **Trends in microbiology**, v.15, n.11, p.491-499, 2007.
- CALDAS, F.; Mesquita, D.; Costa, T.; Laranjeiras, D.; Garda, A. Herpetofauna of protected areas in the Caatinga V: Seridó ecological station (Rio Grande do Norte, Brazil). **Check list**, v. 12, p. 1, 2016.

CARATTOLI, A.; Villa, L.; Feudi, C.; Curcio, L.; Orsini, S.; Luppi, A.; Pezzotti, G.; Magistrali, C. F. Nova resistência à colistina mediada por plasmídeos *mcr-4 g* ene em *Salmonella* e *Escherichia coli*, Itália 2013, Espanha e Bélgica, 2015 a 2016. **Euro Surveill**, 2017.

CLEMENS, K.; Michaela. L.; Rita, B.; Bettina, F.; Günther, K.; Daniela, T.; Astrid, L.; Andrea J. G.; Andreas, H. F.; Alexander K.; Gernot, Z. Padrões de Resistência aos Antibióticos de *Pseudomonas* spp. Isolado do rio Danúbio. **Microbiol front**, 2016.

COUTINHO, H. D. M.; Lima, T. C. S.; Grisi, B. M.; Pessoa, H. L. F. Ocorrência de palmídios em bactérias resistentes a metais pesados, isoladas de solo contaminado pelas atividades da agroindústria canavieira no estado da Paraíba. **Revista Nordestina de Biologia**, v.13, p.87-104, 1999.

DA COSTA, Anderson Luiz Pena; Junior, A. C. S. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 7, n. 2, p. 45-57, maio/ago. 2017.

DA SILVA, A. F.; De Souza, A. P.; Fernandes J. P. I. Bactérias resistentes à antibióticos em nódulos de *Vigna* spp. cultivados em solos de Caatinga. **Embrapa Semiárido-Artigo em anais de congresso**, 2018.

DELCARU, O. P.; Alexandru, I.; Popescu, N.; Măruțescu, L.; Bleotu, C. & Lazăr, V. Antibiotic resistance and virulence phenotypes of recent bacterial strains isolated from urinary tract infections in elderly patients with prostatic disease. **Pathogens**, v. 6, n. 2, p. 22, 2017.

DIAS, A. B. A. Filogenia molecular e cultivo de Archaea de solos de Cerrado sensu strictoc. 2015.

EFTEKHAR, F.; Nouri, P. Correlation of RAPD-PCR profiles with ESBL production in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* in Tehran. **Journal of clinical and diagnostic research: JCDR**, v.9, n.1, p.DC01, 2015.

FAGANELLO, C. Caracterização do Potencial Patogênico de *Salmonella enterica* Isoladas de Frango. 2019.

FAORO, Helisson. Prospecção metagenômica de biocatalisadores da microbiota de solos da Floresta Atlântica paranaense. 2010.

FARIVAR, A. S.; Nowroozi, J.; Eslami, G.; Sabokbar, A. RAPD PCR Profile, antibiotic resistance, prevalence of *armA* gene, and detection of KPC enzyme in *Klebsiella pneumoniae* isolates. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, 2018.

FRACAROLLI, I. F. L.; De Oliveira, S. A.; Marziale, M. H. P. Colonização bacteriana e resistência antimicrobiana em trabalhadores. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 30, n. 6, p. 651-657, 2017.

GHAI, I.; Ghai, Shashank. Understanding antibiotic resistance via outer membrane permeability. **Infection and drug resistance**, v.11, p.523, 2018.

GRIFFITHS, R. I.; Whiteley, A. S.; O'Donnell, A. G.; Bailey, M. J. Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA-and rRNA-based microbial community composition. **Applied and Environment. Microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5488-5491, 2000.

