

LUIZ RICARDO OLCHANHESKI

Diversidade e potencial do mobiloma presente ao longo da bacia do Rio Tietê

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo

2018

LUIZ RICARDO OLCHANHESKI

Diversidade e potencial do mobiloma presente ao longo da bacia do Rio Tietê

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Programa de Pós-graduação em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Welington Luiz de Araújo.

Coorientador: Prof. Dr. Fernando Lucas Melo.

Versão original.

São Paulo

2018

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Olchanheski, Luiz Ricardo
Diversidade e potencial do mobiloma presente ao longo da bacia do Rio Tietê / Luiz Ricardo Olchanheski; orientador Wellington Luiz de Araújo; coorientador Fernando Lucas Melo. -- São Paulo, 2018.
120 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Microbiologia. 2. Rio Tietê. 3. Plasmídeo. 4. Metagenômica. 5. Antibióticos. I. Araújo, Wellington Luiz de , orientador. II. Melo, Fernando Lucas, coorientador. III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Luiz Ricardo Olchanheski

Titulo da Dissertação/Tese: Diversidade e potencial do mobiloma presente ao longo da
bacia do Rio Tietê

Orientador: Prof. Dr. Welington Luiz Araújo

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de
Doutorado, em sessão publica realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05608-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-3405
e-mail: cep@ich.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 677/14 referente ao projeto intitulado: "*Diversidade e potencial do mobiloma presente ao longo da bacia do Rio Tietê*" sob a responsabilidade de **Luiz Ricardo Olchanheski**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP n°466 de 2012.

São Paulo, 21 de agosto de 2014.

W. Tavares

PROF. DR. WOLFFSON TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

P. Zanotto

PROF. DR. PAULO M.A. ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

Dedico a minha família:

Mãe, você me ensinou a caminhar e viver,

Inho, você foi meu pai,

Gessica, você me ensinou o que é ser completo,

Joaquim, você me mostrou o que é ser feliz.

AGRADECIMENTOS

- À Universidade de São Paulo, ao Instituto de Ciências Biomédicas e ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia pela oportunidade de obtenção do título.
- Ao meu orientador, Prof. Dr. Welington Luiz de Araújo por me dar a oportunidade de participar de seu grupo de pesquisa, depositando confiança e me fazendo pesquisador, tendo participação ímpar em minha vida profissional. Por momentos de conversa que me davam ânimo para seguir em frente. E principalmente por ter me dado a oportunidade de ver meu filho crescer, por isto serei eternamente grato, e não há palavras para descrever o quanto isto é importante para minha vida.
- Às agências de fomento CAPES e FAPESP pela bolsa de estudos outorgada. Agradeço também ao Núcleo de Apoio à Pesquisa NAP-BIOP da Universidade de São Paulo, em especial a Pró-Reitoria de Pesquisa pelo financiamento das primeiras etapas do projeto.
- À disposição e profissionalismo da secretária do programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Gisele de Graça Santana.
- À equipe da CETESB por todos os auxílios nos processos de coleta e paciência em tirar nossas dúvidas.
- A todos os colegas e amigos do LABMEM que sempre ajudaram direta e indiretamente nos projetos de pesquisa do grupo. Especialmente à Manuela Nóbrega Dourado que participa da minha formação desde a graduação, e no doutorado não foi diferente, você é um exemplo para mim.
- Ao Leandro Mazza Garrido que sempre auxiliou no meu projeto no que foi preciso. Também foi importante na minha vida pessoal, principalmente quando meu filho nasceu.
- À Eliane Gonçalves da Silva e Lina Rocío del Pilar Rada Martínez, que fizeram o projeto NAP-Tietê ser possível. Sem a dedicação de vocês provavelmente o projeto não seria o que é hoje.
- À todo o pessoal que passou pelo projeto NAP-Tietê, em especial a Mabel e Felipe que eu tive o prazer de acompanhar nos experimentos, e que com toda a certeza me ensinaram muito.
- À minha mãe, Cleunice Vieira de França, que sempre me incentivou e sempre esteve ao meu lado. Mesmo quando ninguém acreditava, você estava comigo. Me ensinou a caminhar sozinho, e se hoje sou alguém é graças a você, e exclusivamente você. Só nós sabemos pelo que passamos.
- Ao meu irmão, Luiz Renato Olchanheski Júnior, que sempre fez papel de pai na minha vida. Saiba que você sempre foi o exemplo de como eu deveria ser e me comportar. Em todos os passos que trilhei em minha vida, você estava me guiando, mesmo sem saber. As esperanças do passado hoje se tornaram realidade.

- À pessoa que está ao meu lado nos momentos mais importantes da minha vida, Gessica da Costa. Minha companheira, namorada, amiga, agradeço por todo o apoio, cumplicidade, amor, carinho. Obrigado por me ouvir quando queria desabafar, mesmo que fosse apenas para ouvir. Obrigado por dar palavras de apoio quando achava que estava perdido (mesmo que em algumas situações você nem soubesse que eu estava no fundo do poço). Obrigado por me dar o Joaquim, o melhor presente que a vida poderia me dar.

-Ao meu filho, Joaquim Costa Olchanheski, que surgiu na minha vida tão de repente e me fez ver o que realmente era ser feliz. Você me deu um motivo a mais para viver, e um motivo a mais para ser alguém na vida. Tudo que faço é para você. "E tem coisa na vida da gente que chega de repente, feito estrela cadente". Te amo.

- Obrigado aos meus amigos Felipe Renato Pedrón, Jhonattan Vieira de Souza e Gabriel Ramos de Lima, por sempre estarem ao meu lado, mesmo não conseguindo se encontrar.

- Ao Prof. Dr. Marcos Pileggi, por todo o ensinamento, confiança e amizade nestes dez anos de trabalho. Você é peça fundamental em minha formação, e sou eternamente grato por tudo que você fez e faz por mim.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Um agradecimento especial à agência de fomento CAPES pela bolsa de estudos concedida via programa de Pós-graduação em Microbiologia. Período 09/2014 à 02/2015.

Um agradecimento especial à agência de fomento Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa. Processo No. 2014/09692-5. Período: 03/2015 à 07/2018 (Luiz Ricardo Olchanheski). E também por auxílios à pesquisa. Processo No. 2017/12510-5 (Wellington Luiz de Araújo)

*Que todos os nossos esforços estejam sempre
focados no desafio à impossibilidade.
Todas as grandes conquistas humanas vieram
daquilo que parecia impossível
(Charles Chaplin)*

RESUMO

OLCHANHESKI, L.R. **Diversidade e potencial do mobiloma presente ao longo da bacia do Rio Tietê**. 2018. 122 p. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Sistemas de água doce são de importância vital para o sustento da população, além de contribuir com a produção agrícola e processos industriais. Alterações nas características físico-químicas em ambientes de água doce influenciam diretamente na diversidade bacteriana, porém ainda pouco se conhece quanto aos impactos no perfil funcional na comunidade bacteriana. Desta forma, um dos objetivos iniciais deste trabalho foi verificar a correlação dos perfis funcionais em dez amostras metagenômicas sequenciadas em trabalhos anteriores, com diferentes localizações geográficas e características físico-químicas contrastantes. A partir destas análises, foi possível verificar que a localização não está correlacionada com o perfil funcional da comunidade bacteriana. Além disto, a salinidade e a abundância de genes associados ao metabolismo do enxofre são as principais características relacionadas à variação do perfil funcional. Com o objetivo de analisar detalhadamente o perfil do mobiloma por meio de análises de metagenoma plasmidial, foi utilizado como objeto do presente estudo amostras de dois pontos do rio Tietê (TIET02400 e TITR02800). Este rio Tietê percorre 1.136 km no estado de São Paulo (Brasil), passando por diversas áreas preservadas da Mata Atlântica e regiões metropolitanas, como a cidade de São Paulo onde o rio recebe uma grande quantidade de poluentes industriais e esgoto doméstico. Os dois pontos amostrados são contrastantes quando IQA, sendo um classificado como ruim e outro como ótimo. Os genes presentes em plasmídeos no ponto com maior atividade antrópica foram relacionados às funções de transportadores transmembrana, bombas de efluxo, e genes que conferem resistência a compostos xenobióticos e metais pesados, que conferem vantagens adaptativas principalmente na presença de compostos tóxicos. Já no ponto com menor teor de poluentes, os genes de maior abundância estão envolvidos no transporte e assimilação de substâncias encontradas em baixas concentrações, como o fósforo. Os possíveis hospedeiros mais abundantes no ponto com IQA ótimo pertencem ao filo *Cyanobacteria*, o que justifica maior abundância de genes envolvidos com fotossíntese em plasmídeos. Ainda foi estimado a diversidade de genes que conferem resistência a antibióticos em quatro pontos (TIET02400, TIET02500, PATO02900 e TITR02800) contrastantes quando ao IQA. Foi observado maior abundância de genes que conferem resistência a multidrogas no ponto com IQA ótimo, e genes para resistência a sulfonamidas no ponto com IQA péssimo. Foi observado que a presença de metais pesados correlaciona com o aumento de genes que conferem resistência a antibióticos, sugerindo uma situação de co-seleção destes genes. As análises metagenômicas auxiliaram a compreender como as características ambientais podem modular a diversidade funcional na comunidade bacteriana, assim como determinam a pressão de seleção para genes passíveis de serem transferidos lateralmente, por meio de plasmídeos.

Palavras-chave: Metagenômica. Antibióticos. Atividade antrópica. Plasmídeos.

ABSTRACT

OLCHANHESKI, L.R. **Diversity and potential of the mobilome present along the Tietê river basin.** Thesis (Ph. D. thesis in Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Freshwater systems have vital importance for the livelihood of the population, in addition to contributing to agricultural production and industrial processes. Changes in physical-chemical characteristics in freshwater environments directly influence bacterial diversity, but little is known about the impacts on the functional profile in the bacterial community. Thus, one of the initial objectives of this work was to assess the correlation of the functional profiles in ten samples with different geographic positions and physical-chemical characteristics. From these analyzes, it was possible to verify that the geographical position is not correlated with the functional profile in the bacterial communities. In addition, salinity and genes for sulfur metabolism are the main characteristics that influence the functional profile. With the objective of analyzing the mobilome profile in detail using plasmid metagenome analysis, two points of the Tietê river were used as the object of study. The Tietê river, located in the state of São Paulo (Brazil), runs 1,136 km. Along this route, the river passes through several preserved areas of the Atlantic Forest and metropolitan regions, such as the city of São Paulo where the river receives a large amount of industrial pollutants and domestic sewage. The two points sampled are contrasting when compared to the IQA, one being classified as bad and the other as optimal. The genes present in plasmids at the point with greater anthropic activity were related to the functions of transmembrane transporters, efflux pumps, and genes that confer resistance to xenobiotic compounds and heavy metals, which confer adaptive advantages mainly the presence of toxic compounds. At the point of low pollutants, the genes of greater abundance are involved in the transport and assimilation of substances found in low concentrations, such as phosphorus. Also, with respect to the point with lower anthropogenic activity, the possible hosts more abundant belong to the phylum *Cyanobacteria*, which justifies the presence of more genes aimed at photosynthesis in plasmids. Also, in the Tietê river, it was possible to estimate the diversity of genes that confer resistance to antibiotics in four contrasting points when compared to the IQA. Higher abundance of genes that confer multidrug resistance at point with optimal IQA, and genes for resistance to sulfonamides at the point with poor IQA were observed. It was observed that the presence of heavy metals correlates with the increase of genes that confer resistance to antibiotics, determining a situation of co-selection of these genes. Metagenomic analyzes helped to understand how environmental characteristics modulate functional diversity in the bacterial community, as well as determine the selection pressure for laterally transferable genes, such as plasmids.

Keywords: Metagenomics. Antibiotics. Anthropic activity. Plasmids.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 Classificação das Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos (UGRHs) diferenciadas por atividade econômica	22
Figura 4.1 Localização dos pontos de amostragem utilizados para análises do perfil metabólico via análises metagenômicas.....	36
Figura 4.2 PCA do perfil funcional das amostras metagenômicas previamente publicadas.....	39
Figura 4.3 Análise de abundância radial comparando os genes classificados como <i>core</i> e acessórios em COG.....	46
Figura 5.1 Localização dos pontos de amostragem utilizados para análise do plasmidoma.....	54
Figura 5.2 Gel de eletroforese comprovando a validação da extração do plasmidoma.....	59
Figura 5.3 Análise de RDA diferenciando o perfil funcional do plasmidoma em comparação ao metagenoma total.....	60
Figura 5.4 Análise do perfil funcional das amostras do plasmidoma.....	63
Figura 5.5 Distribuição taxonômica dos possíveis hospedeiros das sequencias plasmidiais em comparação ao metagenoma (16S rRNA) a nível de filo.....	65
Figura 5.6 Distribuição taxonômica dos possíveis hospedeiros das sequencias plasmidiais em comparação ao metagenoma total a nível de filo.....	66
Figura 5.7 Distribuição taxonômica dos possíveis hospedeiros das sequencias plasmidiais em comparação ao metagenoma (16S rRNA) a nível de família.....	68
Figura 5.8 Distribuição taxonômica dos possíveis hospedeiros das sequencias plasmidiais em comparação ao metagenoma total a nível de família.....	69
Figura 6.1 Localização dos pontos de amostragem utilizados para análise do metagenoma.....	79
Figura 6.2 Análise de PCA utilizando os parâmetros físico-químicos disponibilizados pela CETESB.....	83
Figura 6.3 Análise de PCA utilizando a abundância de genes que conferem resistência a antibióticos.....	85

Figura 6.4 Número de <i>reads</i> que apresentaram similaridade a genes que conferem resistência a antibióticos.....	86
Figura 6.5 Abundância relativa dos genes que conferem resistência a antibióticos nas amostras do Rio Tietê.....	87
Figura 6.6 Abundância relativa das classes de antibióticos aos quais os genes conferem resistência nas amostras do Rio Tietê.....	89
Figura 6.7 Análise de correlação de Spearman utilizando a abundância das classes de antibióticos correlacionados com os parâmetros físico-químicos.....	91
Figura 6.8 Análise de correlação de Spearman utilizando a abundância dos genes que conferem resistência a antibióticos correlacionados com os parâmetros físico-químicos.....	92

Figuras em anexo

Figura 5.1A: Diversidade taxonômica dos possíveis hospedeiros plasmidiais considerando Domínios.....	118
Figura 5.2A: Distribuição taxonômica (a nível de filo) dos possíveis hospedeiros das sequencias plasmidiais (Plasmidoma) comparando ao metagenoma.....	119
Figura 6.1A Análise de componentes principais (PCA) utilizando os genes que conferem resistência a antibióticos nas amostras do Rio Tietê.....	119
Figura 6.2A: Análise de correlação de Spearman utilizando a abundância dos genes que conferem resistência a antibióticos correlacionados com os parâmetros físico-químicos.....	120

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 Amostras utilizadas para comparação do perfil funcional em metagenomas já publicados.....	36
Tabela 4.2 Análise de correlação baseado na análise de componentes principais.....	41
Tabela 4.3 Porcentagem de genes pertencentes a cada classe do COG, diferenciando entre <i>core</i> metagenômico e genes acessórios.....	48
Tabela 5.1 Parâmetros físico-químicos dos pontos TITR 02800 e TIET 02400 analisados no momento da coleta.....	58
Tabela 5.2 Resultados do sequenciamento obtido para o plasmidoma das amostras do rio Tietê.....	60
Tabela 5.3 Análise de correlação obtida a partir da análise de RDA.....	61
Tabela 5.4 Análise de diversidade e equitabilidade das amostras do plasmidoma e metagenoma.....	67
Tabela 6.1 Parâmetros físico-químicos avaliados pela CETESB nos pontos amostrados e comparação dos limites estabelecidos pelo CONAMA.....	81
Tabela 6.2 Concentração de metais pesados encontrados nas amostras do rio Tietê.....	88

Tabela em anexo

Tabela 5.1A: Genes relacionados a resistência a metais pesados e antibióticos nos pontos TITR 02800 e TIET 02400 no plasmidoma.....	118
--	-----

LISTA DE ABREVIATURAS

ARG	Antibiotic Resistance Gene
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
COT	Carbono Orgânico Total
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
gDNA	DNA genômico
IQA	Índice de Qualidade da Água
MG-RAST	Metagenomic Rapid Annotations using Subsystems Technology
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OD	Oxigênio Dissolvido
PCA	Análise de Componentes Principais
QIIME	Quantitative Insights Into Microbial Ecology
PCJ	Piracicaba Capivari Jundiá
PFGE	Pulsed Field Gel Electroforesis
T-RLFP	Terminal Restriction Fragments Length Polymorphism
UGRHI	Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	CAPÍTULO 1: REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1	AMBIENTES DE ÁGUA DOCE	20
2.2	BACIA HIDROGRÁFICA DO TIETÊ	21
2.3	FATORES QUE MODULAM A DIVERSIDADE BACTERIANA	24
2.4	MOBILOMA	26
2.4.1	PLASMIDOMA	28
3	OBJETIVOS	32
3.1	OBJETIVO GERAL	32
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
4	CAPÍTULO 2: ANÁLISE DO PERFIL FUNCIONAL EM METAGENOMA DE ÁGUA DOCE	33
4.1	RESUMO	33
4.2	INTRODUÇÃO	34
4.3	MATERIAL E MÉTODOS	36
4.3.1	AMOSTRAS UTILIZADAS	36
4.3.2	ANÁLISE DO PERFIL FUNCIONAL	37
4.3.3	COMPARAÇÃO DO PERFIL FUNCIONAL	38
4.3.4	CORE METAGENÔMICO E BUSCA DE GENES ESPECÍFICOS	38
4.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.4.1	ANÁLISE GERAL DO PERFIL FUNCIONAL	38
4.4.2	COMPARAÇÃO ENTRE CORE METAGENÔMICO E GENES ACESSÓRIOS	46
4.5	CONCLUSÕES	49
5	CAPÍTULO 3: CARACTERÍSTICAS AMBIENTAIS E EFEITOS ANTRÓPICOS MODULAM A DIVERSIDADE DE PLASMÍDEOS NO RIO TIETÊ, BRASIL.	51
5.1	RESUMO	51
5.2	INTRODUÇÃO	51
5.3	METODOLOGIA	53
5.3.1	COLETA DAS AMOSTRAS E PROCESSAMENTO	53
5.3.2	PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS	54
5.3.3	EXTRAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL	54
5.3.4	ANÁLISE DO GENE 16S rRNA	56
5.3.5	ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA	56
5.4	RESULTADOS	58
5.4.1	PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS	58
5.4.2	ANÁLISE DO DNA PLASMIDIAL	59
5.4.3	ANÁLISE FUNCIONAL	60

5.4.4	POSSÍVEIS HOSPEDEIROS DOS PLASMÍDEOS PRESENTES NO RIO TIETÊ	63
5.5	DISCUSSÃO	69
6	<u>CAPÍTULO 4: DIVERSIDADE DE GENES QUE CONFEREM RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS</u>	75
6.1	RESUMO	75
6.2	INTRODUÇÃO	76
6.3	MATERIAL E MÉTODOS	78
6.3.1	PONTOS AMOSTRADOS	78
6.3.2	EXTRAÇÃO DO DNA E SEQUENCIAMENTO	79
6.3.3	PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS	80
6.3.4	ANÁLISES BIOINFORMÁTICAS	80
6.3.5	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	81
6.4	RESULTADOS	81
6.4.1	PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS	81
6.4.2	CORRELAÇÃO ENTRE OS PONTOS BASEADO NA RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS	83
6.4.3	DIVERSIDADE DE GENES QUE CONFEREM RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS	84
6.4.4	INFLUÊNCIA DOS FATORES AMBIENTAIS NA DISTRIBUIÇÃO DOS GENES DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS	88
6.5	DISCUSSÃO	91
7	<u>CONCLUSÕES</u>	96
8	<u>CONSIDERAÇÕES FINAIS</u>	98
	<u>REFERÊNCIAS</u>	99
	<u>ANEXOS</u>	118

1 INTRODUÇÃO

A presença de micro-organismos no ambiente é a principal forma de manutenção dos ecossistemas, participando de diversos processos como ciclagem de carbono, fixação biológica de nitrogênio, transformação de compostos xenobióticos, dentre outros. Diversos estudos vêm sendo realizados para entender os impactos ambientais na comunidade microbiana de ambientes de água doce, porém no Brasil, ainda vem sendo negligenciados estes estudos, principalmente no que diz respeito às alterações na diversidade funcional de micro-organismos, os quais podem afetar processos metabólicos, e conseqüentemente a ciclagem dos nutrientes. Com a atividade antrópica, são observadas mudanças da diversidade microbiana nos ecossistemas, e conseqüentemente seu funcionamento. Esta alteração pode acarretar a extinção de espécies capazes de promover a manutenção destes ambientes e o equilíbrio ecológico. À medida que alterações ambientais ocorrem, esta diversidade pode sofrer mudanças, uma vez que a riqueza, abundância e a diversidade são reguladas por fatores físico-químicos, tais como fotoperíodo, temperatura e demanda por nutrientes, além das próprias interações entre as espécies presentes. Essas variações podem ser determinantes para a distribuição de espécies de micro-organismos, as quais podem aumentar o potencial de estabelecimento de espécies exóticas (invasibilidade). Dessa forma, impactos ambientais como descarte de efluentes não tratados contribuem para a rápida alteração desses ecossistemas. Adicionalmente, ocorre um acúmulo de metais tóxicos, prejudicando a qualidade das águas e atividades dependentes do seu uso, desde domésticas e agrícolas até as atividades industriais.

A transferência horizontal de genes vem sendo considerada como sendo uma estratégia importante no âmbito evolutivo. Os principais estudos realizados atualmente sobre mobiloma são desenvolvidos para entender a disseminação de genes de resistência a antibióticos, porém a transferência de genes ocorre em diversas situações no ambiente, muitas vezes como consequência de alterações ambientais específicas, podendo inclusive estar associada à diversidade metabólica encontrada em ambientes específicos. Na transferência de genes, os principais

estudos são relacionados às mudanças nos perfis fenotípicos de resistência, porém existem genes de importâncias biotecnológicas que estão presentes nestes mobilomas e que não têm sido estudados. As condições de ativação e principalmente transferência destes genes passam a ser importantes para um maior entendimento destes processos, incluindo aspectos evolutivos que permitem a estruturação de comunidades microbianas em ambientes impactados ou que passaram por alterações físico-químicas drásticas.

2 Capítulo 1: REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Ambientes de água doce

Sistemas de água doce são de importância vital para a manutenção da população, além de contribuir com a produção agrícola e processos industriais que auxiliam diretamente na vida humana (HOLLAND et al., 2015). A demanda de água doce para os diversos usos, incluindo consumo e geração de energia tem sido um dos maiores desafios para a sociedade nos últimos anos, visto que este sistema se encontra em crise devido à escassez de água de qualidade (GLEICK; PALANIAPPAN, 2010). Um dos maiores problemas referente ao consumo de água se dá pelo aumento populacional no último século, que passou de 1,6 bilhões em 1900 para 6,9 bilhões em 2010 (KLEIN GOLDEWIJK; BEUSEN; JANSSEN, 2010; KUMMU et al., 2011). Além disso, acredita-se que aproximadamente 35 milhões de Km³ de água doce se encontram inacessíveis (HOLLAND et al., 2015). Hoje, encontram-se disponíveis 50,000 km³/ano de água, sendo apenas 10% deste montante próprio para consumo humano (ZHAN-MING; CHEN, 2013; SCHMIED et al., 2014). Destes 10%, aproximadamente 1.234 km³/ano (91,85%) dos 1.314 km³/ano disponíveis são destinados a agricultura, ou seja, o setor que mais consome água doce no mundo, e conseqüentemente o principal fator de pressão sobre os recursos de água doce (HOEKSTRA; MEKONNEN, 2012). O consumo de água pela indústria doméstica é de aproximadamente 77 km³/ano (5,88%) (HOEKSTRA; MEKONNEN, 2012).

Considerando a importância da água doce, a escassez tem sido um tema recorrente (VOLLMER; REGAN; ANDELMAN, 2016). Apesar da água ser um recurso renovável, a falta desta se dá pelo aumento da demanda em relação a capacidade de renovação (TAYLOR, 2009). Além da capacidade de manter as necessidades populacionais, a disponibilidade de água doce mantém a dinâmica funcional nos diversos ecossistemas e biodiversidade, e alterações tanto na biodisponibilidade quanto na qualidade tem resultado em alterações nos ecossistemas (DAMKJAER; TAYLOR, 2017). Estas alterações podem se dar tanto por fatores naturais, como furacões, tornados, lixiviação, entre outros, quanto pela atividade antrópica. Com o aumento populacional e o aumento das zonas urbanas, tem sido observado alterações no fluxo dos corpos d'água, que levam a alteração da diversidade e do fluxo natural do ecossistema (PERGENT-MARTINI; LEJEUSNE; CHEVALDONNE, 2009; KUMMU et al., 2011). Além disto, tem ocorrido um aumento do despejo de materiais nos corpos

de água doce, caracterizando-os como ambientes poluídos, alterando de forma significativa os recursos disponíveis naqueles ambientes e, conseqüente alterações na biodiversidade (NEWTON et al., 2011; PICCINI; GARCÍA-ALONSO, 2015).

Alterações ambientais podem levar a modificações nos índices de riqueza e diversidade. Além do aumento do despejo de resíduos oriundos da ação antrópica, também podem ser ressaltadas a perda de habitat, simplificação trófica da comunidade biológica e limitações nutricionais (LEGENDRE, 2014; SOCOLAR et al., 2015). Em um estudo realizado no Parque Estadual da Serra do Mar (Núcleo Picinguaba, São Paulo, SP), foram verificadas alterações da diversidade da macrofauna, microfauna e bacteriana, induzidos por alterações nas condições dos habitats, tais como aquecimento, predadores superiores e tamanho do habitat. De forma geral, foram verificadas alterações nas diversidades alfa e beta da macrofauna e microfauna, além de aumento na riqueza bacteriana com o aumento da temperatura (ANTIQUERA et al., 2018).

A atividade antrópica pode induzir a variação em diversos fatores, tais como os níveis de DQO, DBO, nitrogênio amoniacal e oxigênio dissolvido na água, que afetam significativamente a comunidade bacteriana (MALOUFI et al., 2016; GARCIA-NAVARRO et al., 2018). De forma geral, a eutrofização de rios altera a composição nutricional e as características físico-químicas deste ambiente, e estes fatores em específico, são determinantes para a seleção de micro-organismos, predominando linhagens bacterianas que apresentam maior plasticidade fenotípica. Além disto, alguns trabalhos observaram a predominância de micro-organismos r estrategistas em ambientes impactados, principalmente pela possibilidade de explorar fontes alternativas de nutrientes (EVANS; WALLENSTEIN, 2014; VUONO et al., 2015).

2.2 Bacia Hidrográfica do Tietê

O rio Tietê nasce na Serra do Mar e flui para o interior do estado de São Paulo percorrendo 1.136 km até desaguar no rio Paraná (DEPARTAMENTO DE ÁGUAS E ENERGIA ELÉTRICA – DAEE, 2011). A nascente está localizada em uma área preservada de Mata Atlântica no município de Salesópolis (SP) (MORTATTI; DE MORAES; PROBST, 2012). Em seu trajeto original cruzava florestas latifoliadas tropicais semi-decíduas, matas ciliares e várzeas, além de trechos de cerrados e cerradões. A bacia hidrográfica do Rio Tietê banha 62 municípios e é subdividido em

seis Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos (UGRHs), nomeadas 1) Alto Tietê, 2) Piracicaba/Capivari/Jundiaí (PCJ), 3) Tietê Sorocaba, 4) Tietê Jacaré, 5) Tietê Batalha e 6) Baixo Tietê (DAEE, 2011; PAGANINI, 2008). Estas UGRHs do Estado de São Paulo são classificadas de acordo com a atividade econômica de cada região (Fig. 2.1), permitindo prever o impacto causado pelas atividades econômicas desenvolvidas na qualidade de água dos rios da Bacia do Tietê.



Figura 2.1: Classificação das Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos (UGRHs) diferenciadas por atividade econômica. (Fonte: CETESB, 2016)

O Rio Tietê desempenha papel estratégico do ponto de vista ambiental, visto que grande parte do seu território está inserido em áreas de mananciais. Além disto, no Alto Tietê estão presentes os municípios que fazem parte da Reserva da Biosfera do Cinturão Verde da Cidade de São Paulo. A Mata Atlântica é internacionalmente reconhecida como um dos cinco mais importantes *hotspots* – as áreas mais ricas em biodiversidade e mais ameaçadas em todo o mundo (MYERS et al., 2000). Segundo dados da Cetesb (1995, 1999) os remanescentes na bacia hidrográfica do Alto Tietê são importantes para a manutenção dos mananciais existentes, porém, essa região apresenta um grande avanço das áreas industriais e urbanas, sendo que as ações antrópicas são as principais causas de perda de biodiversidade (FORYS; ALLEN; WOJCIK, 2002; RICKMAN; CONNOR, 2003).

Com o passar dos anos, áreas naturais no Rio Tietê foram sendo reduzidas em decorrência da atividade antrópica, principalmente pela crescente ocupação do solo, da destruição e substituição das formações vegetais primitivas por pastagens e culturas, ocasionando impactos sobre a fauna, flora e comunidade microbiana associada ao rio e à mata ciliar (MORTATTI; MENEGHEL DE MORAES; PROBST, 2011). A região do Alto Tietê compreende uma área drenada pelo rio Tietê, desde sua nascente em Salesópolis até a Barragem do Rasgão próximo a Pirapora do Bom Jesus (SP). Esta área corresponde praticamente a 34 municípios, incluindo a Região Metropolitana de São Paulo, ocupando uma área de aproximadamente 5.985 km², sendo a região onde o rio recebe grande parte dos poluentes industriais e esgoto doméstico (CETESB, 2015). Estima-se que o rio Tietê receba aproximadamente 700 toneladas de esgoto diariamente, fazendo com que a qualidade da água na região do Alto Tietê seja classificada como péssima (CETESB, 2016) e o rio considerado “morto” (PAGANINI, 2008), devido a ausência de oxigênio dissolvido (LIMA, 2015; RADA, 2017).

O percentual de coleta de esgoto é considerado satisfatório na bacia do Rio Tietê, porém as sub-bacias do Alto Tietê e PCJ (maiores geradoras de esgoto no Estado) contam com os menores índices de coleta, além de apresentar os menores percentuais de tratamento de esgoto. Ou seja, as maiores geradoras de cargas orgânicas são as que menos tratam o esgoto coletado. A carga orgânica lançada diariamente nos corpos d'água da região chega a 1.366.305 Kg DBO_{5,2}/dia, sendo que o Alto do Tietê e PCJ contribuem com 72,8% e 18,5%, respectivamente (CETESB, 2015).

Projetos para diminuir a carga de resíduos despejados no Rio Tietê tiveram andamento em 1991, com o objetivo de coletar e tratar o esgoto da região metropolitana de São Paulo, melhorando a qualidade da água do rio (DEVKOTA; IMBERGER, 2012). Este projeto resultou na coleta de 87% do esgoto na região metropolitana de São Paulo, porém apenas 68% desse era tratado. Entretanto, mesmo que os objetivos não tenham sido plenamente alcançados, a mancha de poluição, trecho do rio considerado “morto” devido à baixa disponibilidade de oxigênio dissolvido na água, diminuiu 86,6% desde o início do projeto. Em 2014 foi verificado que a porcentagem de esgoto tratado foi inferior a 68%, (AFIUNE; MOT 2015; RIBEIRO, 2016), demonstrando que o aumento na capacidade de tratamento do

esgoto está abaixo da taxa de crescimento de produção próximas a este efluente. Projetos para diminuir a carga de resíduos despejados no Rio Tietê tiveram início em 1991, com o objetivo de coletar e tratar o esgoto da região metropolitana de São Paulo, melhorando a qualidade da água do rio (DEVKOTA; IMBERGER, 2012).

A atividade industrial predominante na sub-bacia Tiete/Sorocaba é a agricultura, porém ainda é possível detectar contaminantes industriais nesta região. Os contaminantes industriais presentes na sub-bacia Tiete/Sorocaba são oriundos do despejo destes na sub-bacia do Alto Tietê e que ainda não foram eliminados por processos biológicos (autodepuração) (ORTIZ-VERA et al., 2018). Os poluentes gerados nas sub-bacias do Alto Tietê, PCJ e Tietê/Sorocaba são todos descarregados no Reservatório de Barra Bonita. Neste contexto, antes mesmo de chegar no reservatório de Barra Bonita, as águas do rio Tietê recuperam seu aspecto de rio limpo, atividades de pesca e navegação são frequentes nessa região do rio. As sub-bacias Tietê/Jacaré, Tietê/Batalha e Baixo Tietê, a jusante do reservatório, apresentam menor densidade populacional, sendo atividades econômicas relacionadas com pesca e agricultura (PAGANINI, 2008). As águas dessa região apresentam qualidades boas ou ótimas (CETESB, 2016), mostrando que a maior parte da matéria orgânica despejada no rio é degradada no seu percurso a jusante da cidade de São Paulo. Entretanto, pouco se sabe sobre a variação da comunidade microbiana ao longo deste rio.

2.3 Fatores que modulam a diversidade bacteriana

Biomassas de água doce são importantes do ponto de vista ecológico para a manutenção dos ecossistemas, principalmente por desempenhar um papel essencial no armazenamento e transformação da matéria orgânica terrestre, processo conhecido como ciclos biogeoquímicos de nutrientes (COLE et al., 2007a). Os principais ciclos biogeoquímicos influenciados pela atividade biológica em ambientes de água doce são carbono (C), nitrogênio (N) e enxofre (S). Além disto, compostos xenobióticos comumente tem como destino final os ambientes de água doce, e nestes ambientes ocorrem processos de biorremediação, principalmente de metais e agroquímicos, devido a ação de micro-organismos (MADSEN, 2011).

As bactérias representam os principais organismos da comunidade biológica aquática, sendo os principais responsáveis pela transformação dos nutrientes e são consideradas essenciais para o fluxo de energia nesses ambientes (NEWTON et al., 2011; NEWTON; MCLELLAN, 2015), incluindo a nitrificação, desnitrificação e a fixação biológica de nitrogênio (ZEGLIN, 2015).

Tem sido descrito que a microbiota em ambientes de água doce é dominada pelos filos bacterianos Cianobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Proteobacteria e Verrucomicrobia (ZWART et al., 2002; FIGUEROA et al., 2013; ROSSUM et al., 2015; ÁVILA et al., 2017; REN et al., 2017). Com relação as classes bacterianas, amostras de água doce são dominados pela classe β -proteobacteria, que são ausentes em ambientes marinhos (CHIARAMONTE; ROBERTO; PAGIORO, 2014). Com relação ao estado trófico nos ambientes de água doce, a classe γ -proteobacteria é mais abundante em ambientes com elevada ação antrópica, por outro lado, a classe β -proteobacteria é enriquecida em áreas preservadas, característico de ambientes não impactados (MEZITI; TSEMENTZI, 2016). Segundo ZHAO et al. (2014), ambientes contaminados com zinco e arsênio são dominados pelas espécies *Acinetobacter johnsonii*, *Clostridium cellulovorans* (encontradas também nas regiões com baixas concentrações de metais pesados, porém em menor abundância), e *Trichococcus pasteurii*, exclusiva dos pontos contaminados.

Dentre as alterações naturais do ambiente, a precipitação é um fator determinante para a alteração na diversidade bacteriana (DI et al., 2017). Em períodos com elevadas taxas de precipitação pode ser observado a predominância das famílias Comamonadaceae e Sphingobacteriaceae, bactérias mais abundantes em ambientes de água doce. Porém, em períodos com baixa taxa de precipitação há a predominância das famílias Rhodobacterales e Oceanospirillales, famílias encontradas em ambientes marinhos. Estes dados foram gerados a partir de amostras do Estuário de Bilbao, um ambiente que pode conter elevadas concentrações de sal (30ppt), o que poderia justificar a dominância de bactérias presentes em ambientes marinhos (AGUIRRE et al., 2017).

Estima-se que 35% da comunidade bacteriana em esgotos domésticos seja composta pelos gêneros Actinobacter, Aeromonas, Arcobacter, Pseudomonas e Trichococcus (MCLELLAN; FISHER; NEWTON, 2015). O despejo de esgotos traz uma nova comunidade nos corpos d'água, além de alterar a concentração de

nutrientes e a presença de algumas substâncias tóxicas, que afetam diretamente a estrutura da comunidade bacteriana nativa. A presença de micro-habitat dentro de ambientes de água doce levam a alteração na microbiota de forma significativa, visto o aumento da competição de nutrientes, além do aumento de linhagens oportunistas e a predominância de bactérias resistentes a substâncias tóxicas (DAVOLOS; PIETRANGELI, 2013). Rios e lenções freáticos geralmente são os destinos finais para agroquímicos, o que leva a processos seletivos permitindo a dominância de linhagens bacterianas com capacidade de resistir a presença destes compostos xenobióticos, seja por processos de degradação ou por sistemas de bombas de efluxo (CAVALCANTE et al., 2016). Estudos recentes estudos têm comprovado que genes que codificam bombas de efluxo podem conferir resistência a agroquímicos e para algumas bactérias estes mesmos genes estão associados à resistência a antibióticos. Sob esta situação, é possível levantar a hipótese de que compostos tóxicos em um determinado ambiente pode selecionar bactérias resistentes a múltiplos fatores de seleção (KURENBACH et al., 2015, 2017). Desta forma, em ambientes de água doce, que geralmente são os recipientes finais para cargas de compostos tóxicos, pode haver a persistência de organismos resistentes a vários compostos xenobióticos, fator este que poderia ser ampliado posteriormente pela transferência horizontal de genes.

2.4 Mobiloma

O processo em que segmentos de DNA apresentam capacidade de se mover dentro do genoma ou entre células bacterianas é chamado mobiloma (FROST et al., 2005). Existem três formas fundamentais para que ocorra este processo: transformação, transdução e a conjugação. A conjugação é caracterizada por apresentar replicação independente da célula, que também proporciona a transferência de plasmídeos de uma célula doadora para uma receptora, fazendo com que ambas apresentem as características dos genes contidos no plasmídeo (THOMAS; NIELSEN, 2005).

Diversos estudos são realizados com o objetivo de observar a transferência de genes que conferem patogenicidade, porém existem poucos estudos voltados à interações benéficas, principalmente no ambiente (GARMENDIA et al., 2012). Estes estudos de transferência horizontal são considerados evidências evolutivas, já que

este fenômeno pode transferir genes que codificam resistência a determinadas condições às células anteriormente suscetíveis (GILLINGS, 2013), ou podem também conferir habilidade de utilizar ou sintetizar diferentes moléculas que aumentam a sua adaptação no ambiente.

A ação antrópica apresenta um forte impacto sobre as comunidades microbianas, sendo possível a observação de transferência de genes que conferem resistência dentro de comunidades bacterianas, visto que a utilização de antibióticos, compostos xenobióticos e metais pesados aumentam a sua concentração no ambiente, levando à seleção de micro-organismos que apresentam genes que conferem resistência a estas condições. Assim, aqueles genes presentes principalmente em plasmídeos podem ser transferidos entre membros da mesma espécie ou de espécies diferentes (SENTCHILO et al., 2013).

As alterações ambientais, além de participar de modificações na diversidade da microbiota, também determina a riqueza e abundância de determinados elementos móveis. Segundo Kav et al. (2012), no rumem bovino há a presença de determinados plasmídeos que variam em relação ao tempo em que foram realizadas as coletas, sendo determinadas pelo nicho ecológico, além da alteração da diversidade da microbiota (KAV et al., 2012).

Foi observada em bactérias de solo a presença de genes essenciais localizados em plasmídeos, os quais apresentavam genes importantes e até mesmo essenciais para a capacidade de adaptação e competitividade com outras bactérias do ambiente (MAZUR; KOPER, 2012), sugerindo que a transferência destes elementos móveis pode estar associada à uma maior adaptação de bactérias compatíveis ao ambiente.

Os principais trabalhos voltados a mobiloma são focados nos estudos com genes de resistência a antibióticos. Segundo GILLINGS (2013), estes trabalhos podem ser comparados com outros tipos de poluentes, e em outros biomas, como o solo, água doce e sedimentos de rios. A alteração na diversidade bacteriana decorrentes da aplicação de poluentes no ambiente está diretamente ligada a recombinação gênica e principalmente ao mobiloma, principalmente quando se refere a resistência e degradação de compostos xenobióticos (SCHLACHER; GOODMAN, 2007). Como consequência da ação antrópica e a presença de mobilomas, ocorre a formação de

hotspots no ambiente, que determinam os processos evolutivos e a fixação de determinadas linhagens mediadas por condições seletivas (GILLINGS et al., 2009).

Em trabalho recente, BROWN et al. (2013a) caracterizaram a estrutura básica de plasmídeos e seus genes acessórios obtidos de água limpa, sem seleção prévia para características fenotípicas e ou cultivo dos micro-organismos hospedeiros (BROWN et al., 2013b). Baseado na sequência completa de 10 plasmídeos, os autores observaram que estes plasmídeos pertenciam a 6 grupos de incompatibilidade, sendo 4 grupos já conhecidos (IncN, IncP-1, IncU e IncW) e 2 potencialmente novos. Também foram observadas 5 regiões com genes acessórios, sendo que nenhuma carregava genes de resistência a antibióticos. Entretanto, 8 plasmídeos foram mobilizáveis entre α , β e γ -proteobacteria, sugerindo que estes plasmídeos, embora não carreguem genes reconhecidamente associados a uma maior adaptação ao ambiente, podem estar associados a processos evolutivos da comunidade microbiana. Jorgensen et al. (2014) sugerem que plasmídeos crípticos, observados por análises metagenômicas, poderiam servir como reservatório de sequências de recombinação que poderiam atuar em processos evolutivos bacterianos, além de serem fontes de novos sistemas de replicação de DNA. Estes resultados mostram o quanto ainda é reduzido o conhecimento sobre a presença e o papel de elementos móveis, como os plasmídeos, no ambiente (JØRGENSEN et al., 2014).

2.4.1 *Plasmidoma*

Uma das formas de se estudar o mobiloma é pela análise da diversidade de plasmídeos. Os plasmídeos são materiais genéticos extracromossomais com capacidade de se replicarem independentemente do cromossomo. A principal característica dos plasmídeos é a capacidade de serem transferidos entre hospedeiros. Os genes contidos nos plasmídeos não exercem características essenciais para o desenvolvimento bacteriano, porém contém genes acessórios que podem garantir aumento no *fitness* ecológico (HARRISON; BROCKHURST, 2012). Os genes contidos em plasmídeos podem apresentar interesse clínico, como genes que conferem resistência a antibióticos ou produção de exotoxinas; interesse biotecnológico, como genes que sintetizam enzimas de interesse industrial; e por fim interesse ecológico, como genes que aumentam a capacidade de adaptação a condições ambientais.

Diversos trabalhos já foram desenvolvidos com o objetivo de analisar a diversidade de plasmídeos. Em sua maioria, a avaliação dos plasmídeos em bactérias cultiváveis tem seu foco em linhagens patogênicas, com interesse clínico (LIU et al., 2016; NORDMANN; POIREL, 2016). Com relação a importância ambiental, as linhagens são avaliadas quanto a presença de genes que conferem resistência a antibióticos (SKOV; MONNET, 2016; DANG et al., 2017). Alguns poucos trabalhos avaliam a presença de plasmídeos e a sua relação com o aumento do *fitness* ecológico em decorrência das condições ambientais, sendo um desses focos a análise de genes que possibilitem a capacidade de tolerar metais pesados como zinco, cobre, cádmio, prata e níquel (SAMANTA et al., 2012; JECHALKE et al., 2015; FESSLE et al., 2017).

Como exemplo da capacidade que plasmídeos tem de influenciar no fenótipo bacteriano, é possível destacar três formas que linhagens bacterianas tem de resistir a antibióticos: alteração do alvo de ação do antimicrobiano (PIEKARSKA et al., 2015); ação de bombas de efluxo (DELMAR; SU; YU, 2014) ou pela presença de genes envolvidos na degradação/inativação de antibióticos (TOPP et al., 2013; ZHOU et al., 2016). Geralmente, os genes que conferem resistência são encontrados em materiais genéticos móveis, principalmente em plasmídeos (NATH DAS; MANDAL; MANDAL, 2016), além de também existirem genes que codificam bombas de efluxo (ZHANG; ZHANG; YE, 2011). Em um trabalho realizado por Chenia (2016), foram isolados 34 cepas de *Aeromonas* spp. e analisados quanto a resistência a quinolonas. Além de serem analisados a ação de bombas de efluxo e mutações nas proteínas GyrA e ParC (alvos das quinolonas), foi avaliado a presença dos genes *qnr* e *aac-6'-Ib-cr* em sequências plasmidiais. Apesar do gene *aac-6'-Ib-cr* não estar presente, foi possível verificar a presença dos genes *qnrB* e *qnrS*, comprovando que os plasmídeos presentes em *Aeromonas* spp. são um dos principais responsáveis pela capacidade de tolerar fluoroquinolonas em água doce (cultivos de peixes).

Alguns plasmídeos podem conter mais genes que conferem aumento no *fitness* ecológico. Em algumas situações, a pressão de seleção para a persistência de um plasmídeo é mantida pela presença de metais pesados, porém alguns plasmídeos podem conter genes que também conferem resistência a antimicrobianos, levando a um processo chamado co-seleção (NATH DAS; MANDAL; MANDAL, 2016). Este processo de co-seleção foi evidenciado no Rio Mahananda (Malda, Índia), em que cepas de *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* apresentavam resistência a

uma série de metais pesados e antibióticos. Foi evidenciado que as cepas isoladas apresentavam apenas um plasmídeo, e após a “cura” plasmidial (retirada do plasmídeo da bactéria) passaram a ser sensíveis a maior parte dos metais pesados e antibióticos (NATH DAS; MANDAL; MANDAL, 2016). Embora estas linhagens de *E. coli* e *P. aeruginosa* tenham sido isoladas fora do ambiente hospitalar, são patogênicas oportunistas (FALKINHAM et al., 2015), e evidências de co-seleção de genes de resistência a antibióticos mediados pela presença de metais pesados em rios pode destacar uma situação emergencial quanto aos cuidados ambientais.

A maior parte das bactérias ainda não é capaz de ser cultivada em laboratório, o que dificulta o entendimento e a importância dos genes que podem ser transferidos lateralmente. Com os avanços nas tecnologias de sequenciamento, se fez possível analisar taxonômica e funcionalmente os genomas de bactérias não cultiváveis. Com isto, também foi possível a análise da diversidade viral e diversidade de plasmídeo baseados em *Next Generation Sequence* (NGS), sendo necessário assim o uso de métodos adequados para a purificação de plasmídeos diretamente de amostras ambientais, excluindo o DNA cromossômico (BROWN KAV; BENHAR; MIZRAHI, 2013a).

O primeiro trabalho descrito que desenvolveu uma técnica eficiente para a análise plasmidial foi desenvolvido por Kav et al., 2012, relacionando uma análise metagenômica para analisar especificamente a diversidade de plasmídeos de amostras de rumem bovino, chamando este tipo de análise de “plasmidoma”. De forma geral, o plasmidoma tem por objetivo avaliar todo o conteúdo gênico plasmidial de um dado ambiente. Este trabalho foi realizado utilizando o rumem de 16 vacas para a extração plasmidial. Inicialmente foi realizado um processo de “purificação”, coletando apenas o conteúdo bacteriano do rumem e posteriormente a extração plasmidial, diferentemente dos estudos de metagenoma convencional que realizam a extração do DNA total. Porém, mesmo utilizando metodologias para extração do DNA plasmidial, ainda existe “contaminação” com o DNA cromossômico. Desta forma, foi feito uso de *plasmid-safe DNase*, que se trata de uma exonuclease com capacidade de degradar DNA linear. Como no processo de extração o DNA cromossômico é linearizado, o uso de *plasmid-safe DNase* é eficiente para manter DNAs circulares íntegros (ou seja, os plasmídeos). Como a concentração de DNA é baixa após o tratamento com a exonuclease, se faz necessário amplificação randômica do material

purificado com *phi29*, e posteriormente este material pode ser sequenciado com a plataforma Illumina (BROWN KAV; BENHAR; MIZRAHI, 2013b).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar por meio de análises independentes de cultivo os perfis funcionais de micro-organismos em amostras de água doce, bem como analisar a diversidade de plasmídeos e genes que conferem resistência a antibióticos correlacionando com as características ambientais.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar *in silico* o perfil funcional de amostras metagenômicas de ambientes de água doce obtidos de bibliotecas públicas;
- Analisar o perfil funcional e taxonômico do plasmidoma obtido em dois pontos do rio Tietê;
- Correlacionar a diversidade taxonômica baseada em bibliotecas do gene 16SrRNA com a diversidade obtida pela análise do plasmidoma
- Caracterizar físico-quimicamente as amostras de água em quatro pontos contrastantes quanto ao IQA;
- Determinar a abundância de genes que conferem resistência a antibióticos em amostras de metagenoma total em quatro pontos do rio Tietê;
- Correlacionar os genes de resistência a antibióticos com as características ambientais, bem como avaliar possíveis eventos de co-seleção.

4 CAPÍTULO 2: ANÁLISE DO PERFIL FUNCIONAL EM METAGENOMA DE ÁGUA DOCE

4.1 Resumo

Apesar da importância da água doce para a vida na Terra, apenas 0,01% de toda a água estão disponíveis para consumo, sendo outros 99,99% representado por ambientes marinhos e lagos salgados. A má utilização deste recurso é um problema recorrente, sendo um dos principais problemas o despejo de resíduos domésticos e industriais que reduzem a disponibilidade de água para consumo. A presença da matéria orgânica dissolvida em corpos de água doce está diretamente relacionada com a atividade antrópica, bem como as concentrações de poluentes orgânicos persistentes, como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e policlorobifenóis. É conhecido que micro-organismos estão relacionados aos ciclos biogeoquímicos, além de participarem da descontaminação de ambientes pelo processo conhecido como autodepuração. A diversidade bacteriana é bem conhecida em ambientes de água doce, porém a diversidade funcional é pouco explorada. Por este motivo, o objetivo deste trabalho foi descrever as funções gerais encontradas em metagenomas dos diversos ambientes de água doce. O perfil funcional permitiu separar os metagenomas em três grupos baseado na anotação do genes e potenciais funções presentes. A característica ambiental das amostras diferiu por genes cujas funções são relacionadas a salinidade. Apesar de se tratar de amostras de água doce, há um aumento da salinidade da água em regiões próximas aos oceanos. É conhecido que os grupos bacterianos e conseqüentemente o perfil funcional é diferente em água doce e ambientes marinhos, porém foi observado que a presença de sal, mesmo que em baixas concentrações, podem modular o perfil gênico de linhagens bacterianas. Dentre os genes exclusivos em cada grupo, a maior parte deles codifica proteínas hipotéticas, sugerindo se tratar de funções não conhecidas presentes nestes ambientes ainda pouco estudados. Já com relação aos genes relacionados a cada cluster determinado pela análise de correlações, os clusters diferiram de acordo com o perfil funcional associado a cada ambiente. O cluster 1 foi caracterizado por genes que codificam proteínas associadas à metabolização de enxofre. Já os clusters 2 e 3 diferiram pela presença de genes que codificam proteínas associadas à tolerância a

elevadas concentrações de sais. Neste contexto, o cluster 2 (com maior abundância de genes que codificam transportadores de sódio) inclui amostras de ambientes com maiores concentrações de sais se comparado com o cluster 3. Desta forma, foi possível determinar que a seleção de genes é diretamente relacionada a pressão de seleção determinada pelo ambiente, que nas amostras avaliadas foi determinada pelo gradiente de salinidade em ambientes de água doce. Além disto, foi possível destacar que a posição geográfica apresenta um efeito menor sobre o perfil metabólico quando comparado com as características ambientais.

Palavras-chave: Diversidade funcional, salinidade, metagenômica.

4.2 Introdução

Ambientes de água doce representam cerca de 0,01% da água do mundo, cobrindo apenas 0,8% da superfície da Terra (DUDGEON et al., 2006; STRAYER; DUDGEON, 2010). Estes ambientes apresentam importância socioeconômica, sendo utilizados como fonte de água para beber, transporte, agricultura, atividades recreativas, e em muitos casos, como receptor final de resíduos oriundos da atividade antrópica (SANTOLARIA et al., 2017; SIMON; KELEMEN; BEGY, 2017). Apesar de abrigar uma grande quantidade de espécies vegetais e animais, representando aproximadamente 6% de todas as espécies já descritas (ABELL et al., 2008), os microorganismos representam o grupo mais diverso em água doce, além de ser responsável pelos ciclos biogeoquímicos (FUJIMOTO et al., 2016). Em ambientes de água doce há a prevalência dos filos Cianobactérias, Actinobacterias, Bacteroidetes, Proteobacterias e Verrucomicrobia. Entretanto, até o momento, a maior parte dos estudos de ecologia microbiana nesses ecossistemas é baseado no sequenciamento do gene 16S rRNA, e portanto, a compreensão do potencial metabólico e funcional das comunidades microbianas nesses ambientes permanece pouco compreendido (HAWLEY; HESS, 2014; ESCOBAR-ZEPEDA; DE LEÓN; SANCHEZ-FLORES, 2015; ILIEV et al., 2017). A identificação das vias metabólicas presentes em água doce é fundamental para a elucidação do metabolismo microbiano requerido para a

manutenção desses ecossistemas (CANI; EVERARD, 2016), e consequente redução da carga de matéria orgânica que chega ao corpo d'água.

A maioria dos estudos metagenômicos é voltada para ambientes extremos (BHAYA et al., 2007), marinhos (KODZIUS; GOJOBORI, 2015) ou microbiota associado a humanos (OH et al., 2014). Os micro-organismos são diretamente afetados por alterações ambientais, sejam elas naturais ou oriundas da atividade antrópica (WAN et al., 2017). A avaliação do metagenoma auxilia no entendimento de quais genes e vias metabólicas podem estar sendo mantidas em resposta a perturbações ambientais (PLEWNIAK et al., 2013). Rotas metabólicas ativas sob determinadas circunstâncias ambientais podem apresentar interesse clínico, como as vias de resistência a antibióticos, e interesses biotecnológicos, como na prospecção de enzimas utilizadas na indústria (ZHANG; LYND, 2004).

Determinados sistemas de resposta a antibióticos são induzidos na presença de agroquímicos, levantando a hipótese de que em solos e rios, onde há a presença de compostos xenobióticos residuais, pode ocorrer à seleção de genes relacionados a resistência a antibióticos (KURENBACH et al., 2017). Desta forma, o perfil funcional microbiano é modulado pelas características ambientais, podendo ser observada a persistência de genes em ambientes com características semelhantes.

Em ambientes com condições extremas, foi verificada a presença de genes voltados a mecanismos de defesa. Em ambientes com pH baixo, como no caso do Rio Tinto foi observado, por meio de análise metagenômicas, uma maior abundância de genes que codificam proteínas associadas à resistência a ambientes ácidos, sendo uma característica determinante para garantir um maior *fitness* ambiental (GUAZZARONI et al., 2013).

Diante da importância dos ambientes de água doce e da escassa informação sobre o papel dos micro-organismos no seu funcionamento, no presente trabalho foram reanalisados dados de 87 amostras metagenômicas visando identificar genes-chaves envolvidos na adaptação dos micro-organismos nos diferentes ambientes de água doce. Sendo assim, o objetivo da presente meta-análise foi avaliar *in silico* o perfil funcional das comunidades bacterianas em ambientes de água doce e correlacionar com as características ambientais e geográficas de cada amostra.

4.3 Material e métodos

4.3.1 Amostras utilizadas

Foram selecionadas 87 bibliotecas metagenômicas gerados por trabalhos anteriores (Tabela 4.1) publicados entre os períodos de 2011 a 2018 (Fig. 4.1). Para isso, os dados de sequenciamento foram obtidos do NCBI e MG-RAST (GLASS; MEYER, 2011). Todos os trabalhos publicados que geram bibliotecas de dados metagenômicos a partir de ambientes de água doce foram utilizados para esta meta-análise.



Figura 4.1: Localização dos pontos de amostragem utilizados para análises do perfil metabólico via análises metagenômicas.

Tabela 4.1: Amostras utilizadas para comparação do perfil funcional.

Artigo (Autor)	Local da coleta	Código NCBI e MG-RAST	No. de Bibliotecas
Brown et al., 2015	Rio James, Virginia, EUA	MG-RAST (4532156.3)	1
Eiler et al., 2014	Lagos Ekoln, Erken, Vattern (Suécia). Lagos Damariscotta, Yellowstone, Mendota, Spark, Trout (EUA).	NCBI (PRJEB4844)	9

Hugerth et al., 2015	Mar Báltico, Costa de Öland (Suécia)	NCBI (PRJNA273799)	36
Oh et al., 2011	Lago Lanier (EUA)	NCBI (PRJNA51219)	5
Satinsky et al., 2014	Rio Amazonas (Brasil)	NCBI (PRJNA237344)	12
Satinsky et al., 2015	Rio Amazonas (Brasil)	NCBI (PRJNA237344)	12
Sharrar et al., 2017	Lago Huron (Canadá/ EUA)	NCBI (PRJNA340051 e PRJNA340052)	2
Toyama et al., 2016	Rio Amazonas (Brasil)	NCBI (PRJNA254927)	4
Tseng et al., 2013	Reservatório de Feitsui (China)	NCBI (PRJNA77217)	6

4.3.2 Análise do perfil funcional

A qualidade dos *reads* foi verificada pelo programa FastQC v0.11.7, e a seleção das sequências com qualidades aceitáveis foi realizada utilizando o programa Trimmomatic v0.36 (BOLGER; LOHSE; USADEL, 2014), retirando os adaptadores e mantendo os *reads* com qualidade maior que Q20 (permissão de 1 erro a cada 100 bases sequenciadas).

A montagem dos genomas foi realizada utilizando o *software* MEGAHIT v1.1.2 (LI et al., 2015a), utilizando *k-mer* mínimo de 27 e *k-mer* máximo de 141, com aumento do tamanho de *k-mer* a cada 12 interações.

Os genes foram selecionados utilizando o *software* Prodigal v2.6.3 (HYATT et al., 2010), sendo estes submetidos para a plataforma WebMGA (WU et al., 2011) para anotação das sequências, que utiliza o RPSBlast v2.2.15, sendo selecionado o banco de dados do *Cluster of Orthologos Group* (COG, NCBI COG 28/03/2017), com um *e-value* mínimo de 10^{-5} .

4.3.3 *Comparação do perfil funcional*

Para as análises comparativas do perfil funcional, foi levado em consideração o número de genes em cada metagenoma. Com o objetivo de diminuir a variação decorrente dos diferentes métodos de sequenciamento, as análises foram desenvolvidas considerando a porcentagem das cópias de cada gene no metagenoma como um método de padronização dos dados. A tabela do perfil funcional obtidas por COG (em nível de função) foram ordenadas por análise de coordenadas principais (PCA), no programa R v3.4.3 (<https://www.r-project.org/>) utilizando o pacote de dados “*vegan*” e o pacote “*ggplot2*” para gerar os gráficos.

4.3.4 *Core metagenômico e busca de genes específicos*

Para a obtenção dos genes presentes no *core* metagenômico, foram mantidos apenas os genes presentes compartilhados em todas as amostras de água doce (COG, nível 2), independentemente da localização ou característica ambiental. A seleção dos genes presentes no *core* metagenômico e genes específicos foram realizados manualmente. A representação dos genes compartilhados foi realizada utilizando programa R, com o pacote “*ggplot2*”.

4.4 Resultados e discussão

4.4.1 *Análise geral do perfil funcional*

As 87 amostras metagenômicas foram ordenadas por PCA e três grupos foram obtidos: o grupo 1 foi composto apenas pelas amostras obtidas da bacia do lago Huron (SHARRAR et al., 2017), o grupo 2 foi formado por todas as amostras do mar Báltico (HUGERTH et al., 2015) e as amostras do rio Amazonas obtidas em Junho de 2010 (SATINSKY et al., 2014). Todas as outras amostras metagenômicas de água doce ficaram reunidas no grupo 3, independente da origem (Fig. 4.2).

As amostras do mar Báltico foram selecionadas por se tratar de um ambiente que apresenta fortes gradientes de salinidade (sentido norte-sudeste), apresentando regiões com concentrações de sal próximas ao encontrado em ambientes de água doce (OJAVEER et al., 2010). Os pontos amostrados para esta análise apresentam a média de salinidade em 8 PSU.

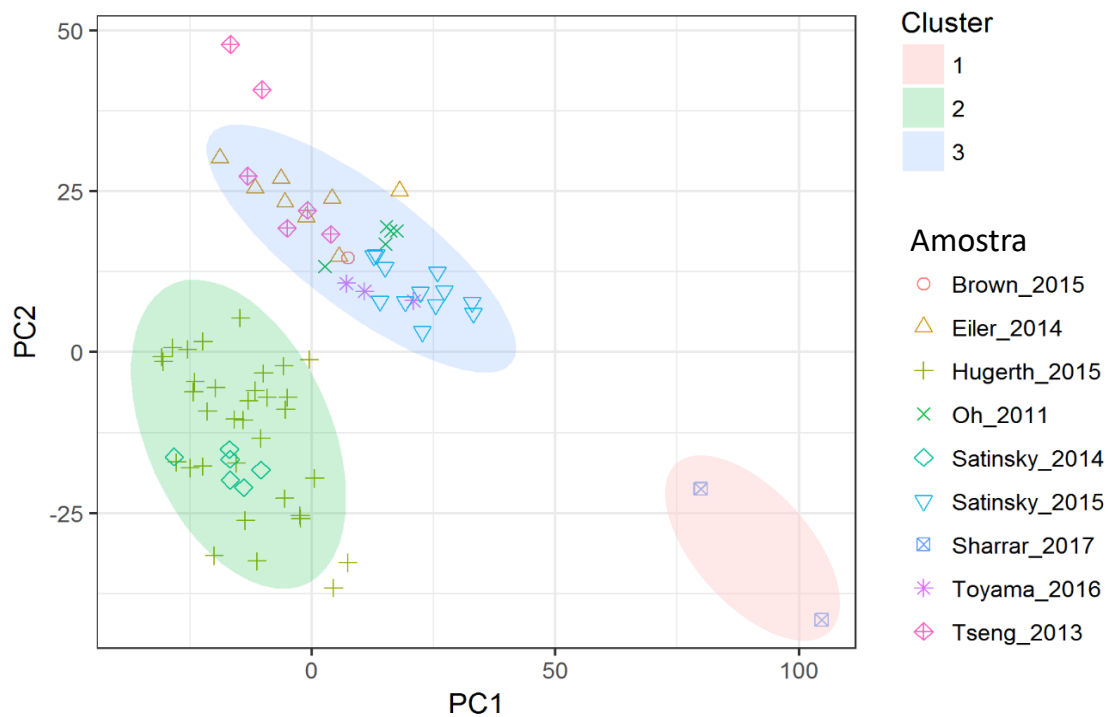


Figura 4.2: Análise de coordenadas principais (PCA) com o perfil funcional (COG- nível de função) das amostras de água doce. Em “Amostra” cita-se os artigos dos quais foram obtidas as amostras. Em cluster se apresentam a representação do agrupamento das amostras.

A matriz de dados metagenômicos foi correlacionada com as variáveis ambientais e a distância geográfica (dados não mostrados). A distância geográfica não apresentou correlação significativa com a ordenação das amostras metagenômicas, como observado com a formação do agrupamento 2, composto por amostras coletadas no Brasil e na Suécia. Uma variável ambiental comum entre o Mar Báltico e o pântano do Rio Amazonas é o elevado nível de salinidade (8 PSU) se comparado aos outros pontos amostrados. A análise do perfil funcional dos genes encontrados no oceano Báltico mostrou que a principal característica físico-química que modula a presença dos genes é o gradiente de salinidade (DUPONT et al., 2014). As amostras metagenômicas do Rio Amazonas presentes no grupo 2, foram as amostras coletadas em pântanos próximos ao Oceano Atlântico, que também apresentavam altos níveis de salinidade (SATINSKY et al., 2014). Desta forma, os

dados obtidos pela análise de PCA corroboram com os descritos quanto a seleção de genes associados à tolerância a gradientes de salinidade.

A análise de correlação dos genes com a ordenação das amostras metagenômicas, mostrou que a principal diferença entre os grupos 2 e 3 é determinada pela abundância de genes associados aos sistemas de osmorregulação ($p < 0,001$). De forma geral, as proteínas envolvidas na regulação e transporte de sódio são encontradas no grupo 2, composto por ambientes caracterizados com maior concentração de sal, já transportadores de potássio correlacionam com o grupo 3, composto por ambientes com concentrações mais baixas de sal. Esses resultados são congruentes com os obtidos na comparação funcional de metagenomas de água doce (amostras do lago Lanier) e água salgada (amostras da costa/estuário de oceano) (OH et al., 2011; TSEMENTZI et al., 2014). Já o grupo 1, que apresenta as amostras do lago Huron é caracterizado por apresentar genes envolvidos no metabolismo do enxofre. Como citado por SHARRAR et al., (2017), amostras do lago Huron são caracterizadas por apresentarem bactérias capazes de metabolizar enxofre. Desta forma, em comparação com as amostras metagenômicas de outras localidades geográficas, genes envolvidos com a metabolização do enxofre foram encontrados de forma mais abundante para o cluster 1 (correlação variando de $r^2=0,5395$ à $0,6277$) (Tabela 4.2).

Tabela 4.2: Análise de correlação baseado na análise de componentes principais (PCA- Fig. 4.2). PC1 e PC2 significam a posição espacial de cada variável analisada; r^2 = correlação; $Pr(>r)$ = significância.

COG	PC1	PC2	R ²	Pr(>r)	Cluster	Classe	Classe	Descrição
COG1553	0,83858	-0,54478	0,6277	0,001	1	P	Transporte e metabolismo de íon inorgânico	Proteína não caracterizada envolvida na redução de enxofre intracelular
COG2923	0,81282	-0,58251	0,5536	0,001	1	P	Transporte e metabolismo de íon inorgânico	Proteína não caracterizada envolvida na oxidação de enxofre intracelular
COG2168	0,87797	-0,47872	0,5395	0,001	1	P	Transporte e metabolismo de íon inorgânico	Proteína não caracterizada envolvida na oxidação de enxofre intracelular
COG2209	-0,50448	-0,86342	0,7513	0,001	2	C	Conservação e produção de energia	Transportador de Na ⁺ -NADH:ubiquinona oxidoreductase, subunidade NqrE
COG2871	-0,54958	-0,83544	0,7159	0,001	2	C	Conservação e produção de energia	Transportador de Na ⁺ -NADH:ubiquinona oxidoreductase, subunidade NqrF
COG2869	-0,41638	-0,90919	0,7044	0,001	2	C	Conservação e produção de energia	Transportador de Na ⁺ -NADH:ubiquinona

								oxidoreductase, subunidade NqrC
COG1726	-0,57788	-0,81612	0,6686	0,001	2	C	Conservação e produção de energia	Transportador de Na ⁺ -NADH:ubiquinone oxidoreductase, subunit NqrA
COG1347	-0,55383	-0,83263	0,6182	0,001	2	C	Conservação e produção de energia	Transportador de Na ⁺ -NADH:ubiquinona oxidoreductase, subunidade NqrD
COG1805	-0,68064	-0,73262	0,4343	0,001	2	C	Conservação e produção de energia	Transportador de Na ⁺ -NADH:ubiquinona oxidoreductase, subunidade NqrB
COG3158	0,71385	0,7003	0,4663	0,001	3	P	Transporte e metabolismo de íon inorgânico	Transportador de K ⁺
COG2060	0,98796	0,15471	0,4996	0,001	3	P	Transporte e metabolismo de íon inorgânico	Transportador de K ⁺ - ATPase, A chain
COG4176	-0,73045	-0,68297	0,7148	0,001	2	E	Transporte e metabolismo de aminoácido	Sistema de transporte tipo ABC proline/glycine betaina, componente permease

COG4175	-0,67929	-0,73387	0,629	0,001	2	E	Transporte e metabolismo de aminoácido	Sistema de transporte tipo ABC proline/glycine betaina, componente ATPase
COG1292	-0,47711	-0,87884	0,6678	0,001	2	M	Parede celular/ membrana/ envelope	Transportador cholina-glycina betaina
COG0534	-0,50074	-0,8656	0,7268	0,001	2	V	Mecanismo de defesa	Bomba de efluxo a multidromas dirigido por Na ⁺
COG3736	0,98352	0,18081	0,418	0,001	3	U	Secreção e transporte vesicular	Sistema de secreção do tipo IV, componente VirB8
COG3504	0,99653	0,08325	0,5466	0,001	3	U	Secreção e transporte vesicular	Sistema de secreção do tipo IV, componente VirB9
COG4962	0,79564	0,60578	0,4491	0,001	3	U	Secreção e transporte vesicular	Proteína de montagem do pilus, ATPase CpaF
COG0286	0,99986	0,01664	0,4668	0,001	3	V	Mecanismo de defesa	Sistema de modificação-restrição tipo I, subunidade metiltransferase
COG1566	0,85772	0,51411	0,4914	0,001	3	V	Mecanismo de defesa	Bomba de efluxo de resistência a multidrogas
COG0841	0,99925	0,03872	0,5262	0,001	3	V	Mecanismo de defesa	Bomba de efluxo a multidrogas/cation

Os genes envolvidos no transporte de Na (Na⁺ transporting NADH:ubiquinone oxidoreductase, COG2209 $r^2= 0,7513$, COG2871 $r^2= 0,7159$, COG 2869 $r^2= 0,7044$, COG1726 $r^2= 0,6686$, COG1347 $r^2= 0,6182$, COG1805 $r^2=0,4343$) (Tabela 4.2) apresentaram correlação significativa ($p<0,001$) com as amostras do grupo 2. Segundo Dupont e colaboradores (DUPONT et al., 2014), Na⁺-translocating (NQR) NADH:quinone dehydrogenases estão envolvidas na respiração bacteriana, e as vias biossintéticas para produção de ubiquinona estão entre os genes mais abundantes em ambientes com elevada salinidade se comparado a ambientes com baixa salinidade. Esses genes são encontrados quase que exclusivamente relacionados com as amostras do oceano Báltico e do pântano do Rio Amazonas. Já genes transportadores de potássio (COG3158 $r^2= 0,4663$, COG2060 $r^2= 0,4996$) correlacionam de forma significativa ao grupo 3 ($p<0,001$), sendo encontrado uma maior abundância desses genes nos genomas das linhagens de água com baixas concentrações de sal. Resultados similares foram também observados ao comparar amostras de solo com amostras marinhas, em que é possível verificar maior abundância de *operons* responsáveis por ativar canais de potássio, considerando que a concentração de potássio neste ambiente é maior, e as concentrações de sódio menores (TRINGE et al., 2005).

Genes transportadores para glicina e prolina betaina também são relacionados a salinidade (FORTUNATO; CRUMP, 2015), e apresentaram correlação significativa ($p<0,001$) com o grupo 2 (COG4176 $r^2=0,7148$, COG4175 $r^2=0,6290$). Alterações do potencial de solutos no meio extracelular induzem a expressão de osmoprotetores, sendo necessários para o balanço osmótico (MORENO-FORERO et al., 2016). O aumento nos níveis intracelulares de colina, prolina betaina, taurina e ácido glutâmico são diretamente relacionados com o aumento da salinidade, sendo prolina e glicina betaina os osmoprotetores mais eficientes (BOSCARI et al., 2002; SCHWAN; WETZEL, 2016). Além dos transportadores de glicina e prolina betaina, foi observada correlação ($r^2= 0,6678$) significativa ($p<0,001$) entre a abundância de genes COG1292 (Choline-glycine betaine transporter,) e o cluster funcional 2.

Genes que codificam a proteína Na⁺-driven multidrug efflux pump (NorM, COG0534) apresenta correlação ($r^2= 0,7268$) significativa ($p<0,001$) com o grupo 2. Esta proteína pertencente à classe de mecanismos de defesa (COG, classe V), sendo

caracterizada como uma bomba de efluxo a multidrogas, chamada *Na⁺-driven multidrug efflux pump*, descrita primeiramente em *Vibrio parahaemolyticus*, porém também pode ser encontrado em outros organismos (MORITA et al., 2000). *V. parahaemolyticus* é uma bactéria patogênica oriunda de ambiente marinho, sendo levemente halófila (LEE et al., 2015). Até o momento, a proteína NorM não foi descrita em ambientes de água doce com níveis mais elevados de salinidade, porém, a correlação deste gene com o grupo 2, que apresenta maior salinidade, e a presença deste gene em linhagens bacterianas de ambientes marinhos pode representam um fator determinante para um maior *fitness* ecológico.

Dentre os genes da classe V (mecanismos de defesa), é possível identificar enzimas envolvidas no sistema de secreção do tipo IV correlacionadas ao grupo 3 (T4SS COG3736 $r^2= 0,4180$, COG3504 $r^2= 0,5466$). O T4SS é responsável pela secreção de determinadas substâncias envolvidas na patogenicidade, porém é o único sistema de secreção com a habilidade de translocar DNA, mediando transferência lateral de genes (CASCALES; CHRISTIE, 2003; COSTA et al., 2015; GREEN; MECSAS, 2015). Além do sistema de secreção, uma proteína envolvida na formação do *pilus* (COG4962) também apresentou correlação significativa ($p<0,001$, $r^2= 0,4491$) com o grupo 2, podendo evidenciar tendência a transferência de genes que poderia auxiliar na adaptação e ganho de *fitness* ecológico por meio de aumento de competitividade no ambiente. Proteínas envolvidas em mecanismos de defesa (COG0286 $r^2=0,4668$, COG1566 $r^2=0,4914$ e COG0841 $r^2=0,5262$), principalmente bombas de efluxo, juntamente com a presença de possível transferência lateral de genes pode evidenciar a necessidade de adaptações a alterações ambientais, sejam por processos naturais ou por atividade antrópica (YANG et al., 2017).

Ainda vale destacar que a abundância dos genes não foi relacionada com a posição geográfica dos pontos amostrados. Desta forma, pode-se inferir que as condições físico-químicas nos diferentes ambientes são mais importantes para a seleção dos genes do que o local de amostragem. Como demonstrado na figura 4.1, as amostras do mar Báltico (HUGERTH et al., 2015) pertencentes ao grupo funcional 2 (Cluster 2) são geograficamente próximas às amostras dos lagos Ekoln, Erken e Vättern (EILER et al., 2014) que pertencem ao agrupamento 3 (Fig. 4.2)

determinadas pelo ambiente e, portanto, devem ter papel importante na capacidade de estabelecimento de grupos bacterianos no ambiente.

Já nos genes do *core* metagenômico, se destacam genes essenciais ao metabolismo celular, os chamados “*housekeeping*”, como a categoria C (Produção e conversão de energia), E (Metabolismo e transporte de aminoácido), H (Metabolismo e transporte de coenzima), I (Metabolismo e transporte de lipídeo), J (Tradução, estrutura ribossomal), L (Replicação, recombinação e reparo) e M (Parede celular, membrana e envelope). Além disso, em grupos menos representativos, os genes das categorias O (Modificação pós traducional, chaperonas), P (Metabolismo e transporte de íon inorgânico) e Q (Biossíntese, transporte e catabolismo de metabólitos secundários) são classificados como de genes especializados em aumentar o *fitness* bacteriano, e representam 4,1%, 3,9% e 1,2%, das categorias O, P e Q, respectivamente, dos genes encontrados no *core* metagenômico. Já para os genes considerados acessórios, 4,6 e 1,9 % foram classificados para as categorias P e Q respectivamente (tabela 3.3). Desta forma, a síntese de metabólitos secundários e o transporte de íons são essenciais para a característica específica de cada ambiente, como por exemplo proteína fixadora de nitrogênio (COG5554) encontrado apenas em amostras do cluster 3 (não sendo encontrado nas amostras com elevada concentração de sal e no lago Huron), e a nitrato redutase (COG3062) também encontrada exclusivamente no cluster 3 (Tabela 4.3).

A glutathione S-transferase (GST, COG0625) foi caracterizada como uma enzima pertencente ao *core* metagenômico, e apresenta a capacidade de catalisar a modificação de substratos hidrofóbicos eletrolíticos, mantendo o balanço da homeostase redox celular (BOUGHATTAS et al., 2017). Assim como o citocromo P450 (COG2124), também encontrado no *core* metagenômico, a GST apresenta um papel importante na metabolização de compostos xenobióticos em ambientes impactados, já sendo descrita no processo de degradação inespecífico do herbicida mesotrione (KULLISAAR et al., 2010; OLCZHANHESKI et al., 2014; PRIONE et al., 2016).

Tabela 4.3: Porcentagem de genes pertencentes a cada classe do COG (nível 1), diferenciando entre *core* metagenômico e genes acessórios

Classe	Descrição da classe	Core metagenômico	Genes acessórios
A	Modificação e processamento de RNA	0	0,288411
B	Dinâmica e estrutura da cromatina	0	0,31463
C	Produção e conversão de energia	9,189189	4,824331
D	Controle do ciclo celular	1,486486	1,022549
E	Metabolismo e transporte de aminoácido	11,75676	4,693235
F	Metabolismo e transporte de nucleotídeo	5	1,494494
G	Metabolismo e transporte de carboidrato	5,27027	4,614578
H	Metabolismo e transporte de coenzima	7,567568	2,884111
I	Metabolismo e transporte de lipídeo	4,189189	1,573152
J	Tradução, estrutura ribossomal	12,43243	3,539591
K	Transcrição	4,324324	4,090194
L	Replicação, recombinação e reparo	6,621622	4,457263
M	Parede celular, membrana e envelope	8,108108	3,25118
N	Motilidade celular	0	2,28107
O	Modificação pós traducional, chaperonas	4,054054	3,88044
P	Metabolismo e transporte de íon inorgânico	3,918919	4,588359
Q	Biossíntese, transporte e catabolismo de metabólitos secundários	1,216216	1,887782
R	Predição geral de função	7,432432	15,33823
S	Proteína não caracterizada	2,027027	27,39906
T	Mecanismo de transdução de sinais	2,162162	3,303618
V	Mecanismo de defesa	1,351351	0,917672
Z	Citoesqueleto	0	0,262192

A bomba de efluxo Cu/Ag (CusA, COG3696) pertencente ao *core* metagenômico, e está relacionado com o sistema de reconhecimento e resistência a prata e cobre (CHACON et al., 2014; DELMAR; SU; YU, 2014; RANDALL et al., 2014). A presença de um gene de resistência a prata e cobre em todas as amostras de água doce sugere a necessidade desta proteína em ambientes de água doce. Como não há evidências de elevadas concentrações de cobre e prata, a pressão seletiva para este gene não está clara, mas processo de co-seleção deem estar associados à presença destes genes no *core* metagenômico avaliado. Neste contexto, trabalhos recentes vem demonstrando que a exposição de *Escherichia coli* e *Salmonella enterica* a determinados herbicidas alteram a susceptibilidade a antibióticos, e isto se deve a atividade de bombas de efluxo com atividades inespecíficas (KURENBACH et al., 2015, 2017). Assim, mesmo na ausência de prata e cobre, pode estar ocorrendo pressão seletiva para estas bombas de efluxo por meio da presença de outras moléculas que induzem estresse ambiental associado à homeostase redox. Além de

CusA, há a presença de bombas de efluxo a multidrogas (transportadores do tipo ABC, COG0577, COG0841, COG1131, COG1132, COG1163, COG1566 COG2274), que podem também estar relacionadas a atividades inespecíficas. Porém, AmpC (COG1680) presente também no core metagenômico é uma proteína que media a resistência a cefalotina, cefazolina, cefoxitina, penicilinas e β -lactamases, ou seja, se trata de uma enzima específica a determinados grupos químicos, necessitando de uma análise dos metabólitos presentes nestes ambientes para justificar a presença deste gene em todas as amostras de água doce avaliadas.

Desta forma, os resultