

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

ANDREA LAFISCA

ASPECTOS AMBIENTAIS E SUA RELEVÂNCIA NA CIRCULAÇÃO E DISPERSÃO DE  
ENTEROBACTERIACEAE E VIBRIONACEAE PORTADORAS DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA  
EM MOLUSCOS BIVALVES NO RIO DE JANEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES

2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

ANDREA LAFISCA

ASPECTOS AMBIENTAIS E SUA RELEVÂNCIA NA CIRCULAÇÃO E DISPERSÃO DE  
ENTEROBACTERIACEAE E VIBRIONACEAE PORTADORAS DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA  
EM MOLUSCOS BIVALVES NO RIO DE JANEIRO

Tese Apresentada ao Centro de Ciências e  
Tecnologias Agropecuárias da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro  
como requisito parcial para a obtenção do grau  
de Doutor em Ciências animais na área de  
concentração de Sanidade Animal.

ORIENTADOR: Dr. Prof. OLNEY VIEIRA DA MOTTA

CAMPOS DOS GOYTACAZES

2019

VERSO DA FOLHA DE ROSTRO

FICHA CATALOGRÁFICA

ANDREA LAFISCA

ASPECTOS AMBIENTAIS E SUA RELEVÂNCIA NA CIRCULAÇÃO E DISPERSÃO DE  
ENTEROBACTERIACEAE E VIBRIONACEAE PORTADORAS DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA  
EM MOLUSCOS BIVALVES NO RIO DE JANEIRO

Tese Apresentada ao Centro de Ciências e  
Tecnologias agropecuárias da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro  
como requisito parcial para a obtenção do grau  
de Doutor em Ciências animais na área de  
concentração de Saúde Animal.

Aprovada em 13 de maio de 2019

BANCA EXAMINADORA

Professor Olney Vieira da Motta (Orientador) UENF

---

Doutora Dalia dos Prazeres Rodrigues

---

Professora Marina Satika Suzuki

---

Professor Carlos Eurico Pires Ferreira Tracassos

---

## DEDICATÓRIA

Dedico esta tese aos meus filhos: Sofia Margherita, Sara Maria e Lorenzo:

*Meus pequenos, infinitos, Amores, esta aventura do papai, que o levou tão longe de casa por tanto tempo está chegando ao fim. Este foi um sonho que, com cabeça dura, quis realizar. De tudo o que passou nestes anos queria que lembrassem poucas coisas: a primeira é que eu amo vocês, mais do que qualquer outra coisa ao mundo, sempre amei, e sempre vou amar. A segunda, é que quando vocês tiverem um sonho, algo que para vocês é importante (não importa o quê), corram atrás para alcançá-lo. Talvez, depois descubram que... não era tudo o que esperavam..., mas mesmo assim, chegaram lá e conseguiram. Eu, o vosso Papai (papà), sempre estarei ao vosso lado, torcendo, vibrando e acreditando em vocês.*

## AGRADECIMENTOS

O primeiro agradecimento é, sem dúvida, para minha esposa, Karine, que durante as grandes dificuldades causadas pela minha ausência e distância, nunca deixou de me amar e de me apoiar, mesmo que, às vezes, isso fosse difícil de entender. Desculpe por ter deixado você tanto tempo sozinha;

Para toda a minha família, especialmente os meus filhos Sofia, Sara e Lorenzo, e minha sogra, Vania, por ter me esperado todo este tempo e ter aceitado as minhas ausências e estresses;

Ao meu orientador, Professor Olney, pelo apoio constante e incondicional durante estes anos;

Aos membros da banca de avaliação, Prof. Olney, Dr<sup>a</sup> Dalia dos Prazeres Rodrigues, Prof. Marina Satika Suzuki e Prof. Carlos Eurico Pires Ferreira Tracassos, pelas avaliações que me permitiram corrigir os erros realizados e aprimorar a interpretação dos dados obtidos;

À Professora Raquel Bonelli da UFRJ, pela análise dos dados das PCR e sequenciamentos, e as orientações sobre a interpretação deles;

Ao prof. Paulo Pedrosa Andrade do Laboratório de Ciências Ambientais LCA da UENF, por nos permitir o uso do medidor multi-paramétrico de qualidade da água HORIBA U-52;

Professor André de Oliveira Carvalho, Professora Aline Introne e Dr<sup>a</sup> Júlia, pelo apoio durante todas as dúvidas referentes às PCR que não davam certo...;

Ao Dr. Alan Branco, por me ensinar a fazer as PCR;

Ao Dr. Juliano Silva Lima, pelo apoio na execução das análises estatísticas e a amizade;

À Professora Lilian, à Professora Cláudia, à Danielle e a todos do laboratório de genética veterinária da UFMG, pelo apoio econômico, material, pessoal e a amizade durante os procedimentos de sequenciamento;

Às Técnicas do laboratório de microbiologia e micologia veterinária: Solange e Lourdes, pela ajuda na realização das análises microbiológicas;

Ao CNPq pela bolsa de estudo que me permitiu realizar esta pesquisa e à CAPES pelo apoio através do código de financiamento 001 (conforme Port. 206 de 4/9/2018);

Aos meus dois “anjinhos”, Isabella e Kethelyn, meninas fantásticas que me ajudaram durante a maior parte da minha estadia no laboratório, trabalhando com intensidade, alegria e profissionalismo ímpares. Obrigado!

Aos produtores de mariscos de Arraial do Cabo e Búzios: Antônio Carlos “Pingo” Pereira e Manuel Azevedo dos Santos, que me forneceram a “matéria prima” para o estudo;

Ao pessoal da FIPERJ de Cabo Frio pelo apoio no início da pesquisa, principalmente ao Guilherme e ao Paulo Albuquerque;

Ao Doutor Antônio do IEAPM, pelas informações sobre a geografia e uso do solo na região dos Lagos,  
pela sua grande amizade e as belas conversas.

*“O sucesso não é final, a derrota não é fatal. É a coragem de continuar que conta”*

Winston Churchill

## RESUMO

O objetivo desta pesquisa foi estudar as características microbiológicas de moluscos bivalves criados em duas áreas altamente turísticas da Região dos Lagos do estado do Rio de Janeiro: Arraial do Cabo e Armação dos Búzios. Durante 7 meses, entre outubro 2016 e abril 2017 foram realizadas 13 campanhas de coleta de moluscos bivalves e de amostras de água de esgoto das áreas de estudo e de dados ambientais, que nos permitiram associar as características microbiológicas reveladas às características do ambiente de cultivo e do seu entorno. Os moluscos bivalves prelevados foram diluídos conforme a metodologia UNI-EN-ISO 6887-3:2003. A enumeração de *Escherichia coli* β-galactosidase positiva foi realizada conforme o protocolo UNI-EN-ISO 16649-3, técnica equivalente ao protocolo UNI-EN-ISO 16649-2 preconizada pelo Governo Brasileiro. A partir das amostras de moluscos bivalves e de água, foi realizada a pesquisa de Enterobacteriaceae através de enriquecimento e plaqueamento em meio ágar MacConkey; para *Vibrio* spp. por enriquecimento seletivo e plaqueamento em meio ágar TCBS, para *Salmonella* spp. pelo uso do enriquecimento seletivo em caldo Rappaport-Vassiliadis e plaqueamento em ágar HEA. Foi realizada a análise de susceptibilidade aos antibióticos AMP, CFL, CFO, CIP, CLO, SUT, GEN, TET, TOB, FLF, e NOR baseado na técnica de Kirby-Bauer em 294 bactérias isoladas. Os testes foram realizados em uma amostra das cepas bacterianas isoladas nas primeiras 10 coletas e em todas as cepas bacterianas isoladas nas coletas 11, 12 e 13, para estudar os efeitos de eventos chuvosos sobre a microbiota dos moluscos bivalves. Foi realizada a pesquisa de genes de resistência a antibióticos: GYR-A, GYR-B, INTEGRON-INTEGRASE, AAC (6') Ib, QNR-A, B, C, D e S, e BLA-CMY. Os produtos de PCR obtidos foram sequenciados. Os resultados evidenciaram um ambiente com poluição principalmente de origem humana e urbana, a associação entre clima chuvoso e elevadas concentrações de *Escherichia coli* β-galactosidase positivas, a diferença altamente significativa entre o comportamento das Enterobacteriaceae e das Vibrionaceae isoladas ( $p=0,0001$ ), uma elevada prevalência de resistência a antibióticos de uso humano e a baixa correspondência entre resistência fenotípica e presença de genes específicos. Este elemento sugere que as bactérias isoladas possuem outros sistemas de resistência a antibióticos, além dos mecanismos específicos estudados. O sequenciamento evidenciou a diversidade entre a sequência de genes de integrase isolados em bactérias provenientes do mesmo lugar e, ao

contrário, a similaridade entre sequências isoladas de moluscos oriundos das duas áreas pesquisadas.

**PALAVRAS-CHAVE:** Segurança alimentar, Análise ambiental, *Escherichia coli*, Resistência a antibióticos, Biologia molecular

## ABSTRACT

This research aimed to assess the microbiological features of species of shellfish bred in two highly touristic areas in the “Região dos Lagos” in the State of Rio de Janeiro (South-eastern Brazil): Arraial dos Cabos and Armação dos Búzios. During seven months, between October 2016, and April 2017, 13 campaigns were performed to collect samples of shellfish, wastewaters, and environmental information from the study areas. These data aimed to associate the microbiological features of the shellfish samples, and the characteristics of the surrounding environment. Shellfish samples were prepared and diluted according to the protocol UNI-EN-ISO 6887-3:2003.  $\beta$ -galactosidase positive *Escherichia coli* were counted according to the protocol UNI-EN-ISO 16649-3, correspondent to the protocol UNI-EN-ISO 16649-2 preconized by the Brazilian Government. The search for Enterobacteriaceae was performed through enrichment and plating in MacConkey agar plates. *Vibrio* spp. was researched by selective enrichment in 3% NaCl Alkaline Peptonated water and plating in TCBS Agar. *Salmonella* was researched by selective enrichment in Rappaport-Vassiliadis broth and plating in HEA Agar. The analysis to the susceptibility to antibiotics was performed on 294 samples of bacteria among those that had been isolated using the antibiotics AMP, CFL, CFO, CIP, CLO, SUT, GEN, TET, TOB, FLF, and NOR according to the standard Kirby-Bauer protocol. The antibiotic resistance tests were performed in a sample of the strains isolated in the first ten sampling campaigns and in all the strains isolated during the sampling campaigns 11, 12, and 13, in order to assess the effects of raining days on shellfish microbiota. The genetic research of the genes of resistance to antibiotics GYR-A, GYR-B, INTEGRON-INTEGRASE, AAC(6')Ib, QNR-A, B, C, D and S, and BLA-CMY was performed. PCR products were sequenced. The results highlighted the main antibiotic pollution was associated with human antibiotics and urban environment. The results also pointed out the association between rainy weather and high  $\beta$ -galactosidase positive *Escherichia coli*, the significative difference between the behavior of Enterobacteria, and Vibrionaceae ( $p=0.0001$ ), a high prevalence of resistance to antibiotics of human use, and the low correspondence between phenotypic resistance, and the presence of specific genes. This last element suggests the isolated bacteria may have other methods of resistance to antibiotics besides the specific mechanisms that have been studied more in depth. Sequencing highlighted the diversity among integrase genes isolated from

bacteria from the same place, and, on the contrary, the similarity between sequences derived from bacteria isolated in shellfish from the two different studied areas.

**KEYWORDS:** Food safety, environmental analysis, *Escherichia coli*, Resistance to antibiotics, Molecular Biology

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- A: Fazenda marinha de Arraial do Cabo (22°58'3.2" S; 42°0'25.2" W)
- ABR: Resistência a antibióticos
- AMC: Amoxicilina e ácido Clavulânico
- AMP: Ampicilina
- B: Fazenda marinha de Armação dos Búzios, Praia Rasa (22°44'19.7" S; 41°56'52.1" W)
- CFL: Cefalotina
- CFO: Cefoxitina
- CIP: Ciprofloxacina
- CLO: Cloranfenicol
- *E. coli*: *Escherichia coli* β-galactosidase positivas
- ETE: Estação de tratamento de esgoto
- FLF: Florfenicol
- GEN: Gentamicina
- IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- NOR: Norfloxacina
- SUT: Cotrimoxazol
- TCBS: meio Trypticase, Citrate, Bile, Saccharose específico para isolamento de *Vibrio* spp.
- Thg: transferência horizontal de genes
- TET: Tetraciclina
- TOB: Tobramicina
- TSI: meio Triple Sugar Iron Agar diferencial para a avaliação do metabolismo de carboidratos e proteínas
- WGS 84: World Geodetic System 84: Sistema padrão internacional de definição das coordenadas geográficas (<https://gisgeography.com/wgs84-world-geodetic-system/>)

## SUMÁRIO

<b>DEDICATÓRIA</b> .....	<b>5</b>
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>6</b>
<b>EPÍGRAFE</b> .....	Erro! Indicador não definido.
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>11</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	<b>13</b>
<b>SUMÁRIO</b> .....	Erro! Indicador não definido.
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
1.1 DELIMITAÇÃO DO TEMA DO TRABALHO .....	16
1.2 OBJETIVOS DA PESQUISA.....	18
1.2.1 OBJETIVO GERAL:.....	18
1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	18
<b>2 DESENVOLVIMENTO</b> .....	<b>20</b>
2.1 REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1.1 BIOLOGIA E AQUICULTURA DOS MOLUSCOS BIVALVES .....	20
2.1.2 A ECOLOGIA DA RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS .....	24
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
2.2.1 LOCAL DE ESTUDO E ANÁLISE AMBIENTAL .....	32
2.2.2 COLETA E TRANSPORTE DAS AMOSTRAS .....	34
2.2.3 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS .....	35
2.2.4 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS E IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS .....	37
2.2.5 BIOLOGIA MOLECULAR .....	38
2.2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS .....	44
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
2.3.1 ANÁLISE DO AMBIENTE E DO USO DO SOLO DA BACIA HIDROGRÁFICA DA REGIÃO DOS LAGOS .....	46
2.3.2 ANÁLISE AMBIENTAL DA REGIÃO PRÓXIMA AO PONTO DE COLETA DE ARRAIAL DO CABO (A).....	48

2.3.3 ANÁLISE AMBIENTAL DA REGIÃO PRÓXIMA AO PONTO DE COLETA DE ARMAÇÃO DOS BÚZIOS (B).....	51
2.3.4 AMOSTRAS COLETADAS.....	59
2.3.5 QUANTIFICAÇÃO DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> β-GLUCURONIDASE-POSITIVOS .....	59
2.3.6 PERFIL DE RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS .....	63
2.3.7 RELAÇÃO ENTRE OS PERFIS FENOTÍPICOS DE RESISTÊNCIA E AS VARIÁVEIS AMBIENTAIS ..	72
2.3.8 BIOLOGIA MOLECULAR .....	77
<b>3 CONCLUSÃO .....</b>	<b>88</b>
<b>4 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>91</b>
<b>Anexo 1: Autorização para atividades com finalidade científica .....</b>	<b>108</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 DELIMITAÇÃO DO TEMA DO TRABALHO

Os moluscos bivalves estão entre os animais de interesse zootécnicos mais simples que existem cuja criação é desenvolvida no mundo há mais tempo. A União Europeia representa uma grande produtora e importadora de moluscos bivalves, principalmente na Espanha, com a produção de “vongoli” (*Ruditapes semidecussatus*), na França com as ostras (*Ostrea edulis*) e outras espécies, e na Itália com a produção de várias espécies exportadas na Europa inteira. No Brasil, a criação destes animais se desenvolveu a partir da década de 1980 no estado de Santa Catarina, que permanece como o maior produtor deste tipo de animais (SUPLICY et al., 2015). Ao longo dos anos, a produção foi se expandindo, sendo realizada atualmente na maioria dos estados da faixa litorânea do país.

Os moluscos bivalves são invertebrados filtradores, que através de suas brânquias seguram material orgânico microscópico em suspensão e desta forma facilmente entram em contato com bactérias ou outros microrganismos potencialmente patogênicos para os consumidores (FAYER; DUBEY; LINDSAY, 2004; AUSTIN, 2010; DOS SANTOS; VIEIRA, 2013).

A segurança sanitária dos moluscos bivalves é geralmente avaliada considerando, principalmente, os riscos associados com a presença de bactérias de origem fecal, considerados como “bactérias indicadoras” da possível presença de outros patógenos de interesse sanitário (LEE; YOUNGER, 2002; CODEX ALIMENTARIUS, 2003, 2014; CEFAS, 2010). Porém, a representatividade deste tipo de bactérias para definir a qualidade higiênica dos moluscos bivalves pode ser colocada em dúvida, considerando que a cinética de retenção e liberação das bactérias indicadoras não corresponde, por exemplo, àquela de vírus, como da hepatite A e o Norovirus (OLIVEIRA et al., 2011; SOUZA SOBRAL et al., 2013; SUFFREDINI et al., 2014).

O Brasil, como membro da Organização Mundial do Comércio, se alinhou às orientações desta instituição e definiu em sua Instrução Normativa Interministerial 7/2012, que a segurança dos moluscos bivalves fosse definida a partir da avaliação da concentração de *Escherichia coli*

beta-galactosidase positivos, coerentemente com as indicações do *Codex Alimentarius* e da União Europeia (EC, 2007a; BRASIL, 2012; CODEX ALIMENTARIUS, 2014).

Porém, da existência de um “*corpus*” legislativo nacional referente à segurança de moluscos bivalves, fora do estado de Santa Catarina (GARBOSSA et al., 2014; SOUZA et al., 2014; SUPPLY et al., 2015), existe um monitoramento sistemático limitado das condições de segurança dos moluscos bivalves produzidos e comercializados. Os únicos estados que realizam monitoramento sistemático da qualidade microbiológica de moluscos bivalves são Santa Catarina, São Paulo e Sergipe. No estado do Rio de Janeiro é realizado o monitoramento da qualidade microbiológica da produção de vieiras (*Nodipecten nodosus*), e ostras do mangue (*C. brasiliensis* e *C. rhizophorae*) em Angra dos Reis, no Sul do estado. A falta de monitoramento em todas as áreas de produção expõe os consumidores a riscos consideráveis de saúde e dificulta a exportação destes produtos para outros países (SOUZA et al., 2014).

Entre os estados da Federação onde existe produção de moluscos bivalves com fiscalização limitada, está o estado do Rio de Janeiro. Este estado é de especial importância não tanto pela sua produção de moluscos bivalves, que é reduzida em comparação com o de Santa Catarina, ou São Paulo, mas sim pela sua relevância como destino turístico nacional e internacional. Neste sentido, o monitoramento da qualidade dos “mariscos” produzidos pode servir, também, como monitoramento das condições gerais de contaminação da água marinha de lugares de interesse turístico (LAFISCA, de MESQUITA, da MOTTA, 2019<sup>1</sup>).

A segurança microbiológica dos moluscos bivalves pode ser considerada não somente avaliando a presença ou ausência de determinados microrganismos patogênicos, mas também, avaliando outras características de patogenicidade consideradas relevantes do ponto de vista do consumo humano. Neste sentido, a resistência a antibióticos das bactérias isoladas dos moluscos bivalves se apresenta como um problema de grande importância e ainda pouco estudado (FERRI et al., 2015).

No estudo das características de patogenicidade e de resistência a antibióticos de bactérias isoladas de moluscos é preciso considerar, além da presença de bactérias potencialmente

---

<sup>1</sup> O artigo “**Brazilian legal framework on shellfish safety and its effects on the growth of shellfish farming and commerce**” foi publicado na revista “*Reviews in Aquaculture*” com DOI provisório: 10.1111/raq.112353.

patogênicas, a existência de um microbioma residente constituída por bactérias ambientais. A maioria destas bactérias não é patogênica, mas igualmente pode carregar aqueles genes de patogenicidade ou de resistência a antibióticos, que geralmente são associados às bactérias potencialmente patogênicas, como *Vibrio*, *E. coli*, ou *Salmonella* (TRABAL FERNÁNDEZ et al., 2014; LE ROUX; WEGNER; POLZ, 2016; MEISTERHANS et al., 2016). Especialmente as bactérias do gênero *Vibrio* devem ser destacadas. Várias espécies deste gênero são patogênicas para seres humanos (*Vibrio cholerae* é o mais conhecido, mas também *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, ou *V. alginolyticus*) (LUX; LEE; LOVE, 2014), mas outras são patogênicas para invertebrados marinhos, como *V. fluvialis* (TALL et al., 2003), *V. brasiliensis*, *V. navarrensis*, *V. neptunis* ou *V. diazotrophicus* (COSTA et al., 2015).

## 1.2 OBJETIVOS DA PESQUISA

### 1.2.1 OBJETIVO GERAL:

Estudar sobre a dinâmica da contaminação de moluscos bivalves (vieiras, mexilhões e ostras) produzidos na Região dos Lagos do estado de Rio de Janeiro por bactérias pertencentes à família das Enterobacteriaceae (considerados como bactérias “transientes”, que não fazem parte da microbiota normal dos moluscos bivalves) e das Vibrionaceae (considerados como bactérias “residentes” que pertencem ao microbioma marinho e dos moluscos bivalves), em Arraial do Cabo e Armação dos Búzios. As espécies estudadas foram *Nodipecten nodosus* (vieira), *Perna perna* (mexilhão), e *Ostrea edulis* (ostra).

### 1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Estudar o quantitativo da contaminação por *Escherichia coli* beta-galactosidase positivos nas diferentes espécies de moluscos bivalves produzidos nos locais de estudo;
- Avaliar os perfis de resistência a antibióticos das bactérias entéricas e ambientais isoladas de moluscos bivalves e de água de esgoto;
- Avaliar as correlações existentes entre parâmetros ambientais (uso do solo, correntezas marinhas e clima, entre outros) e resistência a antibióticos;

- Avaliar da dinâmica de transferência de genes de resistência a antibióticos entre bactérias entéricas e bactérias ambientais;
- Avaliar da presença de genes de resistência a antibióticos de interesse de saúde humana e pública.

## 2 DESENVOLVIMENTO

### 2.1 REVISÃO DE LITERATURA

#### 2.1.1 BIOLOGIA E AQUICULTURA DOS MOLUSCOS BIVALVES

No Brasil são criados três tipos de moluscos bivalves: o mexilhão (*Perna perna*), as vieiras (*Euvola ziczac* e *Argopecten nodosus*) e as ostras (*Ostrea edulis*, *Crassostrea rizophorae* e *C. gigas*) (RUPP; NETO; GUZENSKI, 2008; PEREIRA FIGUEREDO, 2012). Além destas espécies existem outras que possuem relevância econômica no Brasil, como os berbigões ou “vongoli” (*Anomalocardia brasiliana*) e o sururu (*Mytilella falcata* ou *M. guyanensis*). Estas últimas espécies geralmente não são criadas, mas extraídas de bancos naturais (BOEHS et al., 2010). O manual de atuação da Instrução Normativa 7/2012 elenca as espécies de interesse comercial presentes no Brasil (CGSAP/DEMOC/SEMOC/MPA, 2013):

Com o nome de “mexilhão” podem ser indicadas as espécies: *Perna perna*, *Mytilella falcata*, *M. guyanensis*, *M. edulis platensis*, *Brachiodontes solisianus* e *B. darwinianus*.

Com o nome de “ostra” podem ser indicadas as espécies: *Crassostrea gigas*, *C. rhizophorae*, *C. brasiliana* (e *Ostrea edulis*, não incluída no texto citado, mas presente no Brasil).

Com o nome de “vieira” podem ser indicadas as espécies: *Nodipecten nodosus* e *Euvola ziczac*.

Com o nome de “berbigão” indicam-se as espécies *Trachycardium muricatum* e *Anomalocardia brasiliana*.

Os bivalves são invertebrados pertencentes ao *Phylum Mollusca*, classe *Bivalvia* (NARCHI; GALVÃO-BUENO, 1997). Os bivalves são caracterizados por possuírem a concha (típica de todos os membros do *Phylum*) dividida em duas valvas separadas e conectadas entre si por uma articulação e um ligamento. A função do ligamento é de manter as valvas juntas e abertas, se contrapondo, assim, à atividade dos músculos adutores (em algumas espécies pode ser só um, como na família *Pectenidae*) que fecham as valvas para proteger o animal de

eventos adversos, como predadores ou da exposição ao ar para as espécies que vivem no espaço intertidal (NARCHI; GALVÃO-BUENO, 1997).

Os moluscos bivalves são filtradores (ROBERTSON, 2007; ESMERINI; GENNARI; PENA, 2010), que se alimentam gerando um fluxo de água dentro do corpo: a água entra na cavidade palial, passa através de um sistema de brânquias (chamadas também “ctenídios”) realizando as trocas gasosas e a retenção de partículas sólidas em suspensão na água que é, então, filtrada (NARCHI; GALVÃO-BUENO, 1997). Seguida a etapa de filtração, a água é eliminada através de um sifão exalante. Os ctenídios são cobertos com muco e possuem na sua superfície um sistema de cílios que dirige as partículas filtradas e retidas para sua borda ventral e dali, através de um sulco ciliar marginal até os palpos labiais, onde estas são triadas pelo tamanho (NARCHI; GALVÃO-BUENO, 1997). As partículas de tamanho menor são enviadas para a boca, e aquelas de tamanho maior são eliminadas do molusco na forma de “pseudofezes”. Os moluscos bivalves atuam como “microfiltradores”. O tamanho das partículas que eles conseguem reter na boca ( $0,46 \mu\text{m}$ ) é muito semelhante ao tamanho das bactérias marinhas (EVAN WARD; SHUMWAY, 2004). Os mesmos autores relatam que o tamanho das partículas filtradas não é o único elemento que facilita a ingestão. A presença de compostos glicídicos superficiais, a carga elétrica dos detritos ou sua capacidade de movimentação ativa permitem aumentar a eficiência da triagem para eliminar os compostos inorgânicos e reter os alimentos. Uma vez na boca, as partículas passam por um canal alimentar composto por um estômago circundado por uma glândula digestória (conhecida anteriormente como “hepato-pâncreas”). Sucessivamente ao estômago, se encontra uma projeção chamada saco do estilete. Esta projeção participa da digestão enzimática e mecânica do alimento, secretando um bastão gelatinoso (estilete) que em movimento rotatório reduz o tamanho das partículas alimentares ingeridas. Ao rodar o bastão do estilete estas partículas são consumidas, liberando as enzimas que participam da digestão do alimento. Depois da passagem pelo estômago e pelo saco do estilete, o alimento atravessa o intestino onde haverá a adsorção dos nutrientes. A porção de alimento não digerida será depois definitivamente eliminada com as fezes (NARCHI; GALVÃO-BUENO, 1997).

A reprodução dos moluscos bivalves marinhos é geralmente externa. Os gametas são liberados no mar e ao se unirem formam uma larva (*veliger*) nadante. Sucessivamente ao estado de *veliger* se desenvolve o estado de “*pediveliger*” quando as larvas aderem a alguma

estrutura fixa, como por exemplo uma boia, um costão rochoso ou o fundo de um navio. Este estado de *pediveliger* é extremamente importante para a criação de moluscos bivalves, porque é neste estágio que os animais podem ser coletados, separados e pode ser iniciada a criação (HICKMAN ET AL., 2013).

As espécies de bivalves de maior relevância para o mercado nacional são os mexilhões (*Perna perna*), com 15.990 toneladas produzidas em 2011, as ostras (*Ostrea edulis*, *Crassostrea rhizophorae* e *C. gigas*), com 2.538,4 toneladas produzidas em 2011 e as vieiras (*Euvola ziczac* e *Argopecten nodosus*), com 13.4 toneladas produzidas em 2011 (RUPP; NETO; GUZENSKI, 2008; PEREIRA FIGUEREDO, 2012). No Brasil, o principal produtor de moluscos bivalves é o estado de Santa Catarina, que iniciou a produção em 1987 e, atualmente, produz 19.082 toneladas de moluscos entre as quatro maiores espécies: *Perna perna*, *Crassostrea gigas*, *C. rhizophorae* e *Nodipecten nodosus* (MIOTTO, 2012; SUPPLY et al., 2015). Criações significativas de ostra do mangue (*C. brasiliensis* e *C. rhizophorae*) são, também, presentes no sul do estado de São Paulo, na região de Cananéia<sup>2</sup>, na região de Angra dos Reis no estado do Rio de Janeiro e, em forma limitada ou experimental, no Ceará, Bahia, Pernambuco, Sergipe, Espírito Santo e Paraná (LOURENÇO et al., 2006; COSTA SOBRINHO et al., 2014).

Na região Nordeste do país (principalmente no estado do Piauí) existem estudos sobre a produção de outras espécies nativas: as ostras do mangue (*C. rhizophorae*), os sururus (*Mytella* spp.) e os mariscos (*Anomalocardia brasiliiana*, *Iphigenia brasiliiana* e *Tagelus plebeius*). As ostras do mangue são criadas “à francesa” em canais de drenagem de criações de camarões, colocando os moluscos em cima de mesas fixas. Sururus e mariscos não são criados, são coletados de regiões de águas rasas durante a maré baixa (ALVES LEGAT et al., 2008).

As três espécies de maior interesse comercial são criadas de forma semelhante, em cultivos suspensos. Existem três tipos de cultivos suspensos que se aplicam em áreas com características ambientais diferentes no Brasil: o sistema suspenso-fixo de tipo varal e os sistemas suspensos flutuantes: espinheis (*long-lines*) e balsas.

O sistema suspenso fixo de tipo varal é utilizado em regiões de baixa profundidade e mar calmo. São utilizadas estruturas feitas de estacas de bambu fincadas no fundo arenoso e de outras

---

<sup>2</sup> <http://www.pesca.sp.gov.br/reltec2.htm>

fixadas paralelamente à superfície da água e que servem de suporte para colocar as lanternas onde são colocados os moluscos bivalves.

Os sistemas suspensos flutuantes são utilizados, geralmente, em locais com profundidades maiores de três metros. Os sistemas flutuantes são de dois tipos: os **espinheis** que são cordas amarradas a boias flutuantes às quais se amarram as lanternas para a produção de vieiras e ostras ou as “meias” para a produção de mexilhões (daqui o nome inglês de “*long line*”, ou seja, corda comprida) e as **balsas** que são plataformas flutuantes de madeira, que além de servir de suporte para lanternas e meias, também funcionam como estruturas de apoio para a manipulação e triagem dos moluscos durante a criação (ALVES LEGAT et al., 2008; OSTRENSKY; BORGHETTI; SOTO, 2008; GALLON; NASCIMENTO; PFITSCHER, 2011; AQUINI; MAGALH, 2013).

A origem das “sementes” de moluscos bivalves utilizadas nas criações é diferente: as espécies nativas (*P. perna*, *C. rhizophorae* e *N. nodosus*) são geralmente obtidas de coletores artificiais colocados no mar, próximos às áreas de cultivo. As ostras do Pacífico ou japonesas (*C. gigas*) são adquiridas de criatórios específicos, como o laboratório de cultivo de Moluscos Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina.<sup>3</sup>

O conhecimento da origem dos juvenis de moluscos bivalves utilizados nas criações é um elemento muito importante. Estudos realizados acerca do efeito do lugar de origem sobre a composição do microbioma de espécies de moluscos bivalves comprovam que o microbioma destes animais depende fortemente do lugar de sua origem. Uma mudança drástica da localização geográfica destes animais pode alterar o microbioma originário e desenvolver uma reação de estresse que pode causar mortalidades elevadas. O deslocamento pode, também, permitir a difusão e transmissão de espécies microbianas ou parasitárias de interesse sanitário para os próprios moluscos bivalves. Por esta razão, a OIE preconiza o monitoramento constante da presença ou ausência de doenças de notificação obrigatória e autoriza a movimentação de animais só entre áreas com o mesmo nível sanitário (ALMAGRO-MORENO; TAYLOR, 2013).

---

<sup>3</sup> <http://www.fazendamarinha.com.br/situacaoepespectivadaostreoculturasc.htm>

### 2.1.2 A ECOLOGIA DA RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS

A resistência aos antibióticos (ABR) evoluiu nos últimos 20 anos de forma tal a ser considerada, atualmente, uma ameaça global para os sistemas de saúde pública. A ABR é uma “guerra” entre dois exércitos: de um lado existem produtos químicos destinados a eliminar os microrganismos, do outro, existe a capacidade das bactérias de adquirir resistências, o que acontece com muito mais rapidez daquela que os seres humanos têm para produzir novos fármacos. Infecções causadas por cepas bacterianas resistentes a antibióticos são associadas à redução da qualidade da vida, aumento da probabilidade de infecção de outros órgãos e tecidos, aumento da taxa de cronicização das doenças bacterianas e de desenvolvimento de infecções secundárias causadas por outras bactérias oportunistas, que se tornaram, também, resistentes aos antibióticos (FERRI et al., 2015). O risco representado pela resistência a antibióticos é tão alto que no relatório do fórum econômico global sobre os riscos globais de 2014, este problema é considerado a par do terrorismo, ou do aquecimento global<sup>4</sup>. Neste sentido, um papel crucial é representado pela cadeia de produção de produtos de origem animal e pelos resíduos de antibióticos presentes dentro deles. Nos animais é comum a utilização de antibióticos de forma desregulada, principalmente no Brasil, onde é fácil adquirir os remédios sem receita veterinária. A utilização de antibióticos nos animais de produção zootécnica é feita, de um lado com fins terapêuticos, do outro, com função de profilaxia, ou seja, antes do aparecimento dos sintomas clínicos da doença; ou com a função de promotores de crescimento, modulando o microbiota presente no intestino, em prol de espécies de bactérias mais “funcionais” à produção. Estes últimos dois usos dos antibióticos são realizados administrando os produtos na água fornecida aos animais, ou na ração e, frequentemente, expõem os animais e as bactérias a dosagens sub-terapêuticas, incrementando, assim, a possibilidade de desenvolvimento de ABR. Para limitar esta exposição aos antibióticos, a União Europeia impôs, desde 2006, a proibição ao uso de antibióticos de importância humana para fins não terapêuticos em rações para animais de produção zootécnica<sup>5</sup>.

A pressão seletiva exercida pelos antibióticos sobre as bactérias atua de forma classicamente darwiniana, selecionando as cepas que possuem ou que tenham adquirido, de alguma forma,

---

<sup>4</sup> <http://www.weforum.org/reports/global-risks-2014-report>

<sup>5</sup> [http://europa.eu/rapid/press-release\\_IP-05-1687\\_en.htm](http://europa.eu/rapid/press-release_IP-05-1687_en.htm)

a capacidade de resistir a este tipo de substâncias (DAVIES; DAVIES, 2010). Os antibióticos são utilizados pelos seres humanos com a função de eliminar células de espécies bacterianas patogênicas, mas os seus mecanismos de funcionamento não são totalmente específicos e, portanto, podem exercer uma forte pressão seletiva sobre espécies bacterianas ambientais.

As bactérias ambientais são aquelas que não têm um relacionamento evolutivo direto com a espécie humana, e não são patógenos humanos diretos (diferentemente de espécies como o *Mycobacterium tuberculosis* cuja evolução acompanha os seres humanos há milhares de anos e pelas quais os seres humanos representam o único hospedeiro, ou o hospedeiro de eleição) (DAVIES; DAVIES, 2010; GIBBSON, 2013). Por esta razão, as bactérias ambientais não foram submetidas à pressão seletiva dada pelo uso de terapias antibióticas direcionadas. A maioria das bactérias ambientais, principalmente aquelas que vivem no solo, tem a capacidade de produzir substâncias antibióticas com a função de inibir o crescimento de outras espécies de bactérias competidoras, ou de servir como moléculas de sinalização ou regulatórias, especialmente nas baixas concentrações que geralmente são encontradas no ambiente natural (BERGLUND, 2015). Em alguns casos, moléculas de resistência aos antibióticos são produzidas para servir de “detoxificação” dos próprios antibióticos produzidos pela célula bacteriana, e este tipo de resistência intrínseca aos antibióticos desenvolveu-se muito antes do início da pressão seletiva exercida pelo uso de antibióticos para fins terapêuticos (DAVIES; DAVIES, 2010). Neste sentido, alguns estudos ressaltam o efeito hormético de baixas doses de antibiótico para as bactérias no ambiente: em baixas concentrações possuem efeito benéfico, enquanto em doses maiores seriam letais para as próprias bactérias (MARTINEZ, 2009b; ALLEN et al., 2010). Da mesma forma, baixas concentrações de antibióticos estimulam o desenvolvimento da “resposta SOS” nas bactérias que, por sua vez, reduz a susceptibilidade aos efeitos dos antibióticos (BERGLUND, 2015). A mesma “resposta SOS” de reação a estímulos estressantes nas bactérias estimula a expressão do gene da integrase, que facilita a captação e a inclusão no genoma bacteriano de cassetes genéticos. Alguns antibióticos, como os beta-lactâmicos, os quinolons ou o trimetoprim estimulam a indução da resposta SOS nas bactérias (BERGLUND, 2015), e reduzem a repressão da transcrição de genes obtidos por transferência horizontal (LOPATKIN et al., 2017), facilitando, assim, o compartilhamento de genes entre indivíduos diferentes.

No caso da resistência “adquirida” aos antibióticos, derivada da pressão seletiva causada pelo uso terapêutico de antibióticos (ARNOLD; WILLIAMS; BENNETT, 2016), ao contrário, desenvolve, como explicado anteriormente, ou através de mutações ou de transferência horizontal de genes de resistência que, frequentemente, são codificados por elementos móveis, como os plasmídeos (HALL; BROCKHURST; HARRISON, 2017; STEVENSON et al., 2017). Neste segundo caso, que é o mais comum e o de mais rápida ocorrência, é necessária a presença de espécies de bactérias que sejam “doadoras” dos genes de resistência, e outras que são as “receptoras”. Neste sentido, as bactérias comensais ou patogênicas oportunistas desenvolvem uma função crucial de ponte (ou de porta de acesso) entre as bactérias ambientais doadoras de genes e as bactérias patogênicas receptoras.

Os genes associados à resistência a antibióticos estão geralmente presentes em elementos genéticos móveis do genoma bacteriano (resistoma, mobiloma...) e podem facilmente ser transferidos entre bactérias de grupos taxonômicos altamente diferentes. Como estes elementos genéticos móveis não transferem elementos genéticos vitais para as bactérias, sua presença nas populações bacterianas estudadas é altamente variável e o fluxo genético é altamente dependente da ecologia do ambiente onde as bactérias se encontram e da presença de agentes estressantes para as bactérias, como poluentes químicos, resíduos dos próprios antibióticos, ou sanitizantes (WELLINGTON et al., 2013). Os mesmos autores chamam atenção sobre a transferência horizontal de genes preferencial entre bactérias que ocupam o mesmo nicho ecológico e que estejam, portanto, mais próximas fisicamente entre si.

A transferência horizontal de genes de resistência pode acontecer de três formas diferentes: por conjugação, por transformação e por transdução.

A conjugação é o método que tem a maior importância para a transferência horizontal de genes de resistência, e pode ser realizada entre espécies bacterianas diferentes, assim como entre células bacterianas e eucarióticas. Os principais elementos genéticos que podem ser transferidos desta forma são os plasmídeos e os elementos integrativos conjugativos (BERGLUND, 2015; LOPATKIN; SYSOEVA; YOU, 2016).

A transformação, ou seja, a captação de fragmentos de genes livremente presentes no ambiente pode parecer um método de limitada importância para a difusão de genes, mas

alguns estudos recentes citados por Berglund (2015) demonstram que, apesar da hostilidade do ambiente externo às células bacterianas para a sobrevivência e integridade do DNA, esta é uma forma significativa de transferência de genes de resistência em água marinha, onde por exemplo, a sobrevivência de bactérias entéricas é reduzida (HUGHES, 2008; BERGLUND, 2015).

A transdução, ou seja, a transferência horizontal de genes através de fagos é outra forma de transferência horizontal de genes de resistência que foi subestimada até pouco tempo atrás. Os fagos representam eficientes disseminadores de genes de resistência em virtude do tamanho reduzido, da elevada capacidade de transmissão dos genes e elevada replicação e pela proteção que exercem sobre o DNA transportado através de suas estruturas físicas. Além disso, a especificidade de hospedeiros que podem ser atacados por determinados tipos de fagos associados à transferência de pacotes de resistência a antibióticos pode limitar sua eficiência e competência como difusores (LOPATKIN; SYSOEVA; YOU, 2016).

Os integrons representam outro importante sistema de transmissão de genes de resistência a antibióticos no ambiente (BERGLUND, 2015). Os integrons são plataformas de agrupamentos genéticos capazes de capturar e expressar cassetes de genes que podem codificar determinantes de resistência a antibióticos (BERGLUND, 2015). Entre os elementos que compõem os integrons, vale ressaltar a função das integrases, que têm a função de inserir novas porções aos integrons, servindo como portas de acesso para os elementos genéticos dentro do integron. Os genes que induzem a expressão da integrase são ativados pela resposta SOS que, por sua vez, é ativada por eventos estressantes para a bactéria, como a exposição a antibióticos (especialmente trimetoprim, beta-lactâmicos ou quinolons), ou compostos químicos como os detergentes (WELLINGTON et al., 2013; BERGLUND, 2015). Os integrons são divididos em dois grupos: os integrons cromossômicos e os integrons móveis, geralmente associados a plasmídeos. Estes últimos representam uma grande fonte de variabilidade genética para as bactérias e de adaptabilidade, já que podem utilizar cassetes genéticas presentes em muitas espécies diferentes de bactérias (metagenoma bacteriano) e disseminar genes de resistência a antibióticos entre bactérias diferentes.

Do ponto de vista ecológico podem ser definidos três ambientes com diferentes níveis de exposição a estresse causado por antibióticos e independentes entre si: o primeiro nível é representado pela inteira microbiosfera, ambiente com moderada exposição à pressão

seletiva causada por exposição a antibióticos, e onde os determinantes de resistência inerentes às espécies bacterianas exercem funções de regulação, ou de comunicação entre indivíduos diferentes, mas diferentes da própria resistência a antibióticos (MARTINEZ et al., 2009a).

O segundo nível é representado por *habitat* onde existe um contato frequente entre bactérias ambientais e bactérias de origem humana. Exemplo deste tipo de ambiente podem ser as estações de tratamento de esgoto, os canais de esgoto, ou os solos tratados com adubo derivado de fezes de animais tratados com antibióticos (MARTINEZ, 2009b). O solo tratado com fezes contendo resíduos de antibióticos também possui concentrações mais elevadas do próprio antibiótico do que a água e por tempos maiores. Considerando que a thg requer a contemporânea presença de espécies bacterianas doadoras de genes (neste caso as espécies ambientais) e de receptoras (as bactérias humanas), estes ambientes são um ponto chave para a transferência da resistência, por via horizontal, às bactérias de origem humana (MARTINEZ, 2009b).

O terceiro nível é representado pelos indivíduos humanos ou animais submetidos a tratamentos com antibióticos. Neste caso, devido à elevada pressão de seleção exercida pelas substâncias antibióticas, a aquisição da resistência se deve, na maioria das vezes, à mutação de cepas bacterianas (STEVENSON et al., 2017). Do ponto de vista veterinário, o excesso de utilização de antibióticos na prática médica veterinária, ou, ainda pior, a facilidade de compra e uso sem orientação veterinária são elementos de grande importância que influenciam fortemente a seleção para bactérias resistentes a antibióticos de um lado, e pela perpetuação da transmissão por via horizontal e vertical de genes de resistência do outro. Esta situação parece ser extremamente comum em países “em via de desenvolvimento”, que alguns artigos culpam por selecionar bactérias resistentes a antibióticos de uso veterinário que, eventualmente, se disseminam globalmente (BERGLUND, 2015; FONDI et al., 2016). Entre os antibióticos de uso veterinário mais frequentemente utilizados sem controle algum de venda é a tetraciclina. Além da utilização terapêutica dos antibióticos, em medicina veterinária existe também a utilização profilática ou probiótica dos antibióticos, respectivamente, para prevenir o acontecimento de casos de doença na população animal, conseqüentemente, a estresses, ou para selecionar a microbiota bacteriana intestinal em prol de espécies bacterianas que

possam estimular um maior ganho de peso e deposição de gordura e proteína nos animais de produção zootécnica, especialmente peixes, suínos e aves (BERGLUND, 2015).

Para poder entender melhor a resistência aos antibióticos dentro das populações de bactérias, é preciso mudar um pouco o enfoque da nossa análise e considerar, independentemente, as bactérias e os genes de resistência que elas carregam.

Para que um gene de resistência consiga “evoluir” e se estabelecer em uma bactéria potencialmente patogênica para seres humanos a partir de bactérias ambientais, este gene deve passar através de duas grandes restrições: a primeira é que o gene deve ser capaz de se transferir e se fixar a nível cromossômico em bactérias patogênicas humanas, a segunda é que estas bactérias onde o gene se transfere devem ser capazes de resistir aos estresses causados por antibióticos (MARTINEZ, 2009a; STEVENSON et al., 2017). A importância da capacidade de fixação em bactérias de interesse médico humano é comprovada pelo fato de que em bactérias isoladas de animais silvestres e selvagens são encontrados genes de resistência a antibióticos diferentes daqueles descritos em casos clínicos humanos ou até veterinários (ARNOLD; WILLIAMS; BENNETT, 2016). É interessante observar que a primeira condição (a fixação em bactérias patogênicas para humanos) depende, por sua vez, de quatro elementos: 1) a coexistência do gene com bactérias (vetores) patogênicas para os seres humanos; 2) o recrutamento destes genes por sistemas de transferência (fagos, plasmídeos) que sejam compatíveis com a bactéria patogênica receptora, quando podem existir limitações neste sentido causadas, por exemplo, pela exclusão recíproca de plasmídeos, ou pela escolha de hospedeiros susceptíveis pelos fagos; 3) o custo energético representado pela introdução do gene pela bactéria deve ser compensado pelo ganho competitivo compensatório representado pela expressão do gene (MARTINEZ, 2009b) e, por fim, 4) o “efeito do fundador” pelo qual o primeiro gene adquirido por transferência horizontal é aquele que mais possivelmente será mantido e transferido, a menos que não mude a pressão seletiva exercida por antibióticos sobre o ambiente bacteriano em questão (MARTINEZ et al., 2009a). O custo energético pela manutenção do gene de resistência é um elemento crucial. Em ambientes onde não existe uma estimulação contínua com antibióticos, o custo energético de manutenção de genes de resistência pode não ser compensatório para as bactérias. Este conceito é a base da tentativa de remoção de genes de resistência a antibióticos, geralmente aplicada, por exemplo, na União Europeia, proibindo o uso de antibióticos e favorecendo,

assim, bactérias que não possuam este tipo de genes (FERRI et al., 2015; VITTECOQ et al., 2016).

Há situações em que os genes de resistência a antibióticos podem ser cosseleccionados e alocados em unidades genéticas juntamente com outros elementos que conferem vantagem ecológica em ambientes específicos. Entre estes elementos podem ser citados a resistência a metais pesados, biocidas ou sanitizantes (PLANTE; CENTRÓN; ROY, 2003; MARTINEZ et al., 2009a; VITTECOQ et al., 2016). Em outros casos, o aumento da resistência é associado a um aumento da patogenicidade das bactérias (DA SILVA; MENDONÇA, 2012), mas esta associação não é absolutamente fixa e depende do mecanismo de resistência que é ativado e, também, do ambiente onde a bactéria existe (DA SILVA; MENDONÇA, 2012). Desta forma, fica visível como os genes de resistência a antibióticos, uma vez estabilizados dentro de uma população bacteriana (ou em uma meta-população bacteriana em um ecossistema) podem ser replicados autonomamente e independentemente das bactérias que inicialmente os introduziram no ambiente, mesmo em ausência do estímulo seletor representado pela presença dos próprios antibióticos, como é possível observar nos diferentes estudos que analisam a resistência a antibióticos em populações de bactérias isoladas de animais selvagens, em ambientes onde não existe presença ou influência de atividades humanas (MARTINEZ, 2009a). A replicação dos genes de resistência independente de seus vetores (nesta altura, as bactérias acabam sendo consideradas como simples caixas contentoras dos genes de interesse) permite, também, seu espalhamento através de ambientes diferentes, através da thg, principalmente através de água (doce ou marinha) ou do comércio internacional de bens, especialmente de alimentos (MARTINEZ, 2009b; FONDI et al., 2016).

Considerando a ubiquidade dos genes que conferem resistência a antibióticos entre hospedeiros bacterianos diferentes, a presença de uma bactéria resistente a algum antibiótico no ambiente não pode ser traduzida, simplesmente como uma prova da presença de uma contaminação por antibióticos ou por seus genes de resistência. O que pode servir de indício neste sentido é a prevalência da resistência a antibióticos dentro da meta-população bacteriana de um determinado ambiente (MARTINEZ, 2009b).

Em sua ampla revisão, Wellington et al. (2013) descrevem amplamente as rotas de contatos entre os seres humanos, antibióticos, genes de resistência a antibióticos ou bactérias resistentes a antibióticos presentes no ambiente. A maioria destes caminhos são envolvidos

com a cadeia alimentar e os alimentos. Os principais são: vegetais que foram adubados com adubos orgânicos produzidos a partir de fezes de animais tratados com antibióticos; produtos de origem animal derivados de animais que acumularam resíduos de antibióticos; peixes e produtos da pesca expostos intencionalmente (aquicultura) ou não (criação extensiva, pesca, ou criação de moluscos bivalves) a resíduos de antibióticos; água potável obtida a partir de fontes contaminadas com resíduos; e águas marinhas costeiras contaminadas utilizadas para fins recreativos, ou para criação de moluscos bivalves. Nesta pesquisa iremos aprofundar diretamente a presença de bactérias resistentes a antibióticos nos moluscos bivalves destinados ao consumo alimentar humano.

O elemento principal para a recirculação de resíduos de antibióticos e de bactérias resistentes (ou de seus genes) no ambiente, são os sistemas de tratamento do esgoto, devido à elevada concentração de bactérias e à presença de resíduos de antibióticos ainda ativos (WELLINGTON et al., 2013). A água marinha também representa um ambiente muito importante de difusão de resistência a antibióticos que chegam da terra firme, principalmente através de esgotos não tratados e se difundem entre as bactérias marinhas até a grandes distâncias, considerando o efeito das correntezas (HATOSY; MARTINY, 2015). Como mencionado anteriormente, o tratamento de peixes e camarões com antibióticos em criação intensiva também é uma forma de poluição das águas doces ou marinhas, com resíduos desses fármacos (MIRANDA et al., 2013; WANG et al., 2015; VITTECOQ et al., 2016). Neste sentido, os moluscos bivalves representam um ponto de grande interesse para o monitoramento da presença de bactérias resistentes a antibióticos, por serem filtradores, imóveis, possuir um microbioma bem estruturado e ser facilmente objeto de amostragem e estudo (MARTINEZ-URTAZA et al., 2004; MIRANDA et al., 2013; WANG et al., 2015; HU; CHEN, 2016).

Um outro elemento relevante para a difusão no ambiente da resistência aos antibióticos são os animais silvestres, especialmente aqueles que, como as gaivotas, os gambás, ou os animais silvestres sinantrópicos entram facilmente em contato com os animais domésticos, suas fezes, ou suas carcaças (WELLINGTON et al., 2013; VITTECOQ et al., 2016). Assim, a fragmentação do ambiente natural facilita o contato entre animais silvestres e seres humanos e seus dejetos. No ambiente marinho, os peixes que se alimentam do lixo jogado dos navios ou dos dejetos liberados no mar, também podem participar da disseminação da resistência aos antibióticos ou das bactérias que a codificam (ARNOLD; WILLIAMS; BENNETT, 2016).

## 2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.2.1 LOCAL DE ESTUDO E ANÁLISE AMBIENTAL

A pesquisa foi realizada em duas fazendas marinhas localizadas nos municípios de Arraial do Cabo (22°58'3.2" S; 42°0'25.2" W) (A), e de Armação dos Búzios (22°44'19.7" S; 41°56'52.1" W) (B), respectivamente. Em Armação dos Búzios foram coletadas amostras de água salobra derivada de uma área de pântano drenante em proximidade do ponto de coleta de moluscos (22°45'30.2" S, 41°57'15.7" W). A fazenda em Arraial do Cabo se encontrava dentro da Reserva Extrativista Marinha de Arraial do Cabo. A coleta dos moluscos bivalves, para fins científicos, foi autorizada pelo Ministério do Ambiente através das autorizações 54941-1 e 54941-2 de 4 de agosto, 2016 (em anexo).

As espécies de moluscos coletadas foram respectivamente: mexilhões (*Perna perna*), ostras (*Crassostrea gigas*), e vieiras (*Nodipecten nodosus*), na fazenda A; mexilhões (*Perna perna*) e, vieiras (*Nodipecten nodosus*), na fazenda B.

Junto com cada amostragem de moluscos bivalves foi realizada a análise de dados ambientais: temperatura do ar, temperatura da água, oxigênio dissolvido, porcentagem de saturação do oxigênio, pH da água, condutividade (mS/cm), utilizando um medidor multi-paramétrico de qualidade da água HORIBA U-52 (*Horiba Instruments Brazil, Ltda, São Paulo, Brazil*). A velocidade e a direção da corrente, a direção e intensidade do vento no dia da amostragem foram estimados e, sucessivamente, confirmadas através do site da NOAA *Environmental Research Division's Data Access Protocol-ERDAPP*<sup>6</sup>. A turbidez no ponto de coleta foi medida com um disco de *Secchi*.

A análise ambiental da bacia hidrográfica e das áreas mais próximas ao local de cultivo foram inicialmente estudadas de forma teórica, coerentemente com as orientações do CEFAS britânico (CEFAS, 2014), utilizando o *software GOOGLE EARTH PRO* (Google LLC), entre Setembro de 2016 e Junho de 2017.

---

<sup>6</sup> <http://coastwatch.pfeg.noaa.gov/erddap>

Foi realizado um mapa de uso do solo da bacia hidrográfica da região dos Lagos utilizando o *software* livre *QUANTUM GIS*<sup>7</sup>. As informações geográficas foram definidas usando o Sistema Geodésico WGS 84.

Os dados vetoriais para a produção do mapa derivaram de três fontes principais:

Mapa do Brasil do site do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e estatística):

[ftp://geoftp.ibge.gov.br/organizacao\\_do\\_territorio/malhas\\_territoriais/malhas\\_municipais/municipio\\_2015/Brasil/BR/](ftp://geoftp.ibge.gov.br/organizacao_do_territorio/malhas_territoriais/malhas_municipais/municipio_2015/Brasil/BR/).

“Shape” da área de Proteção Ambiental Rio São João/Mico Leão Dourado, do site do ICMBio:

<http://www.icmbio.gov.br/portal/unidadesdeconservacao/biomas-brasileiros/mata-atlantica/unidades-de-conservacao-mata-atlantica/2169-apa-da-bacia-do-rio-sao-joaomico-leao-dourado>

Mapa de uso do solo do estado do Rio de Janeiro no site do INEA:

<http://www.inea.rj.gov.br/Portal/MegaDropDown/EstudosePublicacoes/Publicacoes/index.htm&lang>

Os dados oceanográficos da Região dos Lagos e do Cabo de São Tomé foram obtidos de estudos bibliográficos específicos (CALADO et al., 2010; AMARAL RAMOS, 2011; PALÓCZY et al., 2014; BATISTA et al., 2017).

A partir destes dados, foi feita uma análise do território na bacia inteira de captação para confirmar os dados sobre o uso do solo (urbano, pastagem, cobertura agrícola, selva, por exemplo) e a localização e tipificação das fontes de contaminação, tanto dispersas (drenagem de áreas de pasto) ou pontuais (descargas de esgotos domésticos ou industriais urbanos por exemplo) (CEFAS, 2010, 2014). Junto com os maricultores foram obtidas informações sobre os fluxos turísticos, a criação dos moluscos bivalves e o comércio dos produtos. A análise do território foi realizada junto com cada campanha de coleta de moluscos bivalves entre outubro de 2016 e maio de 2017.

---

<sup>7</sup> [https://www.qgis.org/pt\\_BR/site/](https://www.qgis.org/pt_BR/site/)

Informações sobre a densidade da população na região de estudo foram obtidas a partir dos dados do censo da população de 2010 realizado pelo IBGE<sup>8</sup>.

Informações sobre precipitações de chuva derivaram do Instituto Brasileiro de Meteorologia (INMET)<sup>9</sup>.

### 2.2.2 COLETA E TRANSPORTE DAS AMOSTRAS

Entre o dia 12 de outubro de 2016 e o dia 27 de abril de 2017 foram realizadas 13 coletas de amostras nas duas localidades. A frequência das coletas foi, aproximadamente, a cada duas semanas, para garantir a independência de cada resultado dos anteriores (LAING; SPENCER, 2006; CEFAS, 2014; FAO/WHO, 2018). Esta escala de frequência de amostragem foi alterada no final das coletas: a 11<sup>a</sup> amostragem evidenciou uma elevada concentração de *E. coli* e por isso, a sucessiva, 12<sup>a</sup> foi realizada só três dias depois para confirmar a contaminação e avaliar a velocidade de depuração natural dos moluscos bivalves. A 13<sup>a</sup> coleta foi realizada um mês depois da anterior para avaliar exclusivamente a persistência de cepas de *E. coli*, durante um período prolongado (entre a 12<sup>a</sup> e a 13<sup>a</sup> coleta não ocorreram períodos significativos de chuva).

As amostras de moluscos bivalves e de água foram armazenadas em temperatura de + 4-8°C, em contentores isotérmicos adicionados com conservador biológico e foram transportados no mesmo dia da coleta até os laboratórios de Microbiologia do Laboratório de Sanidade Animal da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), na cidade de Campos dos Goytacazes (RJ). A duração do transporte foi entre 3 e 5 horas. Ao chegar no laboratório, as amostras foram mantidas em temperaturas de + 4-8°C e processadas em até 12 horas depois da chegada. Os moluscos mortos (não respondentes à concussão), no momento da chegada no laboratório, eram descartados. Uma nova triagem da vitalidade dos moluscos era realizada antes do início do processamento. Ostras e vieiras, por possuírem valvas assimétricas foram transportadas e armazenadas com a valva côncava virada para baixo, para permitir a manutenção da água naturalmente presente dentro dos moluscos.

---

<sup>8</sup> <https://censo2010.ibge.gov.br/>

<sup>9</sup> <http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=home2/index>

## 2.2.3 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

### 2.2.3.1 DILUIÇÃO DAS AMOSTRAS

Os moluscos bivalves foram preparados e diluídos conforme a norma UNI EN ISO 6887-3:2003 (ISO, 2003).

De cada amostra foram escolhidos pelo menos seis indivíduos de moluscos bivalves vivos (concha fechada ou reação positiva à percussão com fechamento das valvas) e íntegros, com um peso total da amostra processada de 75 a 100 gramas. No caso das vieiras, cujo tamanho era maior, foram prelevadas amostras de 200 gramas de corpo dos moluscos. Os moluscos foram lavados e esfregados sob a torneira de jato de água potável e secos com o uso de papel toalha. Os moluscos bivalves foram abertos utilizando uma faca específica sanitizada com álcool e com a lâmina esterilizada por passagem no bico de Bunsen. O corpo dos moluscos era retirado junto com o líquido intervalvar e colocado em uma vasilha de vidro esterilizada. Uma vez alcançado o peso da amostra, era adicionada solução fisiológica em razão de 1/1 p/p e as amostras eram homogeneizadas com um liquidificador estéril. Sucessivamente, a partir desta diluição foi realizada uma diluição 1/5 p/p para obter finalmente as amostras diluídas 1/10 que seriam utilizadas para as análises. Sucessivas diluições decimais eram realizadas, colocando 1 mL da solução 1/10 em 9 mL de solução fisiológica (diluição 1/100 da amostra) e 1 mL da solução 1/100 em 9 mL de solução fisiológica para obter a diluição 1/1000 (ISO, 2003; CEFAS, 2014; PHE MICROBIOLOGY SERVICES, 2014).

### 2.2.3.2 ENUMERAÇÃO DE *ESCHERICHIA COLI* B-GALACTOSIDADE POSITIVAS DE AMOSTRAS DE MOLUSCOS BIVALVES

A enumeração de *E. coli*  $\beta$ -galactosidase positivas foi realizada conforme o protocolo UNI EN ISO 16649-3, técnica equivalente ao protocolo UNI EN ISO 16649-2, técnica oficial preconizada pelo *Codex Alimentarius*, pela União Europeia e pelo Governo Brasileiro (MOOIJMAN et al., 2007; BRASIL, 2012; CODEX ALIMENTARIUS, 2014; EU, 2015). O meio utilizado para o plaqueamento das amostras foi o 5 tryptone bile X-glucuronide ágar (TBX Agar) (OXOID). A

contagem do número de colônias nas amostras foi realizada em duplicata. Os produtores foram informados através de laudos técnicos assinados pelo responsável do projeto, Prof. Olney, de todos os resultados das análises realizadas, indicando, também, a oportunidade de suspender a coleta dos moluscos bivalves, caso a concentração de *E. coli* fosse superior à classificação estabelecida pelo Governo Brasileiro, que permite o consumo direto dos moluscos bivalves (BRASIL, 2012).

#### 2.2.3.3 ISOLAMENTO DE ENTEROBACTERIACEAE DE AMOSTRAS DE MOLUSCOS BIVALVES E ÁGUA

Para isolar as bactérias entéricas das amostras de água e de moluscos, 1 mL da solução 1/10 de molusco bivalve e líquido intervalvar foi colocada em tubos com 9 mL de água peptonada 0,5% de NaCl (OXOID Inc.). O isolamento destas bactérias da água foi realizado colocando 1 mL de água em tubos com 9 mL de água peptonada 0,5% de NaCl (OXOID Inc.). As amostras de água e de moluscos eram incubadas em estufa por 18 a 24 horas a 37°C. Com a alça de platina foi coletada uma pequena porção da superfície do caldo incubado e espalhada em duplicata em placas de Petri, contendo 20 mL de Agár Mac Conkey (OXOID Inc.). As placas foram incubadas por 18 a 24 horas a 37°C. De cada par de placas de Mc Conkey foram isoladas 10 colônias e transferidas para purificação em novas placas de Agár Mac Conkey. As placas purificadas foram identificadas bioquimicamente em nível de família por meios bioquímicos (Gram, oxidase, catalase, inoculação em Agár TSI) e armazenadas em duplicata em freezer a -80°C em meio “*skim milk*” (20% peso/peso de pó de leite desnatado em água deionizada fervido por 10 minutos a 100°C).

#### 2.2.3.4 ISOLAMENTO DE *SALMONELLA* SPP. DE AMOSTRAS DE ÁGUA E MOLUSCOS BIVALVES

Para isolar bactérias do gênero *Salmonella*, 1 mL da solução de amostra diluída 1/10 foi colocado em 9 mL de água peptonada e incubado por 24 horas a 37 °C., 0,1 mL desta água peptonada foram transferidos em 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis e incubados por 24 horas a 42°C. Com uma alça de platina foi prelevada uma pequena porção da superfície do caldo após a incubação e foi espalhada em uma placa de meio ágar Hektoen, específico para

*Salmonella* e incubado por 24 horas a 37°C. Colônias típicas de *Salmonella* foram separadas, purificadas por passagem em placas de Hektoen, ágar MacConkey e ágar nutriente. Sucessivamente, a partir das amostras puras armazenadas em tubos de ágar nutriente, estas foram testadas quimicamente (Gram, oxidase, catalase, crescimento em tubos de ágar TSI) e, sucessivamente, identificadas em equipamento VITEK 2 (BioMérieux, Mercy l'Etoile, França), seguindo as instruções do fabricante.

#### 2.2.3.5 ISOLAMENTO DE VIBRIONACEAE DE AMOSTRAS DE ÁGUA E MOLUSCOS BIVALVES

Para isolar bactérias do gênero *Vibrio* 0,1 mL da solução, 10% de molusco bivalve e líquido intervalvar foram colocados em tubos com 10 mL de água peptonada alcalina (3% NaCl, pH 8,4-8,6). As amostras foram incubadas a 37°C *overnight*. Com a alça de platina foi coletada uma pequena porção da superfície do caldo incubado e espalhada em duplicada em placas de Petri, contendo 20 mL de Ágar *Tiosulfate Citrate Bile Sucrose* (TCBS) (OXOID Inc.) e incubados em estufa a 37°C, entre 18 e 24 horas. De cada par de placas de Petri com Ágar TCBS foram isoladas 10 colônias casuais que foram repicadas em Ágar nutriente 3% NaCl para purificação. As colônias purificadas foram testadas bioquimicamente para obter uma identificação da família (teste de Gram, catalase, oxidase, crescimento em Ágar TSI a 1% NaCl) e estocadas em duplicata em Ágar estoque tamponado 1% NaCl.

#### 2.2.4 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS E IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS

Três cepas de *Enterobacteriaceae* e três cepas de *Vibrionaceae* escolhidas aleatoriamente de cada amostra de molusco bivalve e água, de cada ponto de coleta e de cada dia de amostragem, foram submetidas a teste de resistências a antibióticos. Todas as amostras de *Vibrio* spp. e *Enterobacteriaceae* das coletas 11, 12, e 13 foram testadas. As classes de antibióticos utilizadas foram representativas dos produtos mais frequentemente utilizados em medicina humana e veterinária. A resistência aos antibióticos foi testada com o método de Kirby-Bauer. As *Enterobacteriaceae* foram testadas em ágar Mueller Hinton 0,5% NaCl e as *Vibrionaceae* foram testadas em ágar Mueller Hinton 1% NaCl. Os antibióticos testados foram:

Amoxicilina e ácido Clavulânico (AMC, 20/10 µg), Ampicilina (AMP, 10 µg), Cefalotina (CFL, 30 µg), Cefoxitina (CFO, 30 µg), Ciprofloxacina (antibiótico de uso humano) (CIP, 5 µg), Cloranfenicol (antibiótico de uso humano) (CLO, 30 µg), Cotrimoxazol (SUT, 25 µg), Gentamicina (GEN, 10 µg), Tetraciclina (TET, 30 µg), Tobramicina (TOB, 10 µg), Florfenicol (antibiótico da mesma classe do cloranfenicol, mas utilizado prevalentemente na clínica veterinária) (FLO-FLF, 30 µg) e Norfloxacina (antibiótico da mesma classe da ciprofloxacina, mas utilizado em medicina veterinária, principalmente em bovinos) (NOR, 10 µg). Todos os antibióticos foram produzidos pela CEFAR Inc. (São Paulo-SP). O diâmetro do halo de inibição do crescimento foi aferido entre 12 e 24 horas depois da inoculação, utilizando um paquímetro digital (Mitutoyo, Brasil) e medido em milímetros. A sensibilidade foi definida utilizando os pontos de corte definidos pela BrCast-EUCAST (EUCAST, 2016a; BRCAST, 2017). Escolheu-se avaliar os resultados dos antibiogramas pelos padrões Europeus, considerando, principalmente, a intenção do Brasil de exportar moluscos bivalves para a Europa e não para os Estados Unidos da América, que possuem outros padrões de avaliação da resistência antimicrobiana (CLSI, 2011, 2019).

Depois da execução do teste de resistência a antibióticos, as bactérias testadas foram identificadas em equipamento VITEK 2 (BioMérieux, Mercy l'Etoile, França), seguindo as instruções do fabricante.

#### 2.2.5 BIOLOGIA MOLECULAR

Após a realização dos testes de resistência a antibióticos, todas as colônias bacterianas das coletas 11, 12 e 13 foram analisadas geneticamente para a pesquisa de genes associados à resistência a antibióticos.

#### 2.2.6 EXTRAÇÃO DO DNA

A extração do DNA das bactérias foi realizada por fervura, prelevando uma porção da colônia bacteriana pura com uma alça e colocando em um tubo Eppendorf de 200 µL contendo 50 µL de água deionizada milli-Q. Os tubos foram vortexados, centrifugados (5 segundos em

aceleração até 7.000 RPM) e colocados em termociclador programado com ciclo único de 99°C por 10 minutos. Os tubos foram, depois, centrifugados e armazenados em temperatura de -8°C por até 5 dias.

### 2.2.7 REALIZAÇÃO DAS PCR

A PCR foi realizada procurando os seguintes genes de resistência, conforme descrito em (PRIBUL et al., 2016). Os *primers* foram validados utilizando a ferramenta *BLAST* contra bancos de dados disponíveis na rede. Não foi realizada a pesquisa de genes de resistência aos antibióticos cloranfenicol, florfenicol e tetraciclina que foram testados fenotipicamente.

**Quadro 1:** Sequência dos *primers* a serem utilizados para o estudo de resistência a quinolonas e fluorquinolonas em bactérias gram-negativas (GOÑI-URRIZA et al., 2002; YÁÑEZ et al., 2003; PEIRANO et al., 2006; CAVACO et al., 2009; JACOBY et al., 2009; KIM et al., 2009) (**Park et al., 2006; Pitout et al., 2008**).

PRIMERS	SEQUÊNCIA DO PRIMER (5'-3')	GENE ALVO	AMPLICON	REFERÊNCIA
QNRA-F	ATTTCTCACGCCAGGATTTG	<i>qnrA</i>	516pb	Jacoby et al. (2009)
QNRA-R	GATCGGCAAAGGTTAGGTCA			
QNRB-F	GATCGTGAAAGCCAGAAAGG	<i>qnrB</i>	469pb	Jacoby et al. (2009)
QNRB-R	ACGATGCCTGGTAGTTGTCC			
QNRC-F	GGGTTGTACATTTATTGAATCG	<i>qnrC</i>	307pb	Kim et al. (2009)
QNRC-R	CACCTACCCATTTATTTTCA			
QNRD-F	CGAGATCAATTTACGGGGAATA	<i>qnrD</i>	582pb	Cavaco et al. (2009)
QNRD-R	AACAAGCTGAAGCGCCTG			
QNRS-F	ACGACATTCGTCAACTGCAA	<i>qnrS</i>	417pb	Jacoby et al. (2009)
QNRS-R	TAAATTGGCACCTGTAGGC			

<b>AAC(6')-IB-F</b>	TATGAGTGGCTAAATCGAT			
<b>AAC(6')-IB-R</b>	CCCGCTTCTCGTAGCA	<i>aac(6')-Ib</i>	482pb	Park et al. (2006)
<b>INTEGRASE-F</b>	CCTCCCGCACGATGATC			
<b>INTEGRASE-R</b>	TCCACGCATCGTCAGGC	<i>Integrase</i>	250pb	Peirano et al. (2006)
<b>INTEGRON-3</b>	AAGCAGACTTGACCTGA			
<b>INTEGRON-5</b>	GGCATCCAAGCAGCAAG	<i>Integron</i> (região variável)	Variável	Peirano et al. (2006)
<b>ASALGYR-AF</b>	TCCTATCTTGATTACGCCATG			
<b>ASALGYR-AR</b>	CATGCCATACCTACCGCGAT	<i>Gyrase A</i>	441 pb	Goñi-Urizza et al. (2002)
<b>GYR-B-3F</b>	TCCGGCGGTCTGCACGGCGT			
<b>GYR-B-14R</b>	TTGTCCGGGTTGTACTCGTC	<i>Gyrase B</i>	1100 pb	Yáñez et al. (2003)

As PCR foram realizadas utilizando kits de Master Mix “*ThermoScientific MasterMix 2X*”, com as dosagens descritas no Quadro 2:

**Quadro 2:** Dosagem dos componentes utilizados para a realização das PCR, utilizando o *MasterMix: ThermoScientific MasterMix 2X*.

	PCR E CONTROLE +	BRANCO	CONTROLE -
<b>MASTER MIX</b>	12,5 µL	12,5 µL	12,5 µL
<b>ÁGUA</b>	0 µL	2 µL	10,5 µL
<b>PRIMERS F E R</b>	1+1 µL	0 µL	1+1 µL
<b>DNA</b>	10,5 µL	10,5 µL	0 µL

Os protocolos de realização das PCR foram conforme descritos no Quadro 3, a seguir:

	GYRA E GYRB	QNR A-B-C-D-S	AAC(6')IB	INTEGRASE	INTEGRON
<b>DESNATURAÇÃO INICIAL</b>	4'@94°C	6'@94 °C	2'@94 °C	10'@94 °C	5'@94 °C
<b>DESNATURAÇÃO</b>	1'@94°C	45''@94 °C	45''@94 °C	1'@94 °C	1'@94 °C

<b>ANELAMENTO</b>	30" @61 °C	45" @53 °C	45" @55 °C	30" @55 °C	1' @54 °C
<b>EXTENSÃO</b>	1' @72 °C	1' @72 °C	45" @72 °C	1' @72 °C	5' @72 °C
<b>EXTENSÃO FINAL</b>	10' @72 °C	7' @72 °C	30" @ 72 °C	10' @72 °C	10' @72 °C
<b>NÚMERO DE CICLOS</b>	30	30	34	35	35

**Quadro 3:** Protocolos de realização das PCR para a pesquisa dos genes de resistência a antibióticos utilizados, utilizando o *MasterMix ThermoScientific MasterMix 2X*.

Sucessivamente, junto com o "*ThermoScientific MasterMix 2X*", foi utilizado, também, o *MasterMix "Quiagen TopTaq MasterMix 2x"*. As dosagens utilizadas para a preparação das PCR foram como descritas no quadro 4, a seguir:

**Quadro 4:** Dosagem dos componentes utilizados para a realização das PCR, utilizando o *MasterMix: Quiagen TopTaq MasterMix 2X*.

	PCR E CONTROLE +	BRANCO	CONTROLE -
<b>MASTER MIX</b>	12,5 µL	12,5 µL	12,5 µL
<b>ÁGUA</b>	7,5 µL	7,5 µL	10,0 µL
<b>PRIMERS F E R</b>	1,25+1,25 µL	0 µL	1,25+1,25 µL
<b>DNA</b>	2,5 µL	2,5 µL	0 µL

O uso do *MasterMix Quiagen TopTaq MasterMix 2X* permitiu otimizar os protocolos de PCR, utilizando um programa comum (Quadro 5) para a pesquisa de genes de resistência diferentes. O protocolo utilizado permitiu realizar, ao mesmo tempo, a PCR para os genes: GYR-A, GYR-B, AAC (6') Ib, QNR-D e INTEGRASE. Os demais genes foram analisados, utilizando o *MasterMix ThermoScientific MasterMix 2X*, individualmente.

**Quadro 5:** Protocolo de realização das PCR para a pesquisa dos genes de resistência a antibióticos utilizados, utilizando o *MasterMix Quiagen TopTaq MasterMix 2X*.

PROGRAMA TOPTAQ-4	
<b>DESNATURAÇÃO INICIAL</b>	3' @94°C
<b>DESNATURAÇÃO</b>	30" @94°C
<b>ANELAMENTO</b>	45" @55 °C

<b>EXTENSÃO</b>	1'@72 °C
<b>EXTENSÃO FINAL</b>	10'@72 °C
<b>NÚMERO DE CICLOS</b>	30

Os controles positivos foram fornecidos pelo Laboratório de Enterobactérias do Instituto Oswaldo Cruz de Manguinhos (Rio de Janeiro, RJ) (Quadro 6):

<b>GENE</b>	<b>IDENTIFICAÇÃO DA CEPA BACTERIANA</b>
<b>AAC(6')IB</b>	IOC 1618/12
<b>INTEGRASE</b>	IOC 2555/14
<b>GYR-A</b>	IOC 7992/16
<b>GYR-B, PAR-C</b>	IOC 7892/16
<b>QNR-B</b>	IOC 6744/12
<b>QNR-S</b>	IOC 711/12
<b>QNR-D</b>	IOC 1212/12

**Quadro 6:** Identificação das cepas de *Salmonella enteritidis*, utilizadas como controle positivo para a pesquisa de genes de resistência a antibióticos.

#### 2.2.8 SEQUENCIAMENTO DOS AMPLICONS DOS GENES DE RESISTÊNCIA

O sequenciamento dos genes de resistência a antibióticos foi realizado no laboratório de genética veterinária da UFMG, em Belo Horizonte (MG).

Para realizar o sequenciamento, foi extraído o DNA das bactérias que possuíam os genes de resistência e dos controles positivos descritos anteriormente, utilizando o kit PREP-MAN ULTRA (*Applied Biosystems*), conforme instruções do fabricante no LSA da UENF. Os DNAs extraídos foram quantificados, utilizando o NANODROP e foram transportados em temperatura controlada até o laboratório de genética veterinária da escola de Medicina Veterinária da UFMG, em Belo Horizonte (MG) (LGEV-EV/UFMG).

No LGEV-EV/UFMG, foram realizadas, novamente, as PCR conforme descrito anteriormente e os produtos de PCR foram submetidos a sequenciamento, utilizando o kit *Thermofisher BIG DYE Mix*.

A reação de sequenciamento foi realizada conforme descrito no Quadro 7:

**Quadro 7:** Dosagem dos componentes da reação de sequenciamento conforme protocolos seguidos no LGEV-EV/UFMG.

COMPONENTES	VOLUME TOTAL 20 µL	CONTROLE (PGEM)
BIG DYE MIX	1,0 µL	1 µL
TAMPÃO DE SEQUENCIAMENTO 5X	3,5 µL	3,5 µL
PRIMERS	2,0 µL	4,0 µL
PRODUTO DE PCR	2,0 µL	2,0 µL
ÁGUA MILLI Q AUTOCLAVADA	11,5 µL	9,5 µL

As condições da reação foram conforme descritas no Quadro 8:

**Quadro 8:** Condições da reação de sequenciamento

TEMPERATURA	TEMPO	NÚMERO DE CICLOS
96 °C	1'	1 x
96 °C	10"	25 x
TM DO PRIMER	5"	
60 °C	4'	
60 °C	5'	
4 °C	INFINITO	1x

O sequenciamento foi sucessivamente realizado em sequenciador automático 3500 da *Applied Biosystem*, conforme instruções do fabricante.

Os resultados do sequenciamento foram analisados utilizando o programa MEGA X (*Molecular Evolutionary Genetic Analysis*<sup>10</sup>).

<sup>10</sup> [www.megasoftware.net](http://www.megasoftware.net)

## 2.2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

A análise estatística objetivou avaliar principalmente a significância da associação entre parâmetros ambientais e o perfil de resistência a antibióticos das bactérias isoladas de água de esgoto e moluscos bivalves. Os parâmetros ambientais avaliados foram:

1. O efeito do lugar de coleta: comparação entre bactérias isoladas de mexilhões entre os pontos de coleta de Arraial do Cabo e Armação dos Búzios.
2. O efeito da espécie de molusco bivalve: comparação entre bactérias isoladas das diferentes espécies de moluscos bivalves produzidas em Arraial do Cabo.
3. O efeito do nível de contaminação por *E. coli* sobre a resistência a antibióticos nas bactérias isoladas dos moluscos bivalves. Para esta análise, realizou-se uma análise *a posteriori*, através de um teste *pair-wise*, dividindo as concentrações de *E. coli* em três classes distintas. A classe 1 incluiu todas as amostras de moluscos bivalves cuja contaminação por *E. coli* estava abaixo do nível de detecção da técnica utilizada. A classe 2 incluiu as amostras cuja contaminação era detectável, porém abaixo do limite de classificação “liberada” perante a legislação brasileira (BRASIL, 2012). A classe 3 incluiu todas as amostras cuja contaminação era acima de 230 UFC *E. coli*/100 gramas de polpa e água intervalvar.
4. O efeito da taxonomia e do grupo ecológico ao qual as bactérias pertenciam. Neste sentido, bactérias da família das *Enterobacteriaceae* foram consideradas como derivantes de água de esgoto contaminada com material fecal de animais terrestres e seres humanos; as bactérias das *Vibrionaceae* foram consideradas como espécies próprias do bioma marinho e do microbioma dos moluscos bivalves (PRUZZO; GALLO; CANESI, 2005; VEZZULLI et al., 2017).

A análise permutacional da variância (PERMANOVA) permitiu comparar a resistência aos antibióticos entre os seguintes fatores fixos: 1) a classe das bactérias (*Enterobacteriaceae*, ou *Vibrionaceae*), 2) o lugar de coleta: Arraial do Cabo, ou Búzios, 3) a espécie de molusco bivalve: mexilhão, vieira, ou ostra e 4) o nível de contaminação por *E.coli* (UFC *E. coli*/100 gramas de polpa e água intervalvar). Os valores de P foram obtidos através de testes de permutação (9999) e quando foram encontrados resultados significativos ( $p < 0,05$ ), foram realizadas comparações *post-hoc* através do método *pair-wise*.

A associação entre o perfil de resistência a antibióticos e a classe de bactérias, ou o lugar de coleta foi avaliado utilizando um sistema de escala multidimensional não métrica (nMDS).

Todas as análises multivariadas foram realizadas transformando todos os dados em variáveis binomiais de presença ou ausência, utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard, utilizando o *software PRIMER 6*<sup>11</sup>. Para identificar quais perfis de resistência a antibióticos eram principalmente responsáveis para as diferenças entre as classes de bactérias em cada grupo de amostras foi realizado o procedimento SIMPER.

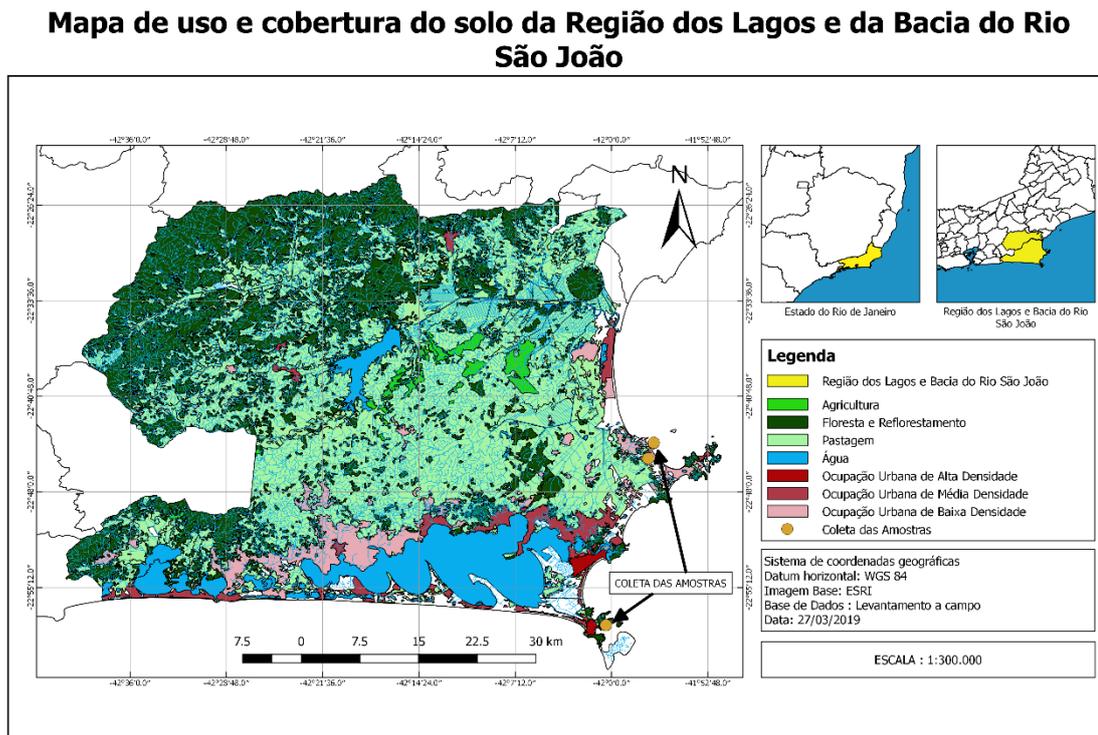
---

<sup>11</sup> [www.primmer-e.com/](http://www.primmer-e.com/)

## 2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.3.1 ANÁLISE DO AMBIENTE E DO USO DO SOLO DA BACIA HIDROGRÁFICA DA REGIÃO DOS LAGOS

A Figura 1 apresenta o uso do solo na bacia hidrográfica da área que foi objeto de estudo.



**Figura 1:** Uso e cobertura do solo na bacia hidrográfica da região dos Lagos

A região dos Lagos é dividida entre 7 municípios: Araruama, Armação de Búzios, Arraial do Cabo, Cabo Frio, Iguaba Grande, São Pedro da Aldeia, e Saquarema. A água doce presente na região deriva da área montanhosa presente na porção mais distante do mar e é composta, principalmente, de dois rios: o rio São João e o rio Una. O Rio São João deriva da represa de Juturnaíba e atravessa principalmente áreas de uso agrícola, de pastagem (ocupadas por bovinos de corte) e pequenas cidades, antes de chegar ao mar. O rio Una nasce perto da cidade de São Vicente de Paula e é conectado ao rio São João através do Canal das Pedras (canal artificial). Devido à presença das montanhas e da cobertura com mata atlântica de seus

encostos, o clima na área do interior da Região dos Lagos e da região praiana pode ser muito diferente.

A Lagoa de Araruama é uma lagoa hipersalina que se encontra entre os municípios de Araruama, Iguaba Grande, São Pedro da Aldeia, Cabo Frio, e Arraial do Cabo (BIDEGAIN DA SILVEIRA PRIMO; FONTANELLE BIZERRIL, 2002). Recebe água doce de vários pequenos rios e riachos que, antes de alcançar a lagoa, atravessam vilarejos e pequenas cidades, recebendo um significativo aporte de águas de esgoto não tratadas e de descargas. Entre estes rios que desaguam na lagoa de Araruama, vale a pena ressaltar o rio Mataruna, que atravessa a própria cidade de Araruama, uma das maiores da região (112.000 moradores).<sup>12</sup> A água deste rio recebe também parte da água pós-tratamento da estação de tratamento de tipo “*wetland*” de Araruama (ÁGUAS DE JUTURNAÍBA, 2010), responsável pelo tratamento dos esgotos da cidade. A lagoa de Araruama se conecta ao mar através do Canal de Itajuru, que desagua no mar na cidade de Cabo Frio, após receber esgotos da região urbana.

A presença humana na região dos Lagos é concentrada na porção mais próxima do mar, ou em volta da Lagoa de Araruama, conforme os dados apresentados no mapa interativo do IBGE que apresentam os resultados do censo populacional de 2010<sup>13</sup>. A região possui uma forte vocação turística, recebendo turismo nacional e internacional principalmente durante os meses de verão (entre novembro e março), mas a presença turística é significativa durante os finais de semana o ano todo. O volume turístico não é certo. Os dados são contrastantes devido ao fato de que muitos turistas não se acomodam em estruturas receptivas formais, ou não é feito sistematicamente o registro de todas as visitas nestas estruturas.

Os dados do IBGE mostram que a gestão do esgoto na região dos Lagos é de baixa qualidade. Menos de 40% do esgoto é tratado e não existe uma divisão na descarga entre águas “brancas” (águas de pia, de cozinha, ou de chuveiro) e águas “pretas” (águas derivadas do uso do vaso sanitário com dejetos de fezes e urinas) havendo, portanto, uma mistura entre águas com material biológico humano e resíduos de produtos de limpeza e higienizantes.

---

<sup>12</sup> [https://www.araruama.rj.gov.br/novo/?pg=dados\\_gerais](https://www.araruama.rj.gov.br/novo/?pg=dados_gerais)

<sup>13</sup> [http://mapasinterativos.ibge.gov.br/atlas\\_ge/brasil1por1.html](http://mapasinterativos.ibge.gov.br/atlas_ge/brasil1por1.html)

Na região dos lagos existem duas estações de tratamento dos esgotos (ETEs): a “*wetland*” de Araruama (22°52′45.36″S; 42°21′54.04″W) e a ETE de Armação dos Búzios (22°46′39.68″S; 41°56′31.51″W).

A pluviosidade da região é baixa (em média, 66 mm de chuva por mês) e é concentrada entre os meses de novembro e março<sup>14</sup>.

### 2.3.2 ANÁLISE AMBIENTAL DA REGIÃO PRÓXIMA AO PONTO DE COLETA DE ARRAIAL DO CABO (A)

A análise ambiental foi realizada conjuntamente com todas as coletas de moluscos bivalves entre outubro 2016 e abril 2017.

A análise ambiental da região da Praia dos Anjos de Arraial do Cabo apresentou uma elevada densidade de população humana na região do centro da cidade de Arraial do Cabo, um porto turístico, um porto industrial para o transporte de cereais (BATISTA et al., 2017) e uma área de preservação ambiental na parte mais próxima ao ponto de coleta das amostras de moluscos bivalves (Figuras 2 e 3). O porto turístico era utilizado constantemente por mais de 200 barcos de turismo e pesca. No porto industrial raramente foram observados navios de transporte de cereais e duas vezes durante o período das coletas um submarino militar estava ancorado a menos de 500 metros da fazenda marinha.

---

<sup>14</sup> <http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=clima/graficosClimaticos>

### Pontos de coleta das amostras no município de Arraial do Cabo-RJ

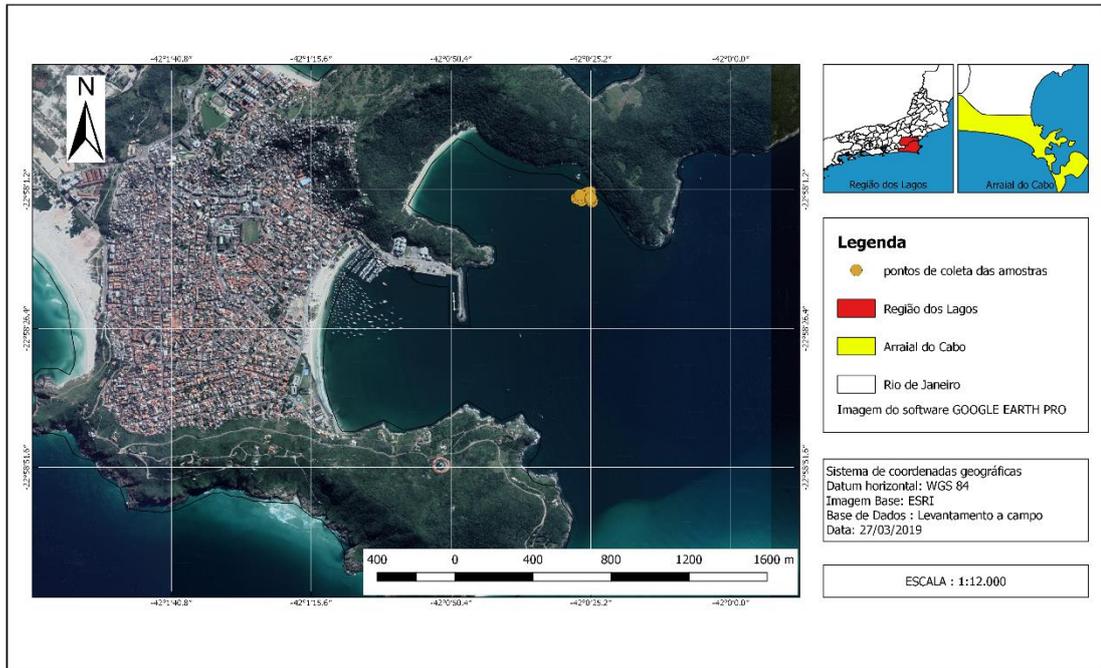
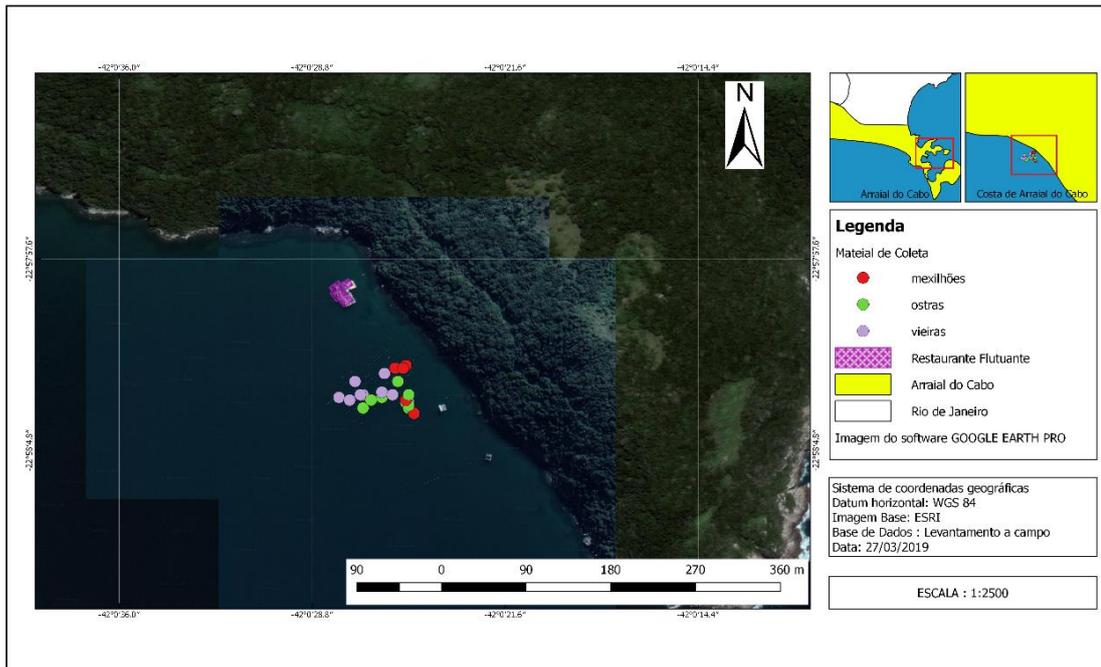


Figura 2: Visão geral do ponto de coleta das amostras em Arraial do Cabo.

### Pontos de coleta das amostras de moluscos bivalves no município de Arraial do Cabo-RJ



**Figura 3:** Localização dos pontos de coleta das amostras de moluscos bivalves divididas por espécies dentro da fazenda marinha que foi objeto de estudo. A imagem ressalta a cobertura de vegetação sem presença antrópica na parte mais próxima aos pontos de coleta.

As correntes marinhas observadas na fazenda marinha foram constantes ao longo de todo o período do experimento, geralmente fracas e provindo de sul-oeste, direção na qual se encontrava a área mais intensamente antropizada. Um curto vídeo no *Youtube*<sup>15</sup> (autoria própria) mostra brevemente o ambiente em volta da fazenda marinha de Arraial do Cabo. Durante a 11ª coleta, realizada no dia 20 de março de 2017, depois de quatro dias de chuva forte, observamos uma forte corrente de sul-oeste e a presença de resíduos de plástico, lixo urbano e hidrocarbonetos na água, na fazenda marinha (Figura 4). Os produtores explicaram que devido às fortes chuvas tinha sido aberta uma comporta de um canal que drena a água das ruas e os esgotos e que deságua em uma das extremidades da Praia dos Anjos, para evitar que a água transbordasse alagando as ruas. Na 12ª coleta, realizada 3 dias depois, a contaminação visível da água tinha desaparecido, evidenciando o elevado fluxo de água na área objeto de estudo.

---

<sup>15</sup> <https://www.youtube.com/watch?v=U6NCBreJNtw>



**Figura 4:** poluição visível por resíduos de lixo, hidrocarbonetos e partículas plásticas na fazenda marinha, em Arraial do Cabo, no dia 20 de março 2017, depois de quatro dias de chuvas intensas. Foto: Andrea Lafisca.

### 2.3.3 ANÁLISE AMBIENTAL DA REGIÃO PRÓXIMA AO PONTO DE COLETA DE ARMAÇÃO DOS BÚZIOS (B)

A análise ambiental foi realizada em conjunto com a coleta das amostras de moluscos bivalves e de água em Armação dos Búzios, em proximidade da “Praia Rasa”, entre outubro de 2016 e abril de 2017.

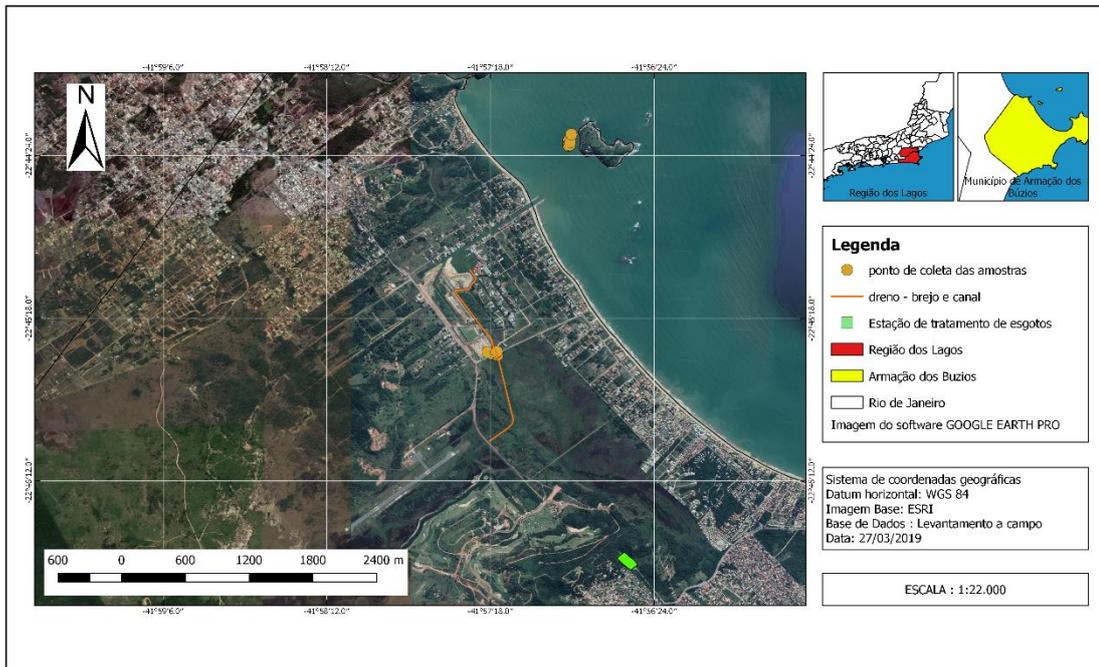
A região apresenta uma área urbana com densidade habitacional entre média e elevada ao longo da praia. As áreas habitadas estão alternadas com terrenos baldios e áreas de restinga, confirmando os dados apresentados no censo IBGE de 2010<sup>16</sup>.

---

<sup>16</sup> <http://mapasinterativos.ibge.gov.br/grade/default.html>

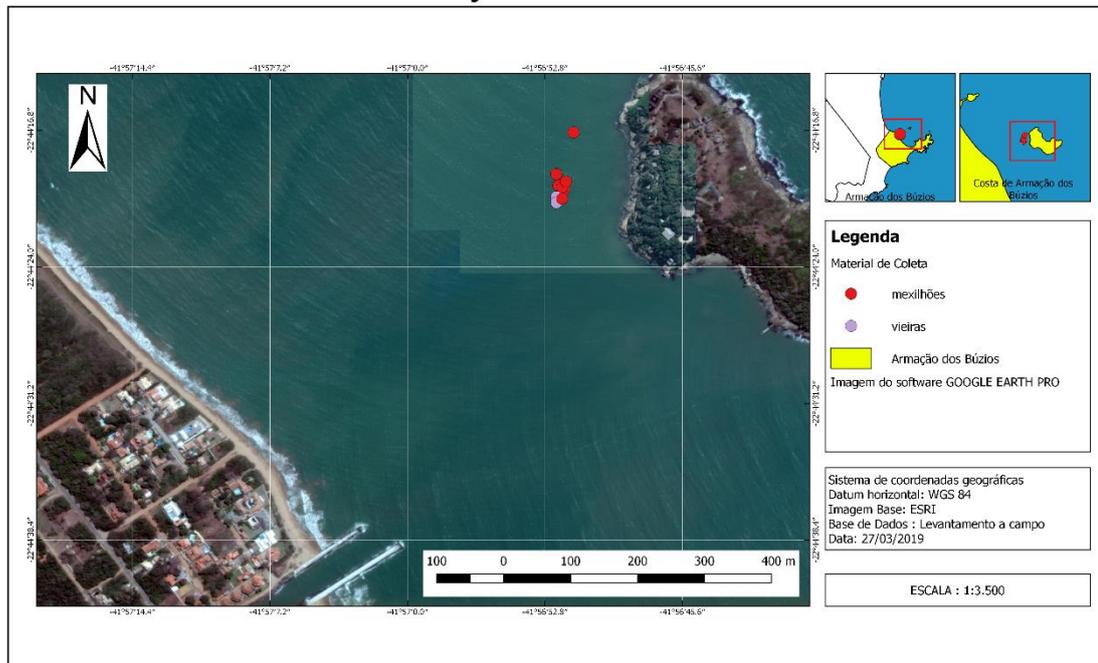
As áreas urbanizadas continuam em sentido norte e sul, ao longo da linha costeira por vários quilômetros. A figura 5 mostra a distribuição das áreas construídas na região do entorno do ponto de coleta. A figura 6 mostra a localização dos pontos de coleta das amostras de mexilhões e vieiras dentro do criatório analisado.

### Pontos de coleta no município de Armação dos Búzios-RJ



**Figura 5:** Distribuição das áreas habitadas do entorno dos pontos de coleta das amostras de moluscos bivalves e de água de esgoto. A área marcada em verde indica o posicionamento da ETE de Búzios. A linha em cor laranja evidencia o trajeto do canal de drenagem de uma área pantanosa onde foram feitas as amostragens de água de esgoto. Este dreno tem continuidade na área da marina.

### Pontos de coleta das amostras de moluscos bivalves no município de Armação dos Búzios-RJ



**Figura 6:** Localização dos pontos de coleta das amostras de moluscos bivalves divididas por espécies dentro da fazenda marinha que foi objeto de estudo. A imagem ressalta a presença da saída do canal da marinha de Praia Rasa.

Os prédios residenciais mais próximos ao ponto de coleta são casas particulares de um ou dois pavimentos utilizados, principalmente, durante o período das férias. Algumas moradias são utilizadas de forma continuada. À distância aproximada de 700 metros da fazenda marinha que produzia moluscos bivalves deságua um canal que conectava uma pequena marina (utilizada por pequenas embarcações, como jet-ski e pequenos barcos de passeio) ao mar. Aos dois lados do canal da marina há casas particulares. Dois vídeos (autoria própria) apresentam o percurso de barco ao longo do canal que liga a marina ao mar<sup>17</sup>.

Durante períodos de chuva o canal da marina drena elevadas quantidades de material em suspensão, mas as constantes correntes marinhas provindo do norte e as diferenças de temperatura e densidades impedem que a água do canal e do mar se misturem, como é visível

<sup>17</sup> <https://www.youtube.com/watch?v=zzmH6mJmWFY>  
<https://www.youtube.com/watch?v=pVXMH6oZ0dl>

em um curto vídeo<sup>18</sup> (autoria própria) realizado após um dia de forte chuva (8ª campanha de coleta) quando, devido a uma falha mecânica do motor do barco não foi possível coletar amostras de moluscos bivalves.

Do outro lado da marina, uma série de canais de águas rasas conectam a marina a uma área de pântano impossível de ser acessada. Estes canais, visíveis no vídeo<sup>19</sup> (autoria própria), entre outros apresentam uma água anóxica com sinais de processos de fermentação e forte cheiro de hidrogênio sulfurado. No ponto onde um destes canais encontra a rua asfaltada (22°45'29.8"S; 41°57'17.3") foram prelevadas as amostras de água, assim como foi descrito no capítulo dos Materiais e Métodos. A área de pântano, visível no mapa da Figura 5, recebe esgoto diretamente da área residencial situada entre o pântano e o mar.

A fazenda marinha é localizada a curta distância (180 metros, aproximadamente, conforme mensurável no programa *GOOGLE EARTH PRO*) de uma ilha, que não era habitada no momento de execução das coletas. O vídeo<sup>20</sup> (autoria própria) apresenta o aspecto da região no entorno da fazenda marinha.

A transparência da água foi sempre baixa, entre 1,0 e 3,0 metros e temperatura constante entre 33,0 e 34,0 °C. As espécies criadas eram mexilhões (*Perna perna*) e uma pequena quantidade de vieiras (*Nodipecten nodosus*). As duas espécies recebiam manuseios e cuidados escassos se apresentando com elevadas incrustações e epibiontes.

**Quadro 9:** síntese das condições ambientais observadas durante as coletas.

---

<sup>18</sup> <https://www.youtube.com/watch?v=TBRYfHYVmmo>

<sup>19</sup> <https://www.youtube.com/watch?v=lk9cBcvnP5M>

<sup>20</sup> <https://www.youtube.com/watch?v=8Mhv9VGXjmw>



5	19/12/2016	A	M	22°58'1.6"	42°0'25.3"	V	C	NO	2,0	SO	1.5	30,0	26,0	6,0	7,8	-	33,0	61,4	6,6	112,20%	36,8	7	21,7	0,4	216,0	50
5	19/12/2016	A	V	22°58'2.6"	42°0'26.2"	V	C	NO	2,0	SO	1.5	30,0	26,0	6,0	8,2	5,0	58,3	5,9	95,10%	35,0	8	23,9	1,5	335,0	5	
5	19/12/2016	A	O	22°58'2.9"	42°0'25.3"	V	C	NO	2,0	SO	1.5	30,0	26,0	6,0	7,8	76,0	58,4	6,1	98,50%	35,1	8	24,0	4,4	393,0	400	
5	19/12/2016	B	M	22°44'19.8"	41°56'51.9"	S	V	L	3,0	N	2.0	32,0	27,0	3,0	8,5	91,0	58,5	6,1	98,30%	35,1	8	24,0	4,3	399,0	5	
5	19/12/2016	B	A	22°44'19.8"	41°56'51.9"	S	V	L	3,0			32,0														
6	03/01/2017	A	M	22°58'3.2"	42°0'25.2"	S	S	Não havia vento	0,0	Não havia corrente	0.0	28,0	27,0	6,0	8,5	125,0	57,9	6,4	100,00%	35,0	5	23,9	2,0	185,0	50	
6	03/01/2017	A	V	22°58'3.2"	42°0'25.2"	S	S	Não havia vento	0,0	Não havia corrente	0.0	28,0	27,0	6,0	8,4	12,0	49,9	6,0	95,40%	35,1	8	24,5	2,5	349,0	5	
6	03/01/2017	A	O	22°58'3.2"	42°0'25.2"	S	S	Não havia vento	0,0	Não havia corrente	0.0	28,0	27,0	6,0	7,9	-	45,0	58,5	6,4	102,80%	35,2	8	24,2	2,5	219,0	5
6	03/01/2017	B	M	22°44'19.1"	41°56'52.2"	S	S	Não havia vento	0,0	N	1.0	34,0	28,0	2,0	8,3	110,0	59,8	6,4	108,20%	35,5	6	20,8	1,1	373,0	5	
6	03/01/2017	B	A	22°45'29.5"	41°57'16.2"	S	S					31,0														
7	16/01/2017	A	M	22°58'3.4"	42°0'25.0"	S	C	O	4,0	O	1.5	27,0	28,0	6,0	8,5	129,0	57,4	6,0	89,30%	36,2	6	24,4	5,1	430,0	100	
7	16/01/2017	A	V	22°58'1.9"	42°0'26.1"	S	C	O	4,0	O	1.5	27,0	28,0	6,0	8,6	133,0	58,1	5,8	89,30%	36,2	5	24,3	4,0	432,0	5	
7	16/01/2017	A	O	22°58'2.9"	42°0'26.6"	S	C	O	4,0	O	1.5	27,0	28,0	6,0	8,5	115,0	60,3	5,9	89,30%	36,2	7	24,4	5,4	429,0	5	
7	16/01/2017	B	A	22°45'29.5"	42°0'25.0"	S	C					31,0														
8	07/02/2017	A	M	22°58'1.0"	42°0'25.7"	S	S	O	1,0	O	1	26,0	28,0	6,0	8,4	127,0	58,7	6,2	99,70%	35,2	8	23,9	1,4	185,0	5	
8	07/02/2017	A	V	22°58'2.7"	42°0'25.8"	S	S	O	1,0	O	1	26,0	28,1	6,0	7,8	25,0	58,9	6,0	96,40%	35,3	9	24,0	1,5	349,0	5	
8	07/02/2017	A	O	22°58'3.0"	42°0'25.3"	S	S	O	1,0	O	1	26,0	27,8	6,0	8,1	49,0	58,4	6,4	102,80%	35,0	8	24,0	2,3	219,0	5	
8	07/02/2017	B	M	22°44'20.3"	41°56'52.2"	S	S	L	3,0	N	NC	31,0	32,0	2,0	8,4	116,0	59,7	6,5	109,20%	35,8	5	20,8	1,1	373,0	5	
8	07/02/2017	B	V	22°44'20.3"	41°56'52.2"	S	S	L	3,0	N	NC	31,0	30,5	2,0	8,4	131,0	60,3	4,9	82,20%	36,2	1	22,6	4,4	124,0	5	





#### 2.3.4 AMOSTRAS COLETADAS

A partir destas coletas foram isoladas e estocadas 867 cepas bacterianas das famílias *Enterobacteriaceae* (principalmente *E. coli*, ou *Enterobacter* spp.) ou *Vibrionaceae* (principalmente *Vibrio* spp.). As amostras foram identificadas individualmente com um código alfa-numérico contendo informações referentes à origem das amostras: a identificação do número da campanha de coleta (1 a 13), o lugar de coleta (A por Arraial do Cabo, B por Armação dos Búzios), a matriz da qual foi isolada a cepa bacteriana (A por água, M por mexilhões, V por vieiras, e O por ostras), a família de bactérias (V para *Vibrionaceae*, E por *Enterobacteriaceae*) e finalmente um número para identificar o número da amostra bacteriana. Conforme este esquema, por exemplo, a amostra “11AME10” foi coletada na 11ª campanha (11), em Arraial do cabo (A), de amostra de mexilhões (M), e é a 10ª cepa de Enterobactérias isolada (E10).

Não foi isolada nenhuma cepa de *Salmonella* spp. das amostras coletadas.

#### 2.3.5 QUANTIFICAÇÃO DE *ESCHERICHIA COLI* $\beta$ -GLUCURONIDASE-POSITIVOS

Foram realizadas 52 contagens de *E. coli*. Entre estas, 43 apresentaram uma concentração menor do que o limite inferior de detecção da metodologia utilizada, indicando que os dois sítios de coleta de amostras possuem um ambiente relativamente estável e de boa qualidade para a produção de moluscos bivalves destinados ao consumo humano. Não foram observadas diferenças significativas de concentração entre as diferentes espécies de moluscos bivalves testados, nem entre os lugares ( $p > 0,05$ ).

Entre as coletas, a 11ª, realizada após quatro dias de chuvas intensas na região, apresentou resultados significativamente maiores do que as demais (Quadro 10), com concentrações de até 4.700 UFC *E. coli*/100 g de polpa de molusco bivalve. A coleta sucessiva, realizada três dias depois, novamente mostrou contaminação abaixo do limite de detecção, indicando uma rápida depuração dos moluscos bivalves nos sítios estudados.

Este dado da rápida depuração dos moluscos é de extrema importância com relação à saúde pública e à saúde dos consumidores. Para avaliar este dado precisamos considerar diferentes aspectos, como a espécie de molusco bivalve, a taxa de filtração por hora ou por dia das diferentes espécies, o estado de saúde dos animais estudados e a presença de estresses ambientais.

A taxa de filtração dos moluscos é altamente variável, dependendo do tamanho do animal, da temperatura da água, e da disponibilidade de fitoplâncton (DABROWSKI et al., 2014). Os mesmos autores, estudando o mexilhão *Mytilus edulis*, descrevem uma taxa de filtração compreendida entre 0,30 e 2,33 litros/grama de molusco/hora, sendo a taxa de filtração durante os meses mais quentes menor do que durante os meses mais frios (o peso médio do corpo de um mexilhão é de 5 a 7 gramas). Porém, da taxa de filtração ser menor, os autores observaram uma maior tendência à retenção de *E. coli* durante os meses mais quentes. Outros autores, trabalhando sempre com espécies de climas temperados, descrevem entre 8 e 12 litros de água marinha por hora de filtração. Oliveira et al. (2011) descrevem uma taxa de filtração entre 20 e 100 litros de água por dia (OLIVEIRA et al., 2011). O aumento da captação e da retenção de *E. coli* nos mexilhões é devido, também, aos hábitos alimentares deste grupo de espécies, pois eles são filtradores não seletivos, como evidenciado por Srisunont e Babel (2015) em suas experiências sobre a retenção e eliminação de nutrientes no mexilhão verde *Perna viridis* (SRISUNONT; BABEL, 2015). Com relação à seleção das partículas de alimento é importante ressaltar a ampla revisão de Evan, Ward e Shumway (2004) sobre as escolhas alimentares dos moluscos bivalves. Os autores observaram como o mexilhão *Perna perna* consegue capturar e reter partículas de látex de 0,46 µm de diâmetro, ou seja, do tamanho de uma bactéria e que a mesma preferência para partículas alimentares de tamanho reduzido está presente também nas ostras *Crassostrea gigas*. Os autores também observaram como o tamanho das partículas de alimento não é o único parâmetro que influencia a retenção. Outros elementos, como a adesividade superficial das partículas, a carga eletrostática superficial do material ingerido, a movimentação das partículas ingeridas, ou a quantidade de material orgânico em suspensão também afetam a retenção e ingestão. Igualmente, em caso de escassez de nutrientes, os moluscos bivalves preferem se alimentar das partículas que possuem mais material orgânico do que inorgânico, especialmente de fitoplâncton mais do que zooplâncton (EVAN WARD; SHUMWAY, 2004). Estas observações são extremamente

importantes para definir que é difícil prever a taxa de filtração de espécies de moluscos bivalves, sem considerar todas as variáveis no ambiente que os circunda, e que bactérias de interesse sanitário podem aderir às partículas de material orgânico ou inorgânico e que, portanto, a seletividade dos moluscos bivalves na alimentação afeta significativamente o microbiota dos moluscos e a presença de bactérias de interesse sanitário (TRABAL FERNÁNDEZ et al., 2014). Assim como é difícil avaliar as taxas de contaminação dos moluscos bivalves, é igualmente complexo definir as taxas de depuração dos moluscos, ou seja, a velocidade com a qual os moluscos eliminam as bactérias que ingeriram com a alimentação. Aqui, também, concorrem muitos fatores associados ao molusco bivalve e ao seu estado de saúde. Com relação às variáveis ligadas às bactérias, precisa considerar que as *Enterobacteriaceae* são bactérias que normalmente vivem em um ambiente completamente diferente daquele marinho, onde se encontram quando são filtradas pelos moluscos bivalves. Entre os elementos que influenciam a sobrevivência deste tipo de bactérias no ambiente marinho, a afinidade com as estruturas do corpo do molusco bivalve (principalmente o intestino), a capacidade de sobrevivência na água marinha (em associação ou não com fitoplâncton, zooplâncton, material inorgânico, fezes de aves marinhas ou plumas de águas de esgoto) (HUGHES, 2008; MORRISON et al., 2011; PERKINS et al., 2014; JOZÍĆ; ŠOLIĆ, 2018). Estresses de temperatura, pH, osmolaridade, presença de exposição direta aos raios UV solares são todos elementos que diminuem a sobrevivência das *Enterobacteriaceae* no ambiente marinho (ROZEN; BELKIN, 2005; HUGHES, 2008). O efeito da temperatura é ressaltado, também, em outro estudo sobre a sobrevivência de *E. coli* no ambiente marinho que observa como com temperaturas de 30°C (como aquelas observadas no nosso estudo) esta pode ser menor de um dia (BLAUSTEIN et al., 2013). Com relação a elementos associados ao ambiente, os principais elementos que afetam a contaminação de moluscos bivalves são contaminações sucessivas por bactérias de origem fecal de um lado, e as características físicas e químicas da água do outro. Quanto mais as características da água mudam, tanto mais haverá estresse para os moluscos bivalves e menor capacidade de resistir a contaminação por bactérias de espécies diferentes daquelas presentes no microbiota normal.

Os nossos dados mostram que a depuração dos moluscos bivalves e a eliminação das *Enterobacteriaceae* foram muito rápidas, como evidenciado no Quadro 10. Em 3 dias, após o retorno às condições ambientais “normais” para os lugares de estudo, houve uma redução de

mais de 3 ordens logarítmicos da concentração de *Escherichia coli*. Este dado é de extrema importância do ponto de vista sanitário, pois demonstra que em casos de fortes chuvas é crucial bloquear imediatamente a comercialização de moluscos bivalves da região, e que esta pode ser retomada uma vez que as condições ambientais voltam dentro dos padrões do local de coleta. Este resultado é confirmado comparando os resultados microbiológicos com o clima nas 48 horas anteriores à data de coleta (quadro 10). Todas as amostras que apresentavam uma concentração de *E. coli* acima dos limites inferiores de detecção da técnica de contagem utilizada eram associadas ao tempo chuvoso nos dois dias anteriores à data de coleta.

**Quadro 10:** Concentração de *E. coli*  $\beta$ -glucuronidase positivos em amostras de moluscos bivalves expressa como UFC/100 gramas de polpa de molusco e água inter-valvar.

NÚMERO DA COLETA	DATA	A					B			
		M	O	Vi	Clima no dia da coleta	Clima nas 48 horas anteriores	M	Vi	Clima no dia da coleta	Clima nas 48 horas anteriores
1	12/10/2016	5	5	5	S	S	5	N		
2	25/10/2016	5	5	5	R	V	5	N	R	V
3	8/11/2016	200	5	150	V	R	5	N	V	R
4	21/11/2016	5	5	5	S	V	5	N	S	V
5	19/12/2016	50	<b>400</b>	5	V	R	5	N	S	V
6	3/1/2017	50	5	5	S	S	5	N	S	S
7	16/1/2017	100	5	5	S	R	N	N	S	R
8	7/2/2017	5	5	5	S	S	5	5	S	S
9	20/2/2017	5	5	5	S	S	5	5	S	S
10	10/3/2017	5	5	5	S	S	5	N	S	S
11	20/3/2017	<b>1,800</b>	<b>350</b>	<b>4,700</b>	R	R	<b>300</b>	N	S	R
12	23/3/2017	5	5	5	S	S	5	N	S	S
13	27/4/2017	5	5	5	S	S	5	N	S	s

LEGENDA: A: estação de coleta das amostras de Arraial do Cabo; B: estação de coleta das amostras de Armação dos Búzios; M: Mexilhões (*Perna perna*); O: ostras (*Crassostrea gigas*); Vi: vieiras (*Nodipecten nodosus*); S: dia de sol; R: tempo chuvoso; C: dia nublado; V: dia com tempo variável. N: coleta não realizada. As concentrações bacterianas evidenciadas em negrito estão acima do padrão brasileiro de coleta "liberada" conforma instrução Normativa Interministerial 7/2012 (BRASIL, 2012)

A análise da componente principal (PCA) aplicada para evidenciar o efeito das variáveis ambientais “intensidade do vento”, “temperatura do ar”, “temperatura da água” e “transparência” não evidenciou correlação significativa com a concentração de *E. coli* ( $p > 0,05$ ). De toda forma houve uma correlação positiva ( $p < 0,05$ ) com a intensidade do vento, mantendo fixa a direção da corrente. A PCA aplicada ao estudo das outras variáveis ambientais também não evidenciou correlações significativas com a concentração de *E. coli*.

#### 2.3.6 PERFIL DE RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS

Foram realizados 294 testes de resistência aos antibióticos, escolhendo aleatoriamente três cepas bacterianas de cada uma das duas classes de bactérias para cada amostra de molusco bivalve e água de cada campanha de amostragem. Devido à peculiaridade da concentração de *E. coli* evidenciados na 11ª coleta, todas as bactérias isoladas nas campanhas 11, 12 e 13 foram testadas individualmente. A análise dos dados de prevalência da resistência aos antibióticos considerou separadamente o comportamento das bactérias perante cada antibiótico utilizado e o comportamento das bactérias perante os antibióticos divididos em classes:

- AMC e AMP: Beta-lactâmicos
- CFL e CFO: Cefalosporinas
- CIP e NOR: Quinolons
- FLF e CLO: Clorfenicóis
- SUT: Cotrimoxazol: sulfamídico + Trimetoprim
- GEN e TOB: Aminoglicosídeos
- TET: Tetraciclina

O Quadro 11 mostra a distribuição da resistência múltipla entre as bactérias isoladas de diferentes classes de amostras. A análise destes dados através do SIMPER evidenciou diferenças altamente significativas entre os perfis de resistência de *Enterobacteriaceae* e *Vibrionaceae* ( $p = 0,0001$ ), mas não evidenciou diferenças significativas entre as outras classes consideradas, como o lugar de coleta, ou a espécie de molusco bivalve analisada. Analisando o quadro é interessante observar a mudança na prevalência de cepas de bactérias resistentes a 4 ou mais classes de antibióticos entre a coleta 11 de um lado, e as sucessivas coletas 12 e

13 do outro. É possível observar como nas coletas 12 e 13 diminui significativamente a prevalência das cepas altamente resistentes, em comparação com a coleta 11. Mais em detalhe, na coleta 11 estão presentes 23 cepas bacterianas resistentes a 4 famílias diferentes de antibióticos. Já nas sucessivas coletas 12 e 13 o número de cepas bacterianas deste grupo cai respectivamente para 1 e 0. Ao contrário, o número de cepas bacterianas resistentes a duas famílias tende a crescer: de 16 na coleta 11, a 27, na 12, a 31 na 13.

**Quadro 11:** análise da distribuição da resistência múltipla entre diferentes classes de amostras analisadas.

CLASSE	N	0		1		2		3		4		5		6		7	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
GERAL	298	70	23,49	49	16,44	101	33,89	33	11,07	40	13,42	4	1,34	0	0	1	0,34
VIBRIONACEAE	108	12	11,11	12	11,11	21	19,44	27	25,00	35	32,41	1	0,93	0	0	0	0,00
ENTEROBACTERIACEAE	188	57	30,32	37	19,68	79	42,02	6	3,19	5	2,66	3	1,60	0	0	1	0,53
OSTRAS	56	12	21,43	8	14,29	22	39,29	7	12,50	6	10,71	1	1,80	0	0	0	0,00
VIEIRAS	62	7	11,29	9	14,52	25	40,32	7	11,29	13	20,97	1	1,61	0	0	0	0,00
MEXILHÕES	115	23	20,00	14	12,17	45	39,13	17	14,78	16	13,91	0	0,00	0	0	0	0,00
ÁGUA	65	28	43,08	18	27,69	9	13,85	2	3,08	5	7,69	2	3,08	0	0	1	1,54
ARRAIAL	169	34	20,12	23	13,61	65	38,46	20	11,83	25	14,79	2	1,18	0	0	0	0,00
BÚZIOS	129	36	27,91	26	20,16	36	27,91	13	10,08	15	11,63	2	1,55	0	0	1	0,78
COLETA 10	25	10	40,00	2	8,00	1	4,00	2	8,00	10	40,00	0	0,00	0	0	0	0,00
COLETA 11	72	11	15,28	14	19,44	16	22,22	5	6,94	23	31,94	2	2,78	0	0	1	1,39
COLETA 12	47	5	10,64	11	23,40	27	57,45	3	6,38	1	2,13	0	0,00	0	0	0	0,00
COLETA 13	47	9	19,15	7	14,89	31	65,96	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0	0	0,00
MEXILHÕES ARRAIAL	55	15	27,27	21	38,18	21	38,18	7	12,73	6	10,91	0	0,00	0	0	0	0,00
MEXILHÕES BÚZIOS	60	8	13,33	24	40,00	24	40,00	10	16,67	10	16,67	0	0,00	0	0	0	0,00
MOLUSCOS BÚZIOS	64	8	12,50	27	42,19	27	42,19	11	17,19	10	15,63	0	0,00	0	0	0	0,00

LEGENDA: GERAL: conjunto de todas as amostras que foram analisadas; *VIBRIONACEAE* e *ENTEROBACTERIACEAE*: amostras de bactérias da Família *Vibrionaceae* e *Enterobacteriaceae*; OSTRAS, VIEIRAS e MEXILHÕES: cepas bacterianas isoladas de cada uma espécie de molusco bivalve; ÁGUA: cepas bacterianas isoladas da água de esgoto em armação dos Búzios; ARRAIAL: conjunto das cepas bacterianas isoladas das diferentes espécies de moluscos bivalves de Arraial do Cabo; BÚZIOS: conjunto das cepas bacterianas isoladas da água, dos mexilhões e das vieiras prelevados em Armação dos Búzios; 10-11-12 e 13: conjunto das bactérias isoladas durante as coletas 10 (10/3/2017), 11 (20/3/2017), 12 (23/3/2017) e 13 (27/4/2017); MEXILHÕES ARRAIAL e MEXILHÕES BÚZIOS cepas bacterianas isoladas de mexilhões nos dois lugares diferentes de coleta; MOLUSCOS BÚZIOS: cepas bacterianas isoladas de mexilhões e vieiras em Búzios.

A análise dos perfis de resistência a antibióticos evidenciou 87 diferentes perfis de resistência. Esta diferença é menor do resultado descrito em um trabalho que utiliza a mesma abordagem de análise de perfis de resistência em cepas de *E. coli* isoladas de água marinha, fezes de gaivotas e esgotos em Portugal (ALVES et al., 2014). Coerentemente, com o descrito no mesmo artigo, a maioria dos perfis de resistência foi observada uma única vez. O Quadro 12 apresenta os perfis de resistência a antibióticos que se apresentaram mais de uma vez entre as bactérias isoladas. Observando o quadro, é possível evidenciar como os perfis de resistência ao maior número de antibióticos eram concentrados entre as *Vibrionaceae* e entre as bactérias isoladas no 11º dia de coleta, justamente quando as concentrações de *E. coli* eram mais altas. Este evento de maior contaminação por *E. coli* representou um ponto de maior diversidade de perfis de resistência aos antibióticos.

**Quadro 12:** Distribuição de perfis fenotípicos repetidos de resistência a antibióticos entre cepas bacterianas isoladas de água e moluscos bivalves.

FENÓTIPO	NÚMERO DE RESISTÊNCIAS	DE	NÚMERO DE REPETIÇÕES	DISTRIBUIÇÃO DO FENÓTIPO
SENSÍVEL A TODOS OS ANTIBIÓTICOS	0		43	A maioria das cepas pertence à classe "E". Só 3 cepas pertencem à classe "V"
NOR	1		10	Presente nas classes "V" e "E"
CFO	1		4	11V, 12V
CFL	1		4	E
AMP	1		4	E
CFL, TOB	2		11	E
CFL, CFO	2		5	5, 7, e 13 E; 11 V
AMP, CFL	2		2	12V
AMC, NOR	2		3	4BAV
AMC, CFL	2		2	E
CFL, TET, TOB	3		2	11 V
CFL, CFO, TET	3		2	11E
AMP, CFL, TET	3		5	11, e 12 E
AMP, CFL, NOR	3		5	V

AMP, CFL, TET	3	3	12BME
AMP, CFL, CIP	3	3	11BMV
AMC, CFL, TET	3	4	12AE, e 13AE
AMC, CFL, CFO	3	19	E
AMP, CFO, CLO, TET	4	2	11E
AMP, CFL, CIP, NOR	4	4	V
AMP, CFL, CIP, TOB	4	2	11V e 12V
AMP, CFL, CFO, NOR	4	4	V
AMC, CFL, CLO, TET	4	2	8BVE
AMC, CFL, CFO, TET	4	25	11E, 12E, e 13E
AMC, CFL, CFO, CIP	4	2	10AOE
AMC, AMP, CFL, CFO	4	6	E
AMP, CFL, CFO, TOB, NOR	5	2	V
AMP, CFL, CFO, CIP, NOR	5	5	V
AMP, CFL, CFO, CIP, TET	5	3	V
AMC, AMP, CFL, CLO, TET	5	2	12AME
AMC, AMP, CFL, CFO, TET	5	11	11E, 12E, e 13E
AMC, AMP, CFL, CFO, CIP, NOR	6	2	4BMV
AMC, AMP, CFL, CFO, CIP, TOB, NOR	7	7	V
AMC, AMP, CFL, CFO, CIP, GEN, TOB	7	6	11V
AMC, AMP, CFL, CFO, CIP, GEN, TOB, NOR	8	11	10V, e 11V

LEGENDA: AMC: Amoxicilina e ácido Clavulânico, AMP: Ampicilina, CFL: Cefalotina, CFO: Cefoxitina, CIP: Ciprofloxacina, CLO: Cloranfenicol, SUT: Cotrimoxazol, GEN: Gentamicina, TET: Tetraciclina, TOB: Tobramicina, FLF: Florfenicol, NOR: Norfloxacin. Na coluna “Distribuição do fenótipo” os números representam o número da campanha de amostragem como descrito no quadro 9; as letras “A” e “B” representam as estações de amostragem (A: Arraial do Cabo, B: Armação dos Búzios); as letras “E” e “V” representam a classe de bactéria analisada: *Enterobacteriaceae* (E) ou *Vibrionaceae* (V).

O Quadro 13 apresenta a distribuição da prevalência da resistência a cada classe de antibióticos nos diferentes agrupamentos de amostras que foram avaliados. A análise do quadro permite evidenciar como existe uma variação significativa na prevalência da resistência entre *Enterobacteriaceae* e *Vibrionaceae* (tetraciclina, quinolons, aminoglicosídeos e cotrimoxazol), e entre a água de esgoto e as amostras de moluscos bivalves (beta-

lactâmicos, cefalosporinas, clorfenicol e tetraciclina). Não foi observada diferença significativa na prevalência da resistência entre bactérias isoladas de moluscos bivalves de espécies diferentes, nem entre os mexilhões isolados em Arraial do Cabo e Armação dos Búzios. Diferenças significativas, porém, foram observadas comparando as bactérias isoladas nas coletas 11, 12 e 13. Na coleta 11 foi observado um aumento da prevalência de cepas bacterianas resistentes à tetraciclina e cotrimoxazol (ambos os genes presentes quase exclusivamente em *Enterobacteriaceae*), e um aumento da prevalência da resistência ao clorfenicol, que era mais frequente nas bactérias da água de esgoto do que nas bactérias isoladas de moluscos bivalves. Nas duas coletas seguintes, a 12 e a 13, foi possível observar uma significativa redução da prevalência da resistência aos quinolons, clorfenicol, cotrimoxazol, aminoglicosídeos e tetraciclina. Só beta-lactâmicos e cefalosporinas mantiveram quase inalterada a prevalência da resistência. Interessante observar como as cepas bacterianas resistentes ao clorfenicol são presentes com maior frequência em água de esgoto, e aquelas resistentes ao cotrimoxazol e tetraciclina, em amostras de *Enterobacteriaceae*. A prevalência da resistência às cefalosporinas não sofreu modificações significativas e, ao contrário, a prevalência da resistência aos beta-lactâmicos cresceu entre a 11ª e a 12ª coleta de amostras.

**Quadro 13:** prevalência da resistência a diferentes classes de antibióticos entre as diferentes classes de amostras estudadas. GERAL: conjunto de todas as amostras que foram analisadas.

CLASSE	N	AMC + AMP		CFL + CFO		CIP + NOR		FLF + CLO		SUT		GEN + TOB		TET	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
GERAL	298	181	60,74	199	66,78	80	26,85	4	1,34	10	3,36	56	18,79	10	3,36
VIBRIONACEAE	108	76	70,37	87	80,56	61	56,48	1	0,93	1	0,93	53	49,07	1	0,93
ENTEROBACTERIACEAE	188	104	55,32	111	59,04	19	10,11	3	1,60	9	4,79	3	1,60	9	4,79
OSTRAS	56	33	58,93	41	73,21	14	25,00	1	1,79	2	3,57	10	17,86	2	3,57
VIEIRAS	62	46	74,19	52	83,87	23	37,10	0	0,00	1	1,61	15	24,19	1	1,61
MEXILHÕES	115	78	67,83	81	70,43	35	30,43	0	0,00	2	1,74	21	18,26	2	1,74
ÁGUA	65	24	36,92	25	38,46	8	12,31	3	4,62	5	7,69	10	15,38	5	7,69
ARRAIAL	169	106	62,72	124	73,37	51	30,18	1	0,59	5	2,96	33	19,53	5	2,96
BÚZIOS	129	75	58,14	75	58,14	29	22,48	3	2,33	5	3,88	23	17,83	5	3,88
10	25	14	56,00	14	56,00	12	48,00	0	0,00	0	0,00	10	40,00	0	0,00
11	72	39	54,17	51	70,83	39	54,17	2	2,78	7	9,72	26	36,11	7	9,72
12	47	37	78,72	35	74,47	4	8,51	0	0,00	0	0,00	3	6,38	0	0,00
13	47	31	65,96	37	78,72	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	2,13	0	0,00

MEXILHÕES ARRAIAL	55	31	56,36	35	63,64	15	27,27	0	0,00	2	3,64	8	14,55	2	3,64
MEXILHÕES BÚZIOS	60	47	78,33	46	76,67	20	33,33	0	0,00	0	0,00	13	21,67	0	0,00
MOLUSCOS BÚZIOS	64	51	79,69	50	78,13	21	32,81	0	0,00	0	0,00	13	20,31	0	0,00

LEGENDA: *VIBRIONACEAE* e *ENTEROBACTERIACEAE*: amostras de bactérias da Família *Vibrionaceae* e *Enterobacteriaceae*; OSTRAS, VIEIRAS e MEXILHÕES: cepas bacterianas isoladas de cada uma espécie de molusco bivalve; ÁGUA: cepas bacterianas isoladas da água de esgoto em Armação dos Búzios; ARRAIAL: conjunto das cepas bacterianas isoladas das diferentes espécies de moluscos bivalves de Arraial do Cabo; BÚZIOS: conjunto das cepas bacterianas isoladas da água, dos mexilhões e das vieiras prelevados em Armação dos Búzios; 10-11-12 e 13: conjunto das bactérias isoladas durante as coletas 10 (10/3/2017), 11 (20/3/2017), 12 (23/3/2017) e 13 (27/4/2017); MEXILHÕES ARRAIAL e MEXILHÕES BÚZIOS cepas bacterianas isoladas de mexilhões nos dois lugares diferentes de coleta; MOLUSCOS BÚZIOS: cepas bacterianas isoladas de mexilhões e vieiras em Búzios.

Um outro ponto a ser ressaltado é a diferença na prevalência da resistência a antibióticos de uso humano e de uso veterinário. Para esta avaliação precisamos comparar a resistência aos quinolons ciprofloxacina (de uso humano) e norfloxacina (de uso veterinário em bovinos). A prevalência geral da resistência à ciprofloxacina é de 23,49%, contra 2,36% da norfloxacina. A importância da exposição a resíduos do antibiótico de uso humano é comprovada observando a diferença de prevalência da resistência entre bactérias isoladas de Arraial do Cabo (onde a densidade de população é alta) e Armação dos Búzios (onde a densidade de população é de média a baixa), respectivamente 26,04% e 20,16%. Ao contrário, a resistência à norfloxacina apresenta uma prevalência maior em Armação dos Búzios do que em Arraial do Cabo (3,10% e 1,18%). A análise dos dados também mostra o papel da água como veículo de bactérias resistentes a antibióticos de uso veterinário, principalmente para a norfloxacina (as áreas de pastagem mais próximas do córrego que foi analisado eram utilizadas para a produção de gado de corte). A comparação dos perfis de resistência entre as coletas 11, 12 e 13 mostra como a prevalência da resistência a ambas as drogas diminui significativamente entre a coleta 11 e as sucessivas (Quadro 14).

Análises semelhantes podem ser realizadas comparando a resistência a FLF (antibiótico de uso veterinário) e CLO (de uso humano). Igualmente à NOR, o FLF é presente com maior frequência nas amostras de água e naquelas derivadas de Búzios comparadas com aquelas de Arraial do Cabo. No caso da resistência aos dois antibióticos desta classe, de forma semelhante a quanto observado anteriormente na comparação entre CIP e NOR, a comparação da

prevalência da resistência entre as coletas 11, 12 e 13 mostra como a prevalência da resistência a ambas as drogas diminui significativamente entre a coleta 11 e as sucessivas (Quadro 14).

**Quadro 14:** prevalência da resistência a ciprofloxacina (CIP), norfloxacina (NOR), clorfenicol (CLO) e florfenicol (FLF) entre as diferentes classes de amostras estudadas.

	CIP		NOR		CLO		FLF	
	N	%	N	%	N	%	N	%
<b>GERAL</b>	70	23,49	6	2,01	10	3,36	4	1,34
<b>VIBRIONACEAE</b>	56	51,85	2	1,85	3	2,78	1	0,93
<b>ENTEROBACTERIACEAE</b>	14	7,45	4	2,13	7	3,72	3	1,60
<b>OSTRAS</b>	14	25,00	2	3,57	0	0,00	1	1,79
<b>VIEIRAS</b>	21	33,87	0	0,00	2	3,23	0	0,00
<b>MEXILHÕES</b>	28	24,35	0	0,00	5	4,35	0	0,00
<b>ÁGUA</b>	7	10,77	4	6,15	3	4,62	3	4,62
<b>ARRAIAL</b>	44	26,04	2	1,18	4	2,37	1	0,59
<b>BÚZIOS</b>	26	20,16	4	3,10	6	4,65	3	2,33
<b>11</b>	29	40,28	3	4,17	4	5,56	2	2,78
<b>12</b>	4	8,51	0	0,00	3	6,38	0	0,00
<b>13</b>	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
<b>MEXILHÕES ARRAIAL</b>	10	18,18	0	0,00	4	7,27	0	0,00
<b>MEXILHÕES BÚZIOS</b>	18	30,00	0	0,00	1	1,67	0	0,00
<b>MOLUSCOS BÚZIOS</b>	19	29,69	0	0,00	4	6,25	0	0,00

LEGENDA: GERAL: conjunto de todas as amostras que foram analisadas; *VIBRIONACEAE* e *ENTEROBACTERIACEAE*: amostras de bactérias da Família *Vibrionaceae* e *Enterobacteriaceae*; OSTRAS, VIEIRAS e MEXILHÕES: cepas bacterianas isoladas de cada uma espécie de molusco bivalve; ÁGUA: cepas bacterianas isoladas da água de esgoto em armação dos Búzios; ARRAIAL: conjunto das cepas bacterianas isoladas das diferentes espécies de moluscos bivalves de Arraial do Cabo; BÚZIOS: conjunto das cepas bacterianas isoladas da água, dos mexilhões e das vieiras prelevados em Armação dos Búzios; 11-12 e 13: conjunto das bactérias isoladas durante as coletas 11 (20/3/2017), 12 (23/3/2017) e 13 (27/4/2017); MEXILHÕES ARRAIAL e MEXILHÕES BÚZIOS cepas bacterianas isoladas de mexilhões nos dois lugares diferentes de coleta; MOLUSCOS BÚZIOS: cepas bacterianas isoladas de mexilhões e vieiras em Búzios.

Uma análise mais aprofundada das características de resistência aos antibióticos deve considerar também as resistências intrínsecas de algumas espécies bacterianas aos antibióticos utilizados. As espécies *Enterobacter aerogenes* e *E. cloacae*, por exemplo, são

intrinsecamente resistentes aos antibióticos AMC, AMP, CFL e CFO (entre aqueles que foram utilizados na pesquisa) (EUCAST, 2016b).

A análise da resistência das cepas destas bactérias encontradas confirma parcialmente estes dados: das 33 cepas identificadas como *Enterobacter* spp., a porcentagem de resistência a estes antibióticos foi: AMC: 84,8%; AMP: 21,3%; CFL: 90,9% e CFO: 88,1%.

As mesmas resistências intrínsecas são descritas para a espécie *Citrobacter freundii*. A única cepa desta espécie (12AME5) apresentou um comportamento concorde com a espécie, mostrando resistência a AMC, AMP, CFL e CLO.

Diferentemente do quanto esperado, *Proteus mirabilis* foi identificado uma única vez (12BMV42), mas contrariamente do quanto previsto (EUCAST, 2016b), não apresentou resistência (intrínseca) à TET, mas sim a AMP e CFL (que seria esperado se a espécie fosse *P. vulgaris*).

Também as cepas de *Serratia* spp. isoladas se comportaram diferentemente do quanto esperado. Conforme Eucast (2016b) era esperada uma resistência intrínseca para os antibióticos AMP, AMC, CFL, CFO e TET (*S. marcescens*). Os cinco espécimes isolados pertencentes a este gênero mostraram resistência a AMP (*S. odorifera*), CFL (2 cepas de *S. marcescens*) e TET (2 cepas de *S. marcescens*, 1 de *S. odorifera*). Nenhuma cepa foi resistente a CFL ou CFO.

A única cepa de *Klebsiella* spp. que foi encontrada (13BME7) foi resistente a AMC, CFL e CFO. Conforme Eucast (2016b), *K. pneumoniae*, e *K. oxytoca* possuem resistência intrínseca à AMP, mas não aos antibióticos testados, sugerindo que esta resistência seja devida a mecanismos diferentes.

Estes resultados de *Serratia* spp., *Proteus* spp. e *Klebsiella* spp. são de interesse clínico animal e humano. Os padrões de resistência a antibióticos descritos por Eucast (2016b) são derivados de análises de cepas clínicas e não ambientais. Cepas diferentes, ambientais e clínicas possuem comportamento diferente frente aos antimicrobianos, com base no seu conteúdo genético, tanto cromossômico como plasmidial. Uma infecção com cepas destas bactérias derivadas do ambiente marinho, portanto, poderia requerer cuidados especiais na escolha dos antibióticos a serem usados, além dos padrões clínicos já utilizados normalmente.

Com relação à resistência a antibióticos das bactérias do gênero *Vibrio*, a espécie mais frequentemente encontrada foi *V. alginolyticus* (14 cepas identificadas nas coletas 11 e 12). A prevalência das resistências aos antibióticos nas cepas desta espécie foi: AMC: 64,29%; AMP: 100%; CFL: 92,86%; CFO: 78,57%; CIP: 92,86%; CLO, SUT e TET, 0%; GEN: 85,71%; TOB: 92,86%; FLF: 7,14% e NOR: 21,43%. Todas as cepas identificadas desta espécie (as oriundas de vieiras, ou ostras coletadas em Arraial durante a 11ª ou a 12ª campanha) apresentaram resistência múltipla aos antibióticos testados entre 3 e 9 antibióticos diferentes. Outros estudos também descrevem resistências a elevados números de antibióticos em bactérias do gênero *Vibrio*. Scarano et al. (2014), analisando cepas de *Vibrio* isoladas de douradas na Itália (*Sparus aurata*) descrevem elevada prevalência de cepas resistentes a AMP (40/50 cepas isoladas), amoxicilina (41/50) (no nosso caso a amoxicilina foi utilizada em conjunto com o ácido clavulânico: AMC), CFO (28/50), e baixa ou nenhuma resistência para CLO, FLF, GEN, e TE (SCARANO et al., 2014).

Escudero et al. (2015) descrevem um caso clínico de úlcera cutânea crônica causada por *V. alginolyticus* resistente a CIP, mas resolvida com tratamento por doxyciclina e ceftriaxone (ESCUDEIRO et al., 2015).

Zavala-Norzagaray et al. (2015), analisando bactérias do gênero *Vibrio* em tartarugas marinhas no México descrevem a seguinte prevalência de resistência a alguns dos antibióticos que foram utilizados na nossa pesquisa: GEN: 38,5%; CIP: 17,9%; SUT: 7,7%; TET: 7,7%, AMP: 87,2%; CLO: 10,3%. Estes resultados confirmam a elevada prevalência de cepas resistentes à AMP, porém, com prevalência menor daquela observada na nossa pesquisa (ZAVALA-NORZAGARAY et al., 2015).

Wang et al. (2015) comparam a resistência a antibióticos de cepas de *Vibrio* spp. isolados dos abalones *Haliotis diversicolor* e da água marinha. Nos moluscos, os autores observam uma prevalência de cepas resistentes menor do que aquela encontrada na água: TET: 20%, SUT: 15%; NOR 10%, CLO e GEN <10%, muito diferentes daquela encontrada na nossa pesquisa (WANG et al., 2015).

Ottaviani et al. (2001) fazem uma análise da resistência a antibióticos em diferentes espécies de *Vibrio* spp. derivados de alimentos (entre os quais, moluscos bivalves), e estudam também a produção de  $\beta$ -lactamase. Os autores descrevem que entre 31 cepas da espécie *V. alginolyticus*, 28 foram resistentes a AMP, 18 a TET, 0 a CLO e CIP, e 2 a SUT. Neste caso, a

resistência a TET foi muito maior do que aquela que observamos na nossa pesquisa, mas confirmando a elevada prevalência de resistência à AMP. Os mesmos autores observam nas cepas de *V. alginolyticus* uma elevada prevalência de cepas produtoras de  $\beta$ -lactamase, maior do que a observada em outras espécies. A presença de uma  $\beta$ -lactamase na espécie *V. alginolyticus* poderia explicar a elevada prevalência de resistência à AMP que foi observada tanto na nossa pesquisa, como nas outras pesquisas consideradas.

Chiou, Li e Chen (2015) descrevem a presença de uma  $\beta$ -lactamase denominada *bla*<sub>CARB17</sub> intrínseca no cromossomo 2 de *V. parahaemolyticus*, que também é uma espécie que possui elevada resistência à AMP e outros antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (CHIOU; LI; CHEN, 2015).

Jin et al. (2012) descrevem outra  $\beta$ -lactamase (VAK-3) em cepas de *Vibrio* spp. (JUN et al., 2012).

Além da presença de  $\beta$ -lactamases específicas, também, a presença de bombas de efluxo, ou mecanismos que alteram a permeabilidade de membrana podem explicar este tipo de resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (MARTINEZ et al., 2009; CHITSAZ; BROWN, 2017).

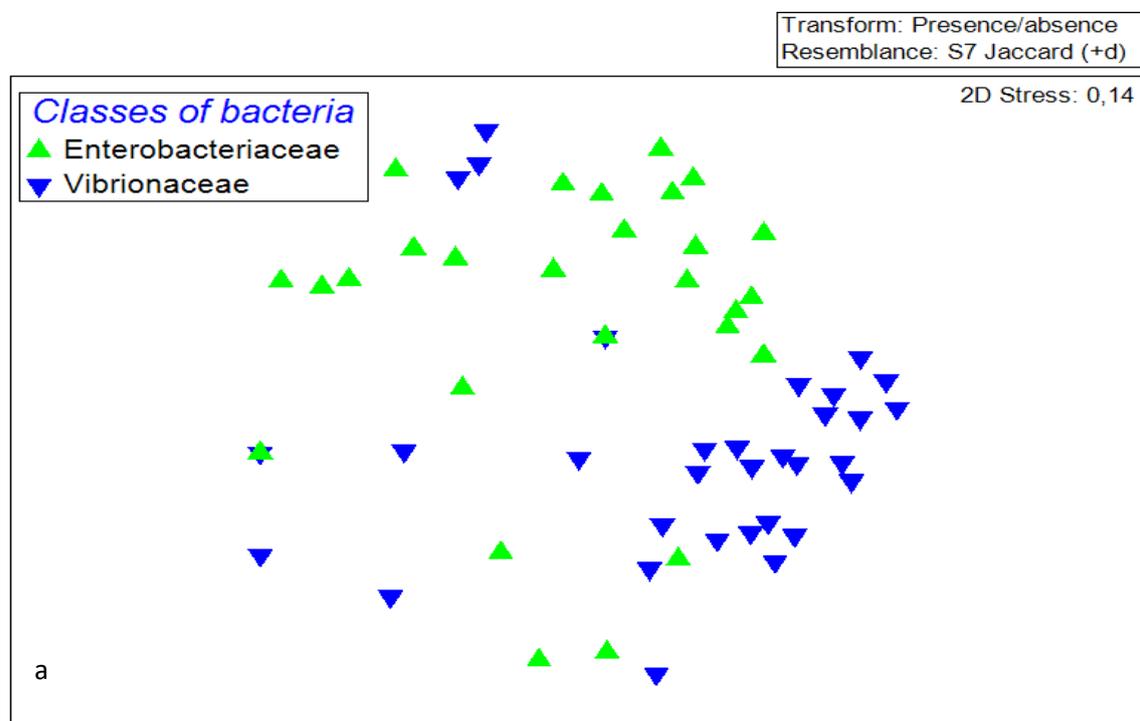
### 2.3.7 RELAÇÃO ENTRE OS PERFIS FENOTÍPICOS DE RESISTÊNCIA E AS VARIÁVEIS AMBIENTAIS

A análise PERMANOVA evidenciou comportamentos localmente diferentes com relação ao perfil de resistência aos antibióticos. Em Arraial do Cabo houve diferenças significativas entre as espécies de moluscos bivalves ( $p=0,04$ ) e, altamente, significativas entre as classes de bactérias ( $p=0,001$ ). Em Búzios, houve significância na interação entre os dois elementos: espécie de moluscos bivalves e classe de bactérias ( $p=0,002$ ). Esta interação, porém, pode ter sofrido o efeito negativo da grande diferença do número de amostras de mexilhões e de vieiras que puderam ser coletados no local. Ainda, em Búzios, também houve significância na diferença do perfil de resistência entre moluscos bivalves e água de esgoto ( $p<0,05$ ) e, também, nesta matriz que foi analisada, houve um comportamento significativamente diferente entre *Vibrionaceae* e enterobactérias ( $p<0,05$ ).

Os gráficos nMDS (*multidimensional scaling*) de análise do perfil de resistência a antibióticos em Arraial do Cabo e Búzios mostraram uma clara separação entre *Enterobacteriaceae* e *Vibrionaceae*, em ambas as estações de amostragem (Figura 7). A análise da porcentagem de

similaridade (SIMPER) avaliou a similaridade entre as resistências antimicrobianas nas duas classes de bactérias. Em Arraial do Cabo, a similaridade entre as enterobactérias era 36,48%, principalmente associada aos antibióticos TET e CFL. No mesmo lugar, a similaridade entre as *Vibrionaceae* era 52,47%, principalmente associada aos antibióticos CFL, AM e CFO.

Em Búzios, foi observada uma mudança de perfil: a similaridade entre as enterobactérias era 26,41%, associada aos antibióticos TET e CFL (de forma semelhante ao observado em Arraial do Cabo), enquanto a similaridade entre as *Vibrionaceae* era de 39,03%, associada aos antibióticos NOR e CFL.



**Figura 7:** Gráfico nMDS dos perfis de resistência a antibióticos nas diferentes classes de bactérias encontradas em moluscos bivalves de Arraial do Cabo (gráfico a) e de Búzios (gráfico b).

Os resultados dos testes de PERMANOVA realizados para analisar o efeito do local, comparando os perfis de resistência a antibióticos de bactérias isoladas de mexilhões, em Búzios e Arraial do Cabo, mostraram resultados significativos na interação entre as variáveis:

local de amostragem, classe de bactéria e concentração de *E. coli* ( $p < 0,05$ ). O teste *pair-wise* para esta interação dos três fatores evidenciou significância na relação entre a resistência a antibióticos e as diferentes classes de contaminação por *E. coli*. Este resultado mostra a associação entre altas concentrações de *E. coli* ( $>230 E. coli/100g$ ) e aumento da resistência a antibióticos ( $p < 0,05$ ). Este resultado foi visível em ambas as classes de bactérias analisadas, com elevada significância da diferença ( $p < 0,001$ ), coerentemente com os resultados obtidos, estudando a diferença entre *Vibrio* e enterobactérias em outras matrizes analisadas nesta pesquisa. Este resultado nos mexilhões, em coerência com os resultados obtidos com outras espécies de moluscos bivalves é importante para evidenciar como a espécie *Perna perna* seja um modelo de estudo eficaz e altamente disponível para o estudo dos perfis de resistência a antibióticos.

O uso de mexilhões como modelo de estudo da contaminação microbiana em moluscos bivalves é preconizado pela legislação Brasileira (CGSAP/DEMOC/SEMOC/MPA, 2013) com relação à quantificação de *E. coli*. Não foram encontradas referências bibliográficas referentes ao uso de espécies de mexilhões tropicais ou de climas temperados (*Mytilus edulis* ou *M. galloprovincialis* são as principais) como espécie “modelo” ou espécie “sentinela” para o estudo das características de seu microbiota em comparação às outras espécies, mas existem vários estudos que analisam a capacidade de concentração de bactérias contaminantes em diferentes espécies de moluscos bivalves ou invertebrados marinhos e que comparam espécies de “mexilhão” com outros tipos de animais. Neste sentido, é importante ressaltar como as diferentes espécies de moluscos bivalves possuem competência variável de concentração de bactérias contaminantes (principalmente *E. coli*) conforme a espécie, o tamanho, o estado de saúde e o nível de estresse (BURKHARDT; CALCI, 2000; RASGALLA JR; DE SOUZA BRASIL; SALOMÃO, 2007; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ et al., 2015; OLALEMI et al., 2016). Stabili et al. (2013) evidenciam como os mexilhões mediterrâneos (*M. galloprovincialis*), quando expostos à água de esgoto, acumulam *E. coli* mais do que outras espécies de invertebrados marinhos estudados na pesquisa (STABILI; TERLIZZI; CAVALLO, 2013). Já a CEFAS Britânica fornece indicações contrastantes sobre o uso de espécies de moluscos bivalves como “sentinelas” de contaminação microbiana. Em 2013 indicava que o “vongoli” o “berbigão” (*Cerastoderma edule*) era a espécie que mais acumulava *E. coli* em comparação com mexilhões ou ostras (KERSHAW et al., 2013). Já mais recentemente, outra

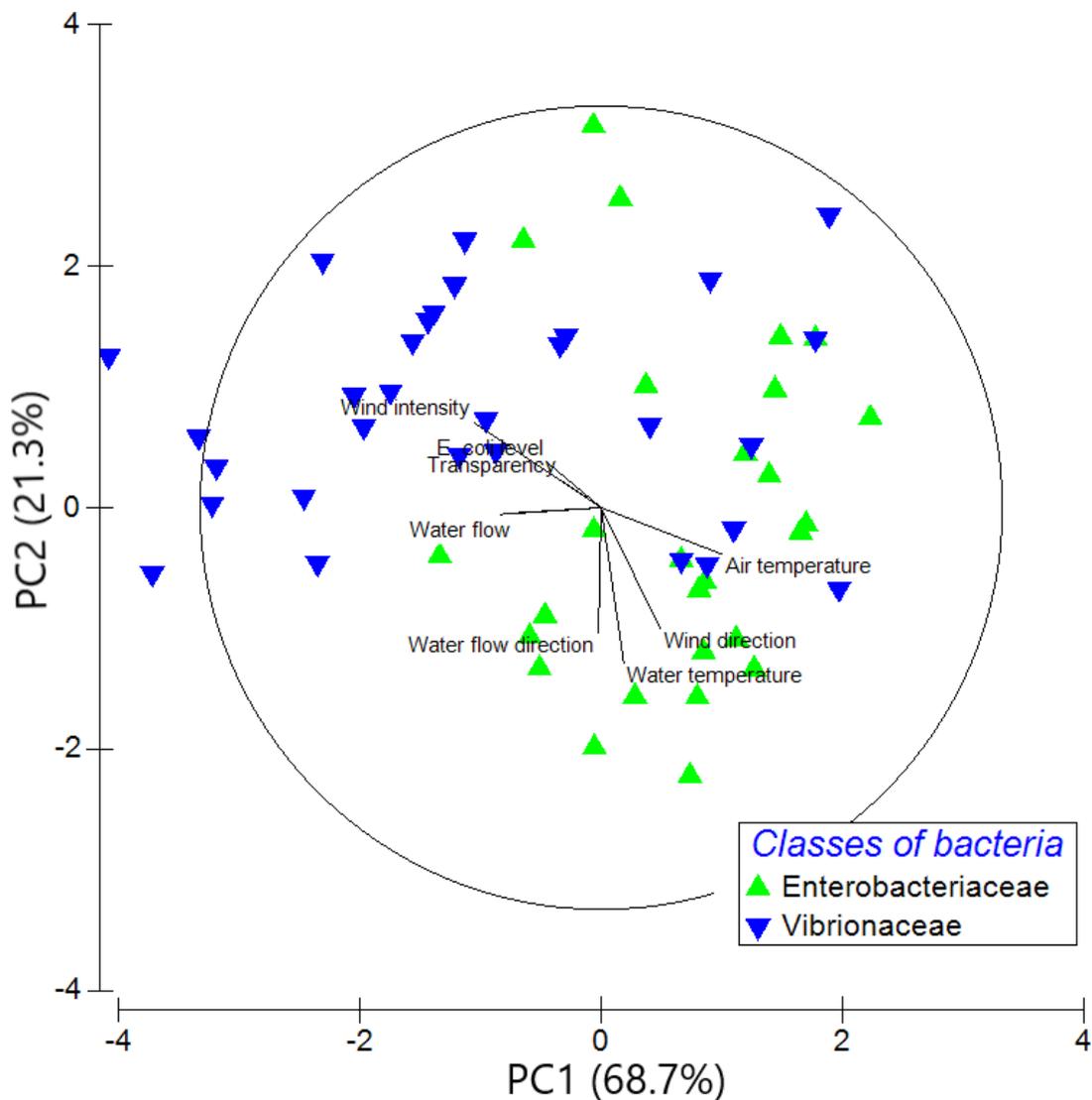
pesquisa produzida pela mesma instituição (TAYLOR et al., 2016) evidencia que sim, os mexilhões são os maiores bioacumuladores de *E. coli* entre as espécies de moluscos bivalves estudadas.

Porém, destes resultados encontrados, é importante ressaltar que não existem ainda dados sobre a capacidade de espécies de moluscos bivalves tropicais de acumulação de *E. coli*, nem análises sobre as características comparativas dos microbiomas destas espécies com relação à resistência a antibióticos.

**Quadro 15:** PERMANOVA baseada nas similaridades de Jaccard de um grupo de dados multivariados (12 classes de antibióticos). Análises de comparação das variâncias dos perfis de resistência em bactérias isoladas de mexilhões (*Perna perna*) entre estações de amostragens diferentes (Búzios e Arraial do Cabo), classes de bactérias diferentes (Enterobactérias e *Vibrionaceae*), e classes de contaminação por *E. coli* diferentes (<5 UFC/100g; 5-230 UFC/100 g e >230 UFC/100 g). Os valores em negrito são significativos por  $p < 0,05$ .

<i>Source</i>	Df	SS	MS	F	P(perm)	Perms
<i>Stations sampling</i> (SS)	1	1996,5	1996,5	13,764	0,236	999
<i>Classe of bacteria</i> (CB)	1	26069	26069	17,973	<b>0,001</b>	998
<i>E. coli concentration</i>						
(EC)	2	8189,1	4094,5	28,229	<b>0,008</b>	998
SS x CB	1	4308,2	4308,2	29,702	0,028	999
SS x EC	2	4019,5	2009,8	13,856	0,189	999
EC X CB	2	7412,2	3706,1	25,551	<b>0,015</b>	997
SS X CB X EC	2	14395	7197,3	4,962	<b>0,001</b>	999
Res	103	1.49E+08	1450,5			
Total	114	2.30E+09				
<i>Pair-wise test (E. coli concentration)</i>						
Groups	T	P(perm)	Perms			
< 5 UFC <sup>a</sup> , 5 - 230 UFC <sup>b</sup>	23,744	<b>0,006</b>	998			
< 5 UFC <sup>a</sup> , > 230 UFC <sup>b</sup>	16,461	<b>0,038</b>	999			
5 - 230 UFC <sup>b</sup> , > 230 UFC <sup>b</sup>	0,93517	0,454	970			

A análise da componente principal (Figura 8) evidenciou como as variáveis ambientais afetaram significativamente os perfis de resistência aos antibióticos em ambas as classes de bactérias estudadas. O modelo que foi construído revelou-se eficiente, já que a PC1 explicou 68,7% das variações, e a PC2, 21,3%. O aumento de variáveis ambientais como as temperaturas (do ar e da água), e a direção dos ventos e das correntezas marinhas, aparentemente, influenciaram o perfil de resistência das enterobactérias. Por outro lado, a resistência das *Vibrionaceae* foi afetada pela intensidade dos ventos e das correntezas, da turbidez da água e do nível de contaminação por *E. coli*.



**Figura 8:** gráfico de PCA dos perfis de resistência a antibióticos considerando as classes de bactérias e as variáveis ambientais, representadas pelas setas.

## 2.3.8 BIOLOGIA MOLECULAR

Foi realizada a PCR de todas as cepas isoladas nas campanhas 11 e 12. O quadro 14 apresenta a correlação entre fenótipo e genótipo das cepas nas quais foi detectada a presença de genes de resistência a antibióticos que foram testados.

**Quadro 16:** correspondência entre resistência fenotípica a antibióticos e presença de genes de resistência a antibióticos específicos.

CEPA	IDENTIFICAÇÃO	RESISTÊNCIA FENOTÍPICA	GENES DE RESISTÊNCIA
11AVV2	<i>V. alginolyticus</i>	AMC, AMP, CFL, CFO, GEN, TOB, NOR	GYR-B, INTEGRASE, INTEGRON
11 AVV3	<i>V. alginolyticus</i>	AMC, AMP, CFL, CFO, GEN, TOB	INTEGRASE, INTEGRON
11 AVV4	<i>V. alginolyticus</i>	AMC, AMP, CFL, CFO, GEN, TOB	GYR-B, INTEGRASE, INTEGRON
11AVV5	<i>V. alginolyticus</i>	AMC, AMP, CFL, CFO, GEN, TOB	GYR-B, AAC(6')Ib, INTEGRASE
11AVV6	<i>V. alginolyticus</i>	AMC, AMP, CFL, GEN, TOB	GYR-B, INTEGRASE
11AVV7	<i>V. alginolyticus</i>	AMC, AMP, CFL, CFO, GEN, TOB	GYR-B, INTEGRASE
11AMV7	<i>Providentia stuartii</i>	CFL, CLO, TET	GYR-B, INTEGRASE
11AMV8	<i>Providentia stuartii</i>	CFL, CLO, TET, TOB	GYR-A, GYR-B, INTEGRASE
11AME1	<i>Escherichia coli</i>	AMP, CIP, SUT, TET, NOR	INTEGRASE
11AME6	<i>Enterobacter spp.</i>	AMC, CFL, CFO, SUT, TET	INTEGRASE
11AME10	<i>Enterobacter spp.</i>	AMC, CFL, CFO, SUT, TET	QNR-D
11AOE2	<i>Escherichia coli</i>	AMP, SUT, TET, NOR	QNR-D
11AOE3	<i>Escherichia coli</i>	AMP, SUT, TET, NOR	GYR-A, BLA-CMY, QNR-B,
11AOE7	<i>Escherichia coli</i>	CFL, CFO, TET	QNR-D
11AOE8	<i>Escherichia coli</i>	CFL, CFO, TET	QNR-D
11AOE9	<i>Escherichia coli</i>	TET	QNR-B, QNR-D, INTEGRASE
11AOE10	<i>Escherichia coli</i>	TET	INTEGRASE
11AOE11	<i>Escherichia coli</i>	TET	INTEGRASE
11AVE3	<i>Escherichia coli</i>	AMC, CFL, CFO, TET,	INTEGRASE, INTEGRON
11AVE5	<i>Pseudomonas spp.</i>	CFL, TET	INTEGRASE
11AVE6	<i>Pseudomonas spp.</i>	CFL, TET	GYR-B
11 BAE3	<i>Escherichia Coli</i>	AMP, CFL, CIP, CLO, SUT, TET, TOB, FLF, NOR	GYR-B
11BME1	<i>Escherichia coli</i>	NOR	GYR-A, GYR-B
11BME2	<i>Escherichia coli</i>	Sensível a todos os antibióticos	GYR-A, GYR-B
11BME3	<i>Escherichia coli</i>	TET	INTEGRASE, INTEGRON

11BME5	<i>Enterobacter</i> sp.	Sensível a todos os antibióticos	INTEGRASE, INTEGRON
11BME6	<i>Enterobacter</i> spp.	Sensível a todos os antibióticos	INTEGRASE, INTEGRON
11BAV4	<i>Aeromonas salmonicida</i>	AMP, CFL, CFO, CIP, TOB	QNR-B, INTEGRASE, 3X INTEGRONS
11AOV2	<i>Shpingomonas paucimobilis</i>	AMC, AMP, CFL, CFO, CIP, GEN, TET, TOB, NOR	AAC(6'lb), INTEGRON
11AOV7	<i>Vibrio alginolyticus</i>	AMC, AMP, CFL, CFO, CIP, GEN, TOB, FLF, NOR	AAC(6'lb), INTEGRASE, INTEGRON
11AOV10	<i>D. mishino/ K. sed</i>	SUT	INTEGRASE, INTEGRON
12AOE3	<i>Enterobacter cloacae</i>	AMC, AMP, CFL, CFO	QNR-D
12AOE7	<i>Enterobacter</i> spp.	AMC, CFL, CFO, TET	QNR-D
12AVV1	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	CIP	AAC(6'lb), INTEGRASE
12AVV5	<i>Vibrio alginolyticus</i>	AMP, CFL, CIP, TOB	AAC(6'lb), INTEGRASE
12AOV8	<i>Vibrio alginolyticus</i>	AMP, CIP, GEN	GYR-B, AAC(6'lb), INTEGRASE, INTEGRON
12AMV6	<i>Bordetella hinzii</i>	AMP, CFL, GEN	AAC(6'lb)
12BMV42	<i>Proteus</i> spp.	AMP, CFL	INTEGRASE

LEGENDA: AMC: Amoxicilina e ácido Clavulânico, AMP: Ampicilina, CFL: Cefalotina, CFO: Cefoxitina, CIP: Ciprofloxacina, CLO: Cloranfenicol, SUT: Cotrimoxazol, GEN: Gentamicina, TET: Tetraciclina, TOB: Tobramicina, FLF: Florfenicol, NOR: Norfloxacin. Na coluna "CEPA" os números representam o número da coleta de amostragem como descrito no quadro 9; as letras "A" e "B" representam as estações de amostragem (A: Arraial do Cabo, B: Armação dos Búzios); as letras "E" e "V" representam a classe de bactéria analisada: *Enterobacteriaceae* (E) ou *Vibrionaceae* (V).

Os resultados das PCR não condizem completamente com os perfis de resistência aos antibióticos que foram evidenciados na análise fenotípica. Cada gene pesquisado deveria estar relacionado à resistência a específicos grupos de antibióticos: a resistência às **cefalosporinas** e a outros antibióticos  $\beta$ -**lactâmicos** (Cefotaxime, amoxicilina e ácido Clavulânico, ampicilina) é associada ao gene BLA-CMY (DALLENE et al., 2010; MATHERS; PEIRANO; PITOUT, 2015). A resistência frente às **quinolons e fluorquinolons** (Ciprofloxacina, Norfloxacin) é associada a dois mecanismos diferentes: PMQR (*Plasmid Mediated Quinolone Resistance*), associado aos genes QNR-A, QNR-B, QNR-C, QNR-D, QNR-S e AAC (6') Ib, e QRDR (*Quinolone resistance Determining Region*), associado aos genes GYR-A, GYR-B. A resistência

aos **aminoglicosídeos** (Tobramicina, Gentamicina, Streptomicina) é associada ao gene AAC(6')Ib, que atua através de uma acetyl-transferase que inativa tanto esta classe de antibióticos, como as **quinolons** (JACOBY et al., 2009; DALLENNE et al., 2010; DA SILVA; MENDONÇA, 2012; MATHERS; PEIRANO; PITOUT, 2015; TOMOVA et al., 2017). A presença de genes de resistência às outras classes de antibióticos testados não foi objetivo das pesquisas moleculares aqui propostas (cloranfenicol, florfenicol e tetraciclina).

Da mesma forma, muitas cepas que apresentaram resistência a vários antibióticos não evidenciaram a presença de nenhum dos genes testados, sugerindo a presença de outras formas de inativação dos antibióticos diferentes daquelas testadas, como por exemplo, resistência intrínseca de espécies bacterianas a determinados antibióticos, ou sistemas de bombas de efluxo, muito comuns em bactérias ambientais e em bactérias do gênero *Vibrio* (MARTINEZ et al., 2009)

Entre os genes de resistência isolados, vale a pena destacar QNR-D. Este gene foi descrito pela primeira vez em 2009, por Cavaco et al., em cepas de *Salmonella enterica Kentucky* e *Bovismorbificans* isoladas na China e associado a um forte aumento na resistência a CIP (CAVACO et al., 2009). Sucessivamente, sua presença foi confirmada principalmente em cepas de *Proteus* spp., *Morganella* spp. e, em um recente artigo de Kraychete et al., *Providencia rettgeri* e *alcalifaciens* (WIMALASENA et al., 2018; KRAYCHETE et al., 2019). Wang et al. (2012) não encontram este gene em cepas de *E. coli* de animais silvestres em jardins zoológicos (WANG et al., 2012). Pribul et al. (2016) descrevem a presença de uma cepa de *Salmonella* spp. entre as 129 estudadas positiva para este gene (PRIBUL et al., 2016). Dasgupta et al. (2017), analisando 187 cepas clínicas de enterobactérias, ao contrário, descrevem uma prevalência deste gene (mas não explicam em que espécies de enterobactérias foi encontrado) de 23,5% (DASGUPTA et al., 2017). Buschmann et al. (2012) descrevem a ausência deste gene de resistência em 48 cepas bacterianas isoladas de salmões criados em mar e de água dos sistemas de criação (BUSCHMANN et al., 2012). Kocsis et al. (2013) analisam a presença de genes de resistência a quinolons em 756 cepas de enterobactérias derivadas de laboratórios de diagnóstico clínico humano na Itália do Nordeste. Os autores descrevem uma prevalência de 5,79% deste gene em cepas de *Proteus* spp. e de 4,16% entre cepas de *Morganella morganii*. Nesta pesquisa, o gene QNR-D não é encontrado em nenhuma cepa de

*Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Providencia* spp. ou *Serratia* spp..

No caso da nossa pesquisa, conseguimos detectar o gene QNR-D em 4 cepas de *Escherichia coli*, e 3 cepas de *Enterobacter* spp..

Outros resultados interessantes foram aqueles associados aos genes da girase: GYR-A e GYR-B.

Os genes GYR-A e GYR-B, duas subunidades do gene da girase, um gene cromossomal deputado ao controle do excesso de enrolamento do DNA (GOÑI-URRIZA et al., 2002). Os *primers* que foram utilizados (descritos anteriormente na seção dos “materiais e métodos”) foram escolhidos para, sucessivamente, realizar o sequenciamento dos amplicons e uma análise filogenética e de associação entre as características fenotípicas das bactérias e as sequências genéticas, sendo que alterações pontuais na sequência das bases podem afetar a sequência dos aminoácidos e a sensibilidade dos antibióticos, principalmente, quinolons e fluorquinolons, que têm estas estruturas como alvo (GOÑI-URRIZA et al., 2002; YÁÑEZ et al., 2003). Era esperado encontrar estes genes em todas as cepas bacterianas testadas, mas isso não aconteceu. Os dois genes foram encontrados só em 17 cepas bacterianas testadas e, na maioria dos casos, as duas subunidades não foram encontradas juntas. Conforme os artigos onde foram descritos os *primers* utilizados nesta pesquisa, a estrutura destes genes é de “mediamente” a “altamente” conservada, entre *Aeromonas* (gênero alvo das pesquisas que desenvolveram os *primers* que foram escolhidos), *Vibrio* e Enterobactérias. Os *primers* também conseguiram detectar os genes-alvo dos controles-positivos utilizados que eram cepas de *Salmonella*. Por esta razão, a falta de detecção destes amplicons nas PCR pode ter sido associada às falhas técnicas que poderiam ser resolvidas repetindo, mais uma vez, o processo de PCR nas cepas que foram estudadas. Porém, destes problemas, foi possível sequenciar quatro amplicons destes genes: dois de GYR-A e dois de GYR-B.

A análise da distribuição dos genes de resistência entre as cepas analisadas das coletas 11 e 12 mostra como durante a 11ª campanha houve uma maior concentração de positivities genéticas: 39 das 88 cepas prelevadas durante a 11ª coleta apresentaram algum gene de resistência; 10 das 75 cepas prelevadas na 12ª coleta apresentaram algum gene de resistência. Na 11ª coleta também foi observada uma maior presença de vários genes de resistência na

mesma cepa bacteriana (25 das 39 cepas estudadas apresentavam mais de um gene de resistência), em comparação à 12ª coleta, quando só 3 das 10 cepas PCR-positivas apresentavam mais de um gene de resistência). Analisando estes resultados, surge, então, a pergunta se poderia haver uma relação entre os eventos climáticos, as alterações na concentração de bactérias de origem terrestre no microbioma dos moluscos bivalves e a presença de genes de resistência aos antibióticos.

A forte chuva que foi atribuída como possível causa das elevadas concentrações de *E. coli* encontradas durante a 11ª coleta representou um evento fora do padrão climático (e microbiológico) observado ao longo do período de realização deste estudo. Além de carregar elevadas quantidades de bactérias de origem fecal e terrestre, a água da chuva causou alterações no ambiente físico e químico da região estudada (abaixamento leve da temperatura e salinidade da água, presença de hidrocarbonetos na superfície da água). Alterações químico-físicas do ambiente causam estresses significativos para os moluscos bivalves (TORRES et al., 2012; FROELICH; OLIVER, 2013; RENAULT, 2015) que, por esta razão, têm menores capacidades de se defender de alterações do seu microbioma (FROELICH; OLIVER, 2013), já que o sistema imunitário não específico possuído por estes animais responde de forma muito semelhante a estresses de tipo físico, químico e biológico (RENAULT, 2015). Por esta razão, na análise microbiológica de animais simples como os moluscos bivalves deve ser levada em consideração a importância da análise ambiental conjunta, para entender as razões que levam às alterações microbiológicas nos moluscos bivalves tanto devidas à alterações microbiológicas, como de resposta do molusco bivalve e, também, as alterações ambientais (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ et al., 2015, 2016).

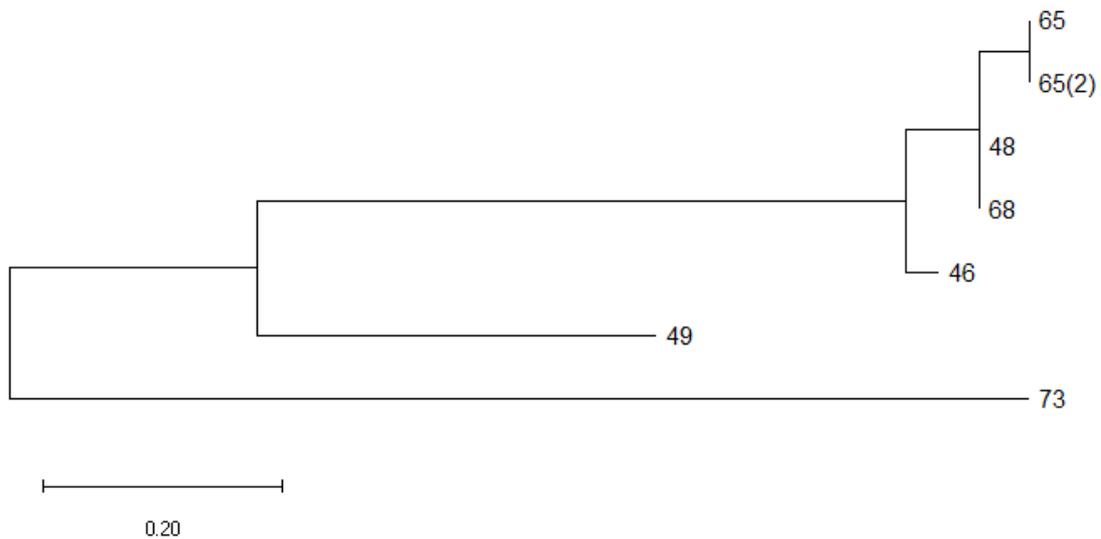
Com relação à análise puramente microbiológica, a transposição abrupta do ambiente terrestre para o ambiente marinho, com certeza, representou um estresse considerável para as bactérias entéricas que foram analisadas (ROZEN; BELKIN, 2005; HUGHES, 2008) que, possivelmente, estimulou, como resposta, a ativação da “resposta SOS” e a consequente conjugação dos genes de resistência presentes com as bactérias pertencentes ao microbioma dos moluscos bivalves (no caso deste estudo, as bactérias do gênero *Vibrio*) (TREVORS, 2011; WELLINGTON et al., 2013; BERGLUND, 2015). A sobrevivência ao estresse osmótico também pode ter contribuído a selecionar, de forma indireta, as cepas bacterianas capazes de resistir e de se adaptar a outros tipos de estresse (ALVES et al., 2014). Este elemento também pode

explicar a maior quantidade de genes de resistência encontrados nas cepas bacterianas isoladas durante a 11ª campanha de coleta. Outro elemento a considerar é que estes genes estavam principalmente concentrados nas bactérias do gênero *Vibrio* que, ao contrário, na coleta realizada três dias depois, já apresentavam menor número de bactérias com amplicons que correspondiam a genes de resistência.

A explicação para esta perda de genes de resistência pode ser associada ao “custo” metabólico pela posse de genes de resistência em um ambiente, relativamente estável, onde este tipo de resistência não represente uma vantagem competitiva significativa (*fitness*) para as bactérias (VITTECOQ et al., 2016; HALL; BROCKHURST; HARRISON, 2017; STEVENSON et al., 2017). Hall et al. (2017) descrevem como os custos associados à presença de genes de resistência sejam referentes ao aumento de DNA que deve ser sintetizado, copiado e transcrito. Este custo ainda é aumentado quando não existe uma plena compatibilidade entre o DNA “incluído” e os mecanismos de replicação da célula bacteriana (HALL; BROCKHURST; HARRISON, 2017). Por outro lado, outros autores observaram que a maioria dos genes de resistência não representa nenhum custo metabólico para as bactérias que os possuem (VARELA; MANAIA, 2013).

Com relação aos resultados dos sequenciamentos, as análises foram repetidas duas vezes, mas o sucesso foi limitado. O primeiro sequenciamento dos produtos de PCR oriundos não obteve nenhum resultado. Na segunda tentativa conseguimos sequenciar alguns *amplicons* dos controles positivos e de algumas cepas de campo: todos os controles positivos foram sequenciados, permitindo a confirmação da identidade dos produtos de PCR através da comparação das sequências na plataforma NCBI-BLAST.

Os produtos de PCR do gene da INTEGRASE foram aqueles que mais responderam ao processo de sequenciamento. A comparação das sequências através do *software* MEGA X através do método de máxima similaridade mostrou grande similaridade entre as sequências analisadas e identidade entre as integrases isoladas das bactérias 11AMV91 e 11BME3 (respectivamente, *providencia stuartii* isolada de uma amostra de mexilhões em Arraial do Cabo e *E. coli* isolada de mexilhões em Búzios) (Figura 9).



**Figura 9:** Análise evolutiva através do método da máxima similaridade de comparação filogenética entre amplicons para o gene INTEGRASE obtidos de moluscos bivalves. As cepas de origem dos genes são identificadas com números, conforme legenda: **65:** 11AOE10; **48:** 11AMV91; **68:** 11BME5; **46:** 11AVV6; **49:** 11AMV92 e **73:** cepa controle positivo IOC para o gene da integrase. Imagem obtida através do programa MEGA X.

A análise do dendrograma permite observar que, além da similaridade entre genes de integrase isolados de bactérias oriundas de amostras diferentes, também houve a variabilidade deste gene entre bactérias isoladas da mesma amostra (os genes 48 e 49 ambos isolados da mesma amostra de mexilhões de Arraial do Cabo).

Houve resposta, também, dos amplicons dos genes Gyr-A e Gyr-B.

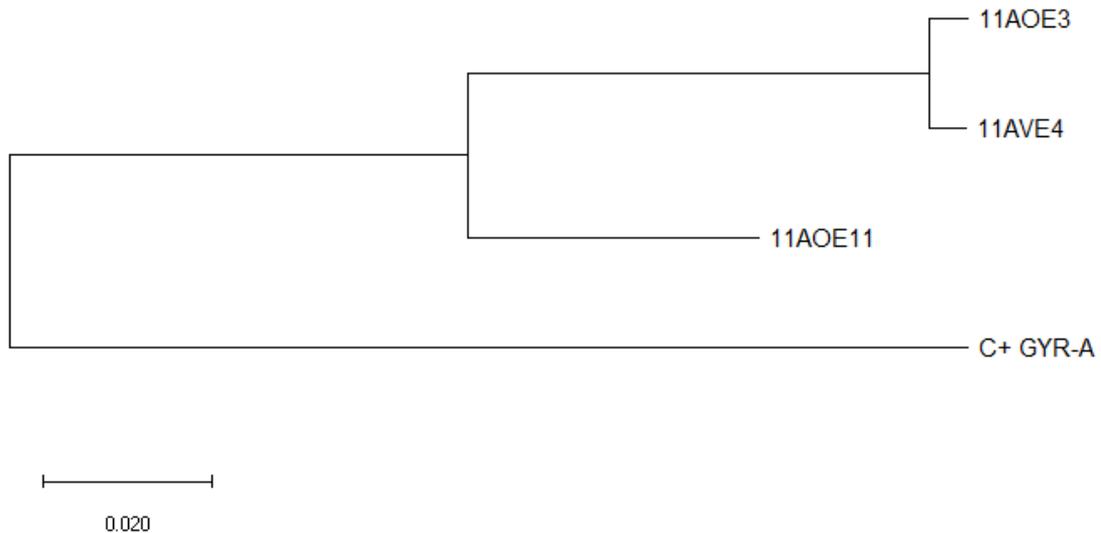
Foi possível analisar o sequenciamento do amplicon do gene GYR-A extraído das cepas 11AOE3 (*E. coli* existente a AMP, SUT, TET e NOR), 11AOE11 (*E. coli* resistente a TET), 11AVE4 (*E. coli* resistente a AMC, CFL, TET e CFO) e do controle positivo. As seqüências foram comparadas com as coleções publicadas na rede NCBI-BLAST.

O amplicon derivado da cepa 11AOE3 foi 97,66% correspondente a fragmentos do gene GYR-A derivado do sequenciamento completo do genoma da cepa CAV 1857, ABFQG, U2785, entre outras de *C. freundii*. As diferenças entre a cepa estudada e as referências no *Genebank* eram limitadas às bases que não foram legíveis na seqüência do nosso experimento.





deve ser considerada não somente a sequência de bases, mas a sequência dos aminoácidos. Da mesma forma a correlação entre os resultados do antibiograma e a similaridade dos genes não é comprovável, já que as cepas estudadas, apresentavam multirresistência, mas a antibióticos diferentes.



**Figura 12:** Análise evolutiva através do método da máxima similaridade de comparação filogenética entre amplicons para o gene GYR-A obtidos de moluscos bivalves. As cepas bacterianas são indicadas conforme explicado na seção de Materiais e métodos. C+ GYR-A é a cepa de controle-positivo utilizada nos procedimentos de PCR.

**Quadro 17:** Identificação e perfil de resistência a antibióticos das cepas bacterianas das quais foram extraídos os *amplicons* do gene GYR-A analisados na pesquisa.

CEPA	IDENTIFICAÇÃO	RESISTÊNCIAS
<b>11AOE3</b>	<i>E. coli</i>	AMP, SUT, TET, NOR
<b>11AOE11</b>	<i>E. coli</i>	TET
<b>11AVE4</b>	Identificação incerta	AMC, CFL, CFO, TET

LEGENDA: AMC: Amoxicilina e ácido Clavulânico, AMP: Ampicilina, CFL: Cefalotina, CFO: Cefoxitina, SUT: Cotrimoxazol, TET: Tetraciclina, NOR: Norfloxacin. Na coluna “CEPA” os números representam o número da campanha de amostragem como descrito no quadro 9; as letras “A” e “B” representam as estações de amostragem (A: Arraial do Cabo, B: Armação dos

Búzios); as letras “E” e “V” representam a classe de bactéria analisada: *Enterobacteriaceae* (E) ou *Vibrionaceae* (V).

### 3 CONCLUSÃO

O nosso trabalho teve como objetivo o estudo das características microbiológicas de moluscos bivalves produzidos nas áreas de grande fluxo turístico de Arraial do Cabo e Armação dos Búzios, no estado do Rio de Janeiro. Os resultados deste estudo demonstraram que estes produtos são criados em um ambiente relativamente estável do ponto de vista microbiológico, devido à uniformidade dos movimentos oceanográficos e da baixa pluviosidade. Justamente os períodos de chuvas intensas comprovaram ser altamente críticos para a sanidade dos moluscos bivalves criados, sendo associados a aumentos significativos da contaminação por *Escherichia coli* β-glucuronidase positivos. Conforme a classificação das áreas de produção de moluscos bivalves padronizada pela União Europeia, portanto, as áreas que foram estudadas deveriam ser classificadas como de grupo “B”, tendo sido identificados pontos de contaminação difusa e pontual em proximidade das áreas de cultivo e por ter excedido os padrões microbiológicos para consumo humano direto (*E.coli* < 230/100 g) por duas vezes ao longo dos seis meses de análises de classificação preliminar. Com tais observações, conclui-se, também, ser necessária a depuração dos lotes de produtos destinados ao consumo humano antes da comercialização (CEFAS, 2010; EU, 2017), ainda que *Salmonella* spp. não tenha sido encontrada em nenhuma amostra analisada (EC, 2007b). Considerando a associação encontrada entre as condições ambientais e a contaminação microbiológica, em caso de dias repetidos de chuva, deveriam ser realizadas a depuração, a suspensão da coleta durante pelo menos cinco dias, ou a destinação à comercialização após cocção dos moluscos bivalves produzidos nas áreas estudadas. A metodologia utilizada para a análise da concentração de *Escherichia coli* β-glucuronidase positivos (UNI-EN-ISO 16649-2) não foi aquela preconizada pela legislação brasileira (UNI-EN-ISO 16649-3), coerentemente com as orientações da União Europeia e do *Codex Alimentarius*, mas é considerada correspondente à metodologia oficial (MOOIJMAN et al., 2007; DUPONT et al., 2009; BRASIL, 2012; EU, 2012; CEFAS, 2014; CODEX ALIMENTARIUS, 2014; DE WITTE et al., 2014; PEREIRA et al., 2015). A metodologia utilizada mostrou-se eficaz permitindo entregar aos produtores os resultados das análises em menos de 24 horas após o início dos procedimentos. A redução do tempo de entrega dos resultados reduziu o risco de comercialização de moluscos bivalves contaminados com elevadas concentrações de *E. coli*.

As bactérias que foram analisadas para a pesquisa de resistência a antibióticos apresentaram uma prevalência de resistência significativa a antibióticos ( $\beta$ -lactâmicos e quinolons) que são prevalentemente de uso humano e resistência a espécies de antibiótico de uso humano de classes, utilizadas em clínica médica humana e veterinária (CLO e CIP). A resistência à tetraciclina foi significativamente concentrada em amostras de bactérias entéricas. A comparação dos perfis de resistência entre *Enterobacteriaceae* e *Vibrionaceae* demonstrou que estes dois grupos possuem comportamentos diferentes, pertencendo, portanto, a populações diferentes (CORDERO; POLZ, 2014). As bactérias que foram isoladas de mexilhões tropicais (*Perna perna*) tiveram perfis de resistência uniformes em comparação com as outras espécies, confirmando que esta espécie, devido à sua dieta não seletiva, pode ser utilizada como espécie sentinela para estudos sobre a microbiologia das espécies produzidas em águas tropicais no Brasil.

A análise genética da presença de genes de resistência a antibióticos não forneceu resultados que possam ser sobrepostos à análise fenotípica. Estas discrepâncias são possivelmente associáveis à presença de resistência intrínseca das espécies bacterianas estudadas a alguns antibióticos, ou à presença de mecanismos de resistência aos antibióticos diferentes daqueles que foram estudados. Entre os mecanismos alternativos podem ser considerados principalmente as bombas de efluxo (MARTINEZ et al., 2009). De toda forma foi observado que as bactérias isoladas durante períodos de chuva apresentavam uma maior quantidade de genes de resistência em comparação com aquelas isoladas durante dias de clima estável. Esta observação sugere que os genes de resistência a antibióticos presentes nas bactérias entéricas de origem terrestre possam ser transferidos às bactérias marinhas que, sucessivamente, podem se livrar deles por não representarem uma vantagem competitiva significativa em um ambiente estável como aquele que foi observado, com pouca presença de estresses químicos, físicos e microbiológicos para as bactérias.

O sequenciamento dos produtos de PCR obtidos durante as análises permitiu confirmar a identidade e a função dos produtos de PCR obtidos, mas devido às dificuldades durante a execução dos procedimentos não foi permitido definir a filogênese dos genes encontrados, não permitindo, portanto, a confirmação em nível genético a hipótese da transferência de genes de resistência a antibióticos de bactérias entéricas “terrestres” às bactérias marinhas encontradas nos moluscos bivalves.

Contudo, a partir do conhecimento sobre esta carência da pesquisa, os resultados das experiências realizadas evidenciam como os moluscos bivalves produzidos em ambiente tropical representam uma possível fonte de contaminação humana com bactérias resistentes a antibióticos, sugerindo, portanto, um risco à saúde dos consumidores.

#### 4 REFERÊNCIAS

ÁGUAS DE JUTURNAÍBA. **Fauna e Flora da estação de tratamento de Água e Esgoto (ETE) Araruama-RJ.** [s.l: s.n.]

ALLEN, H. K. et al. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. **Nature Reviews Microbiology Review.**, v. 8, n. March, p. 251–259, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2312>>.

ALMAGRO-MORENO, S.; TAYLOR, R. K. Cholera: Environmental Reservoirs and Impact on Disease Transmission. **Microbiology Spectrum**, v. 1, n. 2, p. 1–19, 2013.

ALVES LEGAT, J. F. et al. **Documentos 183 Programa de Cultivo de Moluscos Bivalves da Embrapa Meio-Norte.** [s.l: s.n.]

ALVES, M. S. et al. Seawater is a reservoir of multi-resistant *Escherichia coli* , including strains hosting plasmid-mediated quinolones resistance and extended-spectrum beta-lactamases genes. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. August, p. 1–10, 2014.

AMARAL RAMOS, A. E. **Formação e evolução espaço-temporal da ressurgência de cabo Frio-RJ.** 2011. 2011.

AQUINI, E. N.; MAGALH, R. M. Influence of Seed Source on Growth , Sexual Cycle and Mortality of the Brown Mussel , *Perna perna* , in a Culture System. **Journal of the world aquaculture society**, v. 44, n. 2, p. 300–304, 2013.

ARNOLD, K. E.; WILLIAMS, N. J.; BENNETT, M. ‘Disperse abroad in the land’: the role of wildlife in the dissemination of antimicrobial resistance. **Biology Letters**, v. 12, n. 8, p. 20160137, 2016. Disponível em: <<http://rsbl.royalsocietypublishing.org/lookup/doi/10.1098/rsbl.2016.0137>>.

AUSTIN, B. *Vibrios* as causal agents of zoonoses. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 3–4, p.

310–317, 2010.

BATISTA, D. et al. Distribution of the invasive orange cup coral *Tubastraea coccinea* Lesson, 1829 in an upwelling area in the South Atlantic Ocean fifteen years after its first record. **Aquatic Invasions**, v. 12, n. 1, p. 23–32, 2017.

BERGLUND, B. Environmental dissemination of antibiotic resistance genes and correlation to anthropogenic contamination with antibiotics. **Infection Ecology & Epidemiology**, v. 5, n. 1, p. 28564, 2015. Disponível em:  
<<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3402/iee.v5.28564>>.

BIDEGAIN DA SILVEIRA PRIMO, P.; FONTANELLE BIZERRIL, C. R. **Lagoa de Araruama-Perfil ambiental do maior ecossistema lagunar hipersalino do mundo**. SEMADS ed. [s.l: s.n.]

BLAUSTEIN, R. A. et al. *Escherichia coli* survival in waters: Temperature dependence. **Water Research**, v. 47, n. 2, p. 569–578, 2013. Disponível em:  
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2012.10.027>>.

BOEHS, G. et al. Parasites of three commercially exploited bivalve mollusc species of the estuarine region of the Cachoeira river (Ilhéus, Bahia, Brazil). **Journal of invertebrate pathology**, v. 103, n. 1, p. 43–7, jan. 2010. Disponível em:  
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19850046>>. Acesso em: 18 nov. 2013.

BRASIL. **Instrução Normativa interministerial 7 de 8 de maio de 2012**. [s.l: s.n.].

BRCast. **Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos** **Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - BrCAST Tabelas de pontos de corte para interpreta**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://brcast.org.br/>>.

BURKHARDT, W.; CALCI, K. R. Selective accumulation may account for shellfish-associated viral illness. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 4, p. 1375–1378, 2000.

BUSCHMANN, A. H. et al. Salmon aquaculture and antimicrobial resistance in the marine environment. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, 2012.

CALADO, L. et al. Eddy-induced upwelling off Cape São Tomé (22°S, Brazil). **Continental Shelf Research**, v. 30, n. 10–11, p. 1181–1188, 2010.

CAVACO, L. M. et al. qnrD , a Novel Gene Conferring Transferable Quinolone Resistance in Salmonella enterica Serovar Kentucky and Bovismorbificans Strains of Human Origin □. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 2, p. 603–608, 2009.

CEFAS. **Microbiological Monitoring of Bivalve Mollusc Harvesting Areas Guide to Good Practice : Technical Application**. 4: August ed. [s.l: s.n.]

CEFAS. **Microbiological Monitoring of Bivalve Mollusc Harvesting Areas Guide to Good Practice : Technical Application**. [s.l: s.n.]. Disponível em:  
<<http://www.cefas.defra.gov.uk/nrl/information-centre/eu-good-practice-guide.aspx>>.

CGSAP/DEMOC/SEMOC/MPA. **Manual do MPA para o Programa Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves - PNCMB**. [s.l: s.n.].

CHIOU, J.; LI, R.; CHEN, S. CARB-17 family of  $\beta$ -lactamases mediates intrinsic resistance to penicillins in *Vibrio parahaemolyticus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 6, p. 3593–3595, 2015.

CHITSAZ, M.; BROWN, M. H. The role played by drug efflux pumps in bacterial multidrug resistance. **Essays In Biochemistry**, v. 61, n. 1, p. 127–139, 2017.

CLSI. **Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria ; Approved Guideline — Second Edition**. [s.l: s.n.]v. 30

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. [s.l: s.n.]

CODEX ALIMENTARIUS. **Code of practice for fish and fishery products CAC/RCP 52-2003CAC/RCP 52-2003**. [s.l: s.n.].

CODEX ALIMENTARIUS. **STANDARD FOR LIVE AND RAW BIVALVE MOLLUSCS CODEX STAN 292-2008 Adopted in 2008. Amendments 2013. Revised 2014**. [s.l: s.n.].

CORDERO, O. X.; POLZ, M. F. Explaining microbial genomic diversity in light of evolutionary ecology. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 4, p. 263–273, 2014. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrmicro3218>>.

COSTA, R. A. et al. Antibiotic-Resistant Vibrios in Farmed Shrimp. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–5, 2015.

COSTA SOBRINHO, P. D. S. et al. A quantitative risk assessment model for *Vibrio parahaemolyticus* in raw oysters in Sao Paulo State, Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 180, p. 69–77, 2014. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016816051400172X>>.

DA SILVA, G. J.; MENDONÇA, N. Association between antimicrobial resistance and virulence in *Escherichia coli*. **Virulence**, v. 3, n. 1, p. 18–28, 2012. Disponível em: <[http://www.landesbioscience.com/journals/virulence/18\\_2011VIRULENCE0088R.pdf%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22286707](http://www.landesbioscience.com/journals/virulence/18_2011VIRULENCE0088R.pdf%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22286707)>.

DABROWSKI, T. et al. Numerical modelling of blue mussel (*Mytilus edulis*) bacterial contamination. **Journal of Sea Research**, v. 89, p. 52–63, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.seares.2014.02.005>>.

DALLENNE, C. et al. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important  $\beta$ -lactamases in Enterobacteriaceae. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 3, p. 490–495, 2010.

DASGUPTA, N. et al. An insight into selection specificity of quinolone resistance

determinants within Enterobacteriaceae family. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 10, p. 40–46, 2017. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213716517300759>>.

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74, n. 3, p. 417–433, 2010.

DE WITTE, B. et al. Quality assessment of the blue mussel (*Mytilus edulis*): Comparison between commercial and wild types. **Marine Pollution Bulletin**, v. 85, n. 1, p. 146–155, 2014. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0025326X14003671>>.

DOS SANTOS, C. L.; VIEIRA, R. H. S. F. BACTERIOLOGICAL HAZARDS AND RISKS ASSOCIATED WITH SEAFOOD. **Revista do Instituto de Medicina tropical São Paulo**, v. 55, n. 4, p. 219–228, 2013.

DUPONT, J. et al. Validation of an impedance method as an alternative to the European reference method for rapid enumeration of *Escherichia coli* in live bivalve molluscs. In: ICMSS09-Nantes, France-June 2009 proceeding book, June, **Anais...**2009.

EC. Commission Regulation (EC) No 1244/2007 of 24 October 2007 amending Regulation (EC) No 2074/2005 as regards implementing measures for certain products of animal origin intended for human consumption and laying down specific rules on official. **Official Journal of the European Union**, v. L281, n. 1244, p. 12–18, 2007a.

EC. **Commission Regulation (EC) No 1441/2007 of 5 December 2007 amending Regulation (EC) No 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs** **Official Journal of the European Union**. [s.l: s.n.].

ESCUADERO, M. et al. Cutaneous ulcer at the site of radiation-induced dermatitis caused by infection with *Vibrio alginolyticus*. **Actas dermosifilográficas**, v. 106, p. 774–775, 2015.

Disponível em:

<<http://www.actasdermo.org/index.php?p=watermark&idApp=UINPBA000044&piitem=S15>>

78219015002462&origen=actasdermo&web=actasdermo&urlApp=http://www.actasdermo.org&estadoItem=S300&idiomaItem=en>. Acesso em: 24 abr. 2016.

ESMERINI, P. O.; GENNARI, S. M.; PENA, H. F. J. Analysis of marine bivalve shellfish from the fish market in Santos city, São Paulo state, Brazil, for *Toxoplasma gondii*. **Veterinary parasitology**, v. 170, n. 1–2, p. 8–13, 28 maio 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20197214>>. Acesso em: 7 dez. 2013.

**EU. Community Guide to the Principles of Good Practice for the Microbiological Classification and Monitoring of Bivalve Mollusc Production and Relaying Areas with regard to Regulation 854/2004.** [s.l: s.n.].

**EU. COMMISSION REGULATION (EU) 2015/2285 of 8 December 2015 amending Annex II to Regulation (EC) No 854/2004 of the European Parliament and of the Council laying down specific rules for the organisation of official controls on products of animal origin intend.** [s.l: s.n.].

**EU. REGULATION (EU) 2017/625 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL on official controls and other official activities performed to ensure the application of food and feed law, rules on animal health and welfare, plant health and plant protection produ.** [s.l: s.n.].

**EUCAST. Antimicrobial susceptibility tests on groups of organisms or agents for which there are no EUCAST breakpoints.** [s.l: s.n.].

EUCAST. EUCAST intrinsic resistance and exceptional phenotypes, Expert Rules version 3.1. v. 2011, n. September, p. 1–11, 2016b. Disponível em: <[http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Expert\\_Rules/Expert\\_rule\\_s\\_intrinsic\\_exceptional\\_V3.1.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Expert_Rules/Expert_rule_s_intrinsic_exceptional_V3.1.pdf)>.

EVAN WARD, J.; SHUMWAY, S. E. Separating the grain from the chaff: particle selection in suspension- and deposit-feeding bivalves. **Journal of Experimental Marine Biology and**

**Ecology**, v. 300, n. 1–2, p. 83–130, mar. 2004. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022098104001078>>. Acesso em: 7 dez. 2013.

FAO/WHO. **Technical guidance for the development of the growing area aspects of bivalve mollusc sanitation programmes**. Food Safet ed. [s.l: s.n.]

FAYER, R.; DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. Zoonotic protozoa: from land to sea. **Trends in**

**parasitology**, v. 20, n. 11, p. 531–6, nov. 2004. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15471705>>. Acesso em: 11 nov. 2013.

FERRI, M. et al. Antimicrobial Resistance: A Global Emerging Threat to Public Health Systems.

**Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 8398, n. November, p. 00–00, 2015.

Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408398.2015.1077192>>.

FONDI, M. et al. Every gene is everywhere but the environment selects : Global geo-

localization of gene sharing in environmental samples through network analysis. **Genome**

**Biology and Evolution**, v. 8, n. 5, p. evw077, 2016. Disponível em:

<<http://gbe.oxfordjournals.org/content/early/2016/04/29/gbe.evw077.abstract>>.

FROELICH, B.; OLIVER, J. Increases in the Amounts of *Vibrio* spp. in Oysters upon Addition of

Exogenous Bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 17, p. 5208–5213,

2013. Disponível em: <<http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.01110-13>>.

GALLON, A. V.; NASCIMENTO, C. do; PFITSCHER, E. D. The bivalve production chain in Santa

Catarina , Brazil , and its management. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v. 4, n.

2, p. 208–226, 2011.

GARBOSSA, L. H. P. et al. **Moluscos Bivalves: Metodologia utilizada no Inquérito sanitário das baías da Grande Florianópolis** Boletim Técnico EPAGRI. [s.l: s.n.].

GIBBSON, A. On the trail of ancient killers. **Science**, v. 340, n. 14 June 2013, p. 1278–1282,

2013.

GOÑI-URRIZA, M. et al. Type II Topoisomerase Quinolone Resistance-Determining Regions of Mutations Associated with Quinolone Resistance. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 2, p. 350–359, 2002.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C. et al. Influence of mussel biological variability on pollution biomarkers. **Environmental Research**, v. 137, p. 14–31, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2014.11.015>>.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C. et al. Effect of diet quality on mussel biomarker responses to pollutants. **Aquatic Toxicology**, v. 177, p. 211–225, 2016.

HALL, J. P. J.; BROCKHURST, M. A.; HARRISON, E. Sampling the mobile gene pool: innovation via horizontal gene transfer in bacteria. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 372, n. 1735, p. 20160424, 2017. Disponível em: <<http://rstb.royalsocietypublishing.org/lookup/doi/10.1098/rstb.2016.0424>>.

HATOSY, S. M.; MARTINY, C. The Ocean as a Global Reservoir of Antibiotic Resistance Genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 21, p. 7593–7599, 2015.

HU, Q.; CHEN, L. Virulence and Antibiotic and Heavy Metal Resistance of *Vibrio parahaemolyticus* Isolated from Crustaceans and Shellfish in Shanghai, China. **Journal of food protection**, v. 79, n. 8, p. 1371–1377, 2016.

HUGHES, B. S. Evolutionary patterns of *Escherichia coli* growth in seawater determined with a Host to Coast Environmental Laboratory Analog. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 53, n. 3, p. 243–255, 2008.

ISO. **ISO 6887-3: Microbiology of food and animal feeding stuffs — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 3: Specific rules for the preparation of fish and fishery products.** [s.l.: s.n.].

JACOBY, G. A. et al. Temporal Appearance of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes □. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 4, p. 1665–1666, 2009.

JOZIĆ, S.; ŠOLIĆ, M. Effect of Environmental conditions on *Escherichia coli* survival in Seawater. In: **Escherichia coli**. [s.l: s.n.]2p. 64.

JUN, L. J. et al. Characterization of a new beta-lactamase gene from isolates of *Vibrio* spp. in Korea. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 555–62, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22534305>>.

KERSHAW, S. et al. **Impact of chronic microbial pollution on shellfish**. [s.l: s.n.]

KIM, H. Bin et al. Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinants over a 9-Year Period □. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 2, p. 639–645, 2009.

KRAYCHETE, G. B. et al. qnrD-harboring plasmids in *Providencia* spp. recovered from food and environmental Brazilian sources. **Science of the Total Environment**, v. 646, p. 1290–1292, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.378>>.

LAING, I.; SPENCER, B. **Bivalve cultivation : criteria for selecting a site**. St Clements House 2-16 Colegate Norwich: HMSO's Licensing Division, 2006.

LE ROUX, F.; WEGNER, K. M.; POLZ, M. F. Oysters and *Vibrios* as a Model for Disease Dynamics in Wild Animals. **Trends in microbiology**, v. 24, n. 7, p. 568–580, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0966842X16000755>>.

LEE, R. J.; YOUNGER, A. D. Developing microbiological risk assessment for shellfish purification. **International biodeterioration & biodegradation**, v. 50, p. 177–183, 2002.

LOPATKIN, A. J. et al. Persistence and reversal of plasmid-mediated antibiotic resistance. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41467-017-01532-1>>.

LOPATKIN, A. J.; SYSOEVA, T. A.; YOU, L. Dissecting the effects of antibiotics on horizontal gene transfer: Analysis suggests a critical role of selection dynamics. **BioEssays**, v. 38, n. 12, p. 1283–1292, 2016.

LOURENÇO, J. A. et al. **ASPECTOS TÉCNICOS DA OSTREICULTURA NO BRASIL: PERSPECTIVAS DE DESENVOLVIMENTO DA ATIVIDADE AMBIENTALMENTE SUSTENTÁVEL**. Disponível em: <[http://www.prex.ufc.br/formularios/Meio\\_Ambiente\\_2006/OSTREICULTURA NO BRASIL.pdf](http://www.prex.ufc.br/formularios/Meio_Ambiente_2006/OSTREICULTURA_NO_BRASIL.pdf)>. Acesso em: 22 abr. 2016.

LUX, T. M.; LEE, R.; LOVE, J. Genome-wide phylogenetic analysis of the pathogenic potential of *Vibrio furnissii*. **Frontiers in microbiology**, v. 5, n. August, 2014.

MARTINEZ-URTAZA, J. et al. Characterization of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium from Marine Environments in Coastal Waters of Galicia (Spain). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 7, p. 4030–4034, 2004.

MARTINEZ, J. L. The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 276, n. 1667, p. 2521–2530, 2009a. Disponível em: <<http://rspb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rspb.2009.0320>>.

MARTINEZ, J. L. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. **Environmental Pollution**, v. 157, p. 2893–2902, 2009b. Disponível em: <[http://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099\(13\)70318-9/abstract](http://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(13)70318-9/abstract)>.

MARTINEZ, J. L. et al. Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 33, n. 2, p. 430–449, 2009.

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

MEISTERHANS, G. et al. Structure of Manila Clam (*Ruditapes philippinarum*) Microbiota at the Organ Scale in Contrasting Sets of Individuals. **Microbial Ecology**, v. 71, n. 1, p. 194–206, 2016.

MIOTTO, M. **RECOMENDAÇÕES PARA UM PROGRAMA DE BOAS PRÁTICAS AQUÍCOLAS EM CULTIVOS DE OSTRAS (*Crassostrea gigas*)**. 2012. Universidade federal de Santa Catarina, 2012.

MIRANDA, C. D. et al. Role of shellfish hatchery as a reservoir of antimicrobial resistant bacteria. **Marine Pollution Bulletin**, v. 74, n. 1, p. 334–343, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.06.032>>.

MOOIJMAN, K. A. et al. **RIVM rapport 330310001 Validation and comparison of the methods for enumeration of faecal coliforms and *Escherichia coli* in bivalve molluscs**. [s.l.: s.n.].

MORRISON, C. M. et al. Survival of *Salmonella* Newport in oysters. **International Journal of Food Microbiology**, v. 148, n. 2, p. 93–98, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.05.006>>.

NARCHI, W.; GALVÃO-BUENO, M. S. ANATOMIA FUNCIONAL DE PERNA PERNA (L1NNÉ) (BIVALVIA, MYTILIDAE). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 14, n. 1, p. 135–168, 1997.

OLALEMI, A. et al. Bioaccumulation and persistence of faecal bacterial and viral indicators in *Mytilus edulis* and *Crassostrea gigas*. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 219, n. 7, p. 592–598, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheh.2016.06.002>>.

OLIVEIRA, J. et al. Microbial contamination and purification of bivalve shellfish: Crucial aspects in monitoring and future perspectives – A mini-review. **Food Control**, v. 22, n. 6, p. 805–816, jun. 2011. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713510004135>>. Acesso em: 13 nov. 2013.

OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J. R.; SOTO, D. **Aquicultura no Brasil: o desafio é crescer**. [s.l: s.n.]

PALÓCZY, A. et al. Coastal upwelling off Cape São Tomé (22°S, Brazil): The supporting role of deep ocean processes. **Continental Shelf Research**, v. 89, p. 38–50, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.csr.2013.09.005>>.

PEIRANO, G. et al. Occurrence of integrons and antimicrobial resistance genes among *Salmonella enterica* from Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, n. June, p. 305–309, 2006.

PEREIRA, C. et al. Seasonal variation of bacterial communities in shellfish harvesting waters: Preliminary study before applying phage therapy. **Marine Pollution Bulletin**, v. 90, n. 1–2, p. 68–77, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.11.019>>.

PEREIRA FIGUEREDO, H. C. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura Brasil 2010**. Brasília: Pereira Figueredo, Henrique César, 2012. .

PERKINS, T. L. et al. Sediment composition influences spatial variation in the abundance of human pathogen indicator bacteria within an estuarine environment. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, 2014.

PHE MICROBIOLOGY SERVICES. **Preparation of samples and dilutions , plating and sub-culture. Microbiology Services Food Water and Environmental Microbiology Standard Method**. [s.l: s.n.].

PLANTE, I.; CENTRÓN, D.; ROY, P. H. Direct sequencing and PCR mapping of integrons reveals multiple class 1 integrons in the multiresistant strain *Enterobacter cloacae* SCH880407941. **FEMS Microbiology Letters**, v. 221, n. 1, p. 59–62, 2003.

PRIBUL, B. R. et al. Characterization of quinolone resistance in *Salmonella* spp. isolates from food products and human samples in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 196–201, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2015.04.001>>.

PRUZZO, C.; GALLO, G.; CANESI, L. Minireview Persistence of vibrios in marine bivalves : the role of interactions with haemolymph components. **Environmental Microbiology**, v. 7, n. 6, p. 761–772, 2005.

RASGALLA JR, C.; DE SOUZA BRASIL, E.; SALOMÃO, L. carlos. The effect of temperature and salinity on the physiological rates of the mussel *Perna perna* (Linnaeus 1758). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 3, p. 543–556, 2007. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-89132007000300019&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132007000300019&lng=en&nrm=iso&tlng=en)>.

RENAULT, T. Immunotoxicological effects of environmental contaminants on marine bivalves. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 46, n. 1, p. 88–93, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2015.04.011>>.

ROBERTSON, L. J. The potential for marine bivalve shellfish to act as transmission vehicles for outbreaks of protozoan infections in humans: a review. **International journal of food microbiology**, v. 120, n. 3, p. 201–16, 15 dez. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17928081>>. Acesso em: 2 dez. 2013.

ROZEN, Y.; BELKIN, S. Survival of enteric bacteria in seawater: Molecular aspects. **Oceans and Health: Pathogens in the Marine Environment**, v. 25, p. 93–107, 2005.

RUPP, G. S.; NETO, F. M. O.; GUZENSKI, J. Estado actual del cultivo de moluscos bivalvos en la región sudeste-sur de Brasil. In: **Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores q afectan su sustentabilidad en América Latina**. [s.l.: s.n.]p. 77–89.

SCARANO, C. et al. Antibiotic resistance of *Vibrio* species isolated from *Sparus aurata* reared in Italian mariculture. **New Microbiologica**, v. 37, n. 3, p. 329–337, 2014.

SOUZA, R. V. d. et al. **Moluscos bivalves: medidas de controle microbiológico para atender às exigências da União Europeia**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <[http://www.epagri.sc.gov.br/wp-content/uploads/2014/05/Moluscos\\_bivalves\\_abril-2014.pdf](http://www.epagri.sc.gov.br/wp-content/uploads/2014/05/Moluscos_bivalves_abril-2014.pdf)>.

SOUZA SOBRAL, M. et al. Virus , protozoa and organic compounds decay in depurated oysters. **International Journal of Food Microbiology**, v. 167, n. 3, p. 337–345, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.09.019>>.

SRISUNONT, C.; BABEL, S. Uptake , release , and absorption of nutrients into the marine environment by the green mussel ( *Perna viridis* ). **Marine Pollution Bulletin**, v. 97, n. 1–2, p. 285–293, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.06.004>>.

STABILI, L.; TERLIZZI, A.; CAVALLO, R. A. Sewage-exposed marine invertebrates: survival rates and microbiological accumulation. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, n. 3, p. 1606–1616, 2013. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11356-012-1103-x>>.

STEVENSON, C. et al. Gene mobility promotes the spread of resistance in bacterial populations. **ISME Journal**, v. 11, n. 8, p. 1930–1932, 2017.

SUFFREDINI, E. et al. Qualitative and quantitative assessment of viral contamination in bivalve molluscs harvested in Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 184, p. 21–26, 2014. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160514001147>>.

SUPLICY, F. M. et al. Planning and management for sustainable coastal aquaculture development in Santa Catarina State, south Brazil. **Reviews in Aquaculture**, v. 0, p. 1–18, 2015. Disponível em:

<[http://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/biblioteca/download/estatistica/est\\_2010\\_nac\\_boletim.pdf](http://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/biblioteca/download/estatistica/est_2010_nac_boletim.pdf)>.

TALL, B. D. et al. Characterization of *Vibrio fluvialis*-Like Strains Implicated in Limp Lobster Disease. **APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY Natl. Shellfisheries Assoc. Annu. Meet**, v. 69, n. 12, p. 7435–7446, 2003.

TAYLOR, N. et al. **Comparison of the European Union (EU) and the United States National Shellfish Sanitation Programme (NSSP) microbiological standards in relation to EU Regulation 2015/2285**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://eur.icefas.org/media/13968/eu-us-comparison-report-2285-final.pdf>>.

TOMOVA, A. et al. Plasmid-Mediated Quinolone Resistance (PMQR) Genes and Class 1 Integrons in Quinolone-Resistant Marine Bacteria and Clinical Isolates of *Escherichia coli* from an Aquacultural Area. **Microbial ecology**, 2017.

TORRES, R. J. et al. Bioaccumulation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Mercury in Oysters (*Crassostrea rhizophorae*) from Two Brazilian Estuarine Zones. **International Journal of Oceanography**, v. 2012, p. 1–8, 2012. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/ijoccean/2012/838320/>>.

TRABAL FERNÁNDEZ, N. et al. Changes in the composition and diversity of the bacterial microbiota associated with oysters (*Crassostrea corteziensis*, *Crassostrea gigas* and *Crassostrea sikamea*) during commercial production. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 88, n. 1, p. 69–83, 2014.

TREVORS, J. T. Viable but non-culturable (VBNC) bacteria: Gene expression in planktonic and biofilm cells. **Journal of Microbiological Methods**, v. 86, n. 2, p. 266–273, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2011.04.018>>.

VARELA, A. R.; MANAIA, C. M. Human health implications of clinically relevant bacteria in wastewater habitats. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, n. 6, p. 3550–

3569, 2013.

VEZZULLI, L. et al. Comparative 16SrDNA Gene-Based Microbiota Profiles of the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) and the Mediterranean Mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from a Shellfish Farm (Ligurian Sea, Italy). **Microbial Ecology**, 2017.

VITTECOQ, M. et al. Antimicrobial resistance in wildlife. **Journal of Applied Ecology**, v. 53, n. April, p. 519–529, 2016.

WANG, R. X. et al. Antibiotic resistance monitoring in *Vibrio* spp. isolated from rearing environment and intestines of abalone *Haliotis diversicolor*. **MPB**, v. 101, n. 2, p. 701–706, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.10.027>>.

WANG, Y. et al. Prevalence of ESBLs and PMQR genes in fecal *Escherichia coli* isolated from the non-human primates in six zoos in China. **Veterinary Microbiology**, v. 159, n. 1–2, p. 53–59, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.03.009>>.

WELLINGTON, E. et al. The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. **Lancet infectious diseases**, v. 13, p. 155–165, 2013.

WIMALASENA, S. H. M. P. et al. Characterization of Quinolone-Resistant Determinants in Tribe Proteaceae Isolated from Pet Turtles with High Prevalence of *qnrD* and Novel *gyrB* Mutations. **Microbial Drug Resistance**, v. 00, n. 00, p. 1–8, 2018.

YÁÑEZ, M. A. et al. Phylogenetic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on *gyrB* gene sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, n. 3, p. 875–883, 2003.

ZAVALA-NORZAGARAY, A. A. et al. Isolation, characterization, and antibiotic resistance of *Vibrio* spp. in sea turtles from Northwestern Mexico. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 1–10, 2015.



## ANEXO 1: AUTORIZAÇÃO PARA ATIVIDADES COM FINALIDADE CIENTÍFICA



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 54941-1	Data da Emissão: 04/08/2016 11:43	Data para Revalidação*: 03/09/2017
-----------------	-----------------------------------	------------------------------------

\* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

#### Dados do titular

Nome: ANDREA LAFISCA	CPF: 745.220.601-06
Título do Projeto: Características microbiológicas de moluscos bivalves das Famílias Mytilidae, Ostreidae e Pectinidae 14 oriundos de malacoculturas fluminenses	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO	CNPJ: 04.809.688/0001-06

#### Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta de amostras	09/2016	12/2017
2	Análises genéticas e produção de artigos	01/2017	03/2018

#### Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico <a href="http://www.ibama.gov.br">www.ibama.gov.br</a> (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em <a href="http://www.mma.gov.br/cgan">www.mma.gov.br/cgan</a> .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

#### Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1		RJ	RESERVA EXTRATIVISTA MARINHA ARRAIAL DO CABO	UC Federal

#### Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Bivalvia (*Qtde: 300)

\* Quantidade de indivíduos por espécie, por localidade ou unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

#### Material e métodos

1	Método de captura/coleta (Invertebrados Aquáticos)	Coleta manual
---	--	---------------

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 49358558



Página 1/4



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

<b>Número:</b> 54941-1	<b>Data da Emissão:</b> 04/08/2016 11:43	<b>Data para Revalidação*:</b> 03/09/2017
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: ANDREA LAFISCA	CPF: 745.220.601-06
Título do Projeto: Características microbiológicas de moluscos bivalves das Famílias Mytilidae, Ostreidae e Pectinidae 14 oriundos de malacoculturas fluminenses	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO	CNPJ: 04.809.688/0001-06

#### Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO	

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

**Código de autenticação: 49358558**



Página 2/4





Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

<b>Número: 54941-1</b>	<b>Data da Emissão: 04/08/2016 11:43</b>	<b>Data para Revalidação*: 03/09/2017</b>
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: ANDREA LAFISCA	CPF: 745.220.601-06
Título do Projeto: Características microbiológicas de moluscos bivalves das Famílias Mytilidae, Ostreidae e Pectinidae 14 oriundos de malacoculturas fluminenses	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO	CNPJ: 04.809.688/0001-06

\* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

**Código de autenticação: 49358558**



Página 4/4