- GUENNADI, S.; Joseleau-Petit, D.; D'Ari, R. Fisiologia de *Escherichia coli* em Caldo Luria-Bertani. **Journal of Bacteriology**, 2007
- GUIMARAES, D.; Momesso, L. S.; Pupo, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010 .
- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic acids symposium series**, p. 95-98, 1999.
- HERNÁNDEZ-LEÓN, R., Velázquez-Sepúlveda, I., Orozco-Mosqueda, M. C., & Santoyo, G. Metagenômica de suelos: grandes desafíos y nuevas oportunidades biotecnológicas. **Phyton (Buenos Aires)**, v. 79, n. 2, p. 133-139, 2010.
- HOU, X.H.; Canção, X.Y.; Zhang, S.Y.; Zhang, J.Q. Molecular characterization of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.46, n.3, p. 59-768, 2015.
- HOVER, B. M.; Kim, S. H.; Katz, M.; Charlop-Powers, Z.; Owen, J. G.; Ternei, M. A.; Perlin, D. S. Culture-independent Discovery of the malacidins as calcium-dependent antibiotics with activity against multidrug-resistant Gram-positive pathogens. **Nature microbiology**, v.3, n.4, p.415, 2018.
- HULTMAN, J.; Tamminen, M.; Pärnänen, K.; Cairns, J.; Karkman, A.; Virta, M. Host range of antibiotic resistance genes in wastewater treatment plant influent and effluent. **FEMS microbiology ecology**, v.94, n.4, p.fiy038, 2018.
- JAKA, H.; Rhee, J. A.; Östlundh, L.; Smart, L.; Peck, R.; Mueller, A.; Mshana, S. E. The magnitude of antibiotic resistance to *Helicobacter pylori* in Africa and identified mutations which confer resistance to antibiotics: systematic review and meta-analysis. **BMC infectious diseases**, v.18, n.1, p.193, 2018.
- JÚNIOR, L.; Cabral, L.; Delforno, T.P.; De Souza, S.T.P.; Oliveira, V.M. Uso da terra e efeitos sazonais no microbioma do solo de uma floresta seca brasileira. **Fronteiras em microbiologia**, v. 10, p. 648, 2019.
- KARA R.; Kadner R. J. Bactérias em indústria. **Encyclopedia Britannica**, 2019.
- KAVAMURA, V. N.; Taketani, R. G.; Lançoni, M. D.; Andreote, F. D.; Mendes, R.; De Melo, I. S. Water regime influences bulk soil and rhizosphere of *Cereus jamaicaru* bacterial communities in the Brazilian Caatinga biome. **PloS One**, v. 8, n. 9, p. e73606, 2013.
- KIRK, J. L.; Beaudette, L. A.; Hart, M.; Moutoglis, P.; Klironomos, J. N.; Lee, H.; Trevors, J. T. Methods of studying soil microbial diversity. **Journal of Microbiology Methods**. v.58, p.169-188, 2004.
- KÜMMERER, K. Antibióticos no ambiente aquático - uma revisão - parte I. **Chemosphere**, v. 75, n. 4, p. 417-434, 2009.
- LIMA, J. V. L.; Pinheiro, M. S.; Fiúza, L. M. C. G.; Martins, S. C. S.; Martins, C. M. Populações microbianas cultiváveis do solo e serrapilheira de uma unidade de conservação no semiárido brasileiro. **Enciclopédia Biosfera**, v.10, p. 2300-2316, 2014.

- LIU, T.; Jia, T.; Chen, J.; Liu, X.; Zhao, M.; Liu, P. Analysis of microbial diversity in shenqu with different fermentation times by PCR-DGGE. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.48, n.2, p.246-250, 2017.
- LIU, Y; Feng, Y; Cheng, D; Xue, J; Wakelin, S; LI, Z. Dynamics of bacterial composition and the fate of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements during the co-composting with gentamicin fermentation residue and lovastatin fermentation residue. **Bioresource Technology**, 2018.
- LOOD, R.; Ertürk, G.; Mattiasson, B. Revisiting antibiotic resistance spreading in wastewater treatment plants–bacteriophages as a much neglected potential transmission vehicle. **Frontiers in microbiology**, v.8, 2017.
- LOPES, C. A. M. A importância crescente das toxinas bacterianas. **Journal Venomous Animals and Toxins**, Botucatu, v. 3, n. 1, p. 4-5, 1997.
- MACGREGOR, B. J.; Amann, R. Single-stranded conformational polymorphism for separation of mixed rRNAs (rRNA-SSCP), a new method for profiling microbial communities. **Systematic and Applied Microbiology**, v.3, 2006.
- MARTINI, Viviane Paula. Caracterização molecular e bioquímica de novas lipases obtidas por prospecção metagenômica com aplicação em biocatálise. 2012.
- MEDEIROS, E. J. T.; Cavalcante, F. G.; Silva, M.; Silveira, S. C.; Martins, C. M. Diversidade cultura de Cepas de actinobactérias do semiárido. **Enciclopedia Biosfera**, v. 15, n. 27, 2018.
- MINOTTO, E. Enzyme characterization of endophytic actinobacteria isolated from tomato plants. **Journal of Advanced Scientific Research**, v. 5, n. 2, 2014.
- MIYAZAKI, K.; Kitahara, K. Functional metagenomic approach to identify overlooked antibiotic resistance mutations in bacterial rRNA. **Scientific reports**, v.8, n.1, p.5179, 2018.
- MOTA, R. A.; Da Silva, K. P. C.; De Freitas, M. F. L.; Porto, W. J. N.; Da Silva, L. B. G. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 42, n. 6, p. 465-470, 2005.
- MUNITA, J. M.; Arias, C. A. Mechanisms of antibiotic resistance. **Microbiology spectrum**, v. 4, n. 2, 2016.
- MUYZER, G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, v.2, p.317–322, 1999.
- NAKATSU, C. H. C. H.; Torsvik, V.; Ovreas, L. Soil community analysis using DGGE of 16S rRNA polymerase chain reaction products. **Soil Science Society of America Journal**, v.64, p.1382-1388, 2000.
- NESME, J.; Simonet, P. The soil resistome: a critical review on antibiotic resistance origins, ecology and dissemination potential in telluric bacteria. **Environmental microbiology**, v.17, n.4, p.913-930, 2015.
- NEUFELD, J. D. Composition of microbial communities in hexachlorocyclohexane (HCH) contaminated soils from Spain revealed with a habitat-specific microarray. **Environ Microbiol.** v.8. n.1, p.126-140, 2006.

- ORWIN, K. H.; Dickie, I.A.; Wood, J.R.; Holdaway, R. A comparison of the ability of PLFA and 16S rRNA gene metabarcoding to resolve soil community change and predict ecosystem functions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 117, p. 27-35, 2018.
- PALMER, M. Genome-based characterization of biological processes that differentiate closely related bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v.9, n.113, 2018.
- PEREIRA, A. L.; Pita, J. R. Alexander Fleming (1881-1955): da descoberta da penicilina (1928) ao prêmio Nobel (1945). **História: revista da Faculdade de Letras da Universidade do Porto**, v. 6, 2018.
- POLYMENAKOU, P. N. Links between geographic location, environmental factors, and microbial community composition in sediments of the Eastern Mediterranean Sea. **Microbial Ecology**, v.49, n.3, p.367-78, 2005.
- POPOWSKA, M.; Rzczycka, M.A; Miernik, A.; Krawczyk-Balska, A.; Walsh, F.; Duffy, B. Influence of soil use on prevalence of tetracycline, streptomycin, and erythromycin resistance and associated resistance genes. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.56, n.3, p.1434-1443, 2012.
- QUEIROZ, N. S. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto & Contexto Enfermagem**, v. 13, n. Esp, 2004.
- RAFRAF, I. D.; Lekunberri, I.; Sánchez-Melsió, A.; Aouni, M.; Borrego, C. M.; Balcázar, J. L. Abundance of antibiotic resistance genes in five municipal wastewater treatment plants in the Monastir Governorate, Tunisia. **Environmental pollution**, v.219, p.353-358, 2016.
- RIBEIRO, K. Mudança no uso do solo e emissões de gases de efeito estufa (GEE) em diferentes coberturas vegetais na caatinga brasileira. 2017.
- ROUSHAM, E.; Unicomb, L.; Wood, P.; Smith, M.; Asaduzzaman, Muhammad; Islam, M. A. Spatial and temporal variation in the community prevalence of antibiotic resistance in Bangladesh: na integrated surveillance study protocol. **BMJ open**, v.8, n.4, 2018.
- SANTOS, I. L. V. L.; Silva, C. R. C.; Maia, M. M. D.; Medeiros, S. B.; Lima, L. F. A.; Blaha, C. A. G. Estabilidade Microbiológica Avaliada por Cultivo e PCR-DGGE em Solo de Caatinga Contaminado por Petróleo. In: **XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos**, Natal, RN, 2009.
- SARMAH, Ajit K.; Meyer, M. T.; Boxall, A. Uma perspectiva global sobre o uso, vendas, vias de exposição, ocorrência, destino e efeitos dos antibióticos veterinários (VAs) no meio ambiente. **Chemosphere**, v. 65, n. 5, p. 725-759, 2006.
- SELVARAJ, G. K.; Tian, Z.; Zhang, H.; Jayaraman, M.; Yang, M.; Zhang, Y. Culture-based study on the development of antibiotic resistance in a biological wastewater system treating step wise increasing doses of streptomycin. **AMB Express**, v.8, n.1, p.12, 2018.
- SILVA, V. M. A.; Lima, J. V. L; Gondim, P. M; Martins, C. M; Suzana, C. S. M. Effect of irrigation and type of cultivation on richness and diversity of chromogenic actinobacteria of soil from Ceará semiarid region. **Enciclopédia Biosfera**, v. 11, p. 2965-2979, 2015.
- SILVEIRA, É. L. Identificação de comunidades bacterianas de solo por sequenciamento do gene 16S rRNA. 2004.

- SIMNER, P. J.; Antar, A. A.; Hao, S.; Gurtowski, J.; Tamma, P. D.; Rock, C.; Timp, W. Antibiotic pressure on the acquisition and loss of antibiotic resistance genes in *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2018.
- SINGH, B.; Kaur, J.; Singh, K. Biodegradation of malathion by *Brevibacillus* sp. strain KB2 and *Bacillus cereus* strain PU. **World J Microbiol Biotechnol**. 2012
- Tello, A.; Austin, B.; Telfer, T.C. Pressão seletiva da poluição por antibióticos sobre bactérias de importância para a saúde pública. **Perspectivas de saúde ambiental**, 2012.
- TIMOTHY, J. K.; Grant Mills, J. S. P.; Amy Dumigan, C. G. F.; José L. I.; Rebec, I., Laura H.; José A. B. Um mecanismo de resistência aos antibióticos *Klebsiella pneumoniae* que subjuga as defesas dos hospedeiros e promove virulência. **EMBO Molecular Medicine**. 9, 430-447, 2017.
- UZ ZAMAN, T.; Alrodayyan, M.; Albladi, M.; Aldrees, M.; Siddique, M. I.; Aljohani, S.; Balkhy, H. H. Clonal diversity and genetic profiling of antibiotic resistance among multidrug/carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from a tertiary care hospital in Saudi Arabia. **BMC infectious diseases**, v.18, n.1, p.205, 2018.
- VALÁSKOVÁ, V.; Baldrian, P. Denaturing gradient gel electrophoresis as a fingerprinting method for the analysis of soil microbial communities. **Plant Soil Environ**, v.55, n.10, p.413-423, 2009.
- VENTOSA, A.; De La Haba, R. R.; Sánchez-Porro, C.; Papke, R. T. Microbial diversity of hypersaline environments: a metagenomic approach. **Current opinion in microbiology**, v.25, p.80-87, 2015.
- VERA-GARGALLO, B.; Ventosa, A. Metagenomic insights into the phylogenetic and metabolic diversity of the prokaryotic community dwelling in hypersaline soils from the odiel saltmarshes (SW Spain). **Genes**, v.9, n.3, p.152, 2018.
- VIDEIRA, S. S.; Cunha, C. D. Monitoramento molecular da comunidade bacteriana durante a biorremediação de solos multi-contaminados. 2017.
- VITALE, M.; Gaglio, S.; Galluzzo, P.; Cascone, G.; Piraino, C.; Di Marco Lo Presti, V.; Alduina, R. Antibiotic resistance profiling, analysis of virulence aspects and molecular genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated in Sicily, Italy. **Food borne pathogen sand disease**, v.15, n.3, p.177-185, 2018.
- WANG, X.; Gu, J.; Gao, H.; Qian, X.; Li, H. Abundances of clinically relevant antibiotic resistance genes and bacterial community diversity in the weihe river, China. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v15, 2018.
- WU, J.; Huang, Y.; Rao, D.; Zhang, Y.; Yang, K. Evidences for environmental dissemination of antibiotic resistance mediated by wild birds. **Frontiers in microbiology**, v.9, p.745, 2018.
- XIE, R.; Zhang, X.D.; Zhao, Q.; Peng, B.; Zheng, J. Analysis of global prevalence of antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii* infections disclosed a faster increase in OECD countries. **Emerging microbes & infections**, v.7, n.1, p.31, 2018.
- XIE, R.; Zhang, X.D.; Zhao, Q.; Peng, B.; Zheng, J. Analysis of global prevalence of antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii* infections disclosed a faster increase in OECD countries. **Emerging microbes & infections**, v.7, n.1, p.31, 2018.

YANG, J.; Ye, L.; Wang, W.; Luo, Y.; Zhang, Y.; Han, L. Diverse prevalence of 16S rRNA methylase genes *armA* and *rmtB* amongst clinical multidrug-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates. **International journal of antimicrobial agents**, v.38, n.4, p.348-351, 2011.

ZOTHANPUIA, A. K. P. Bioprospection of actinobacteria derived from freshwater sediments for their potential to produce antimicrobial compounds. **Microbial Cell Factores**, v.17, n.68, 2018.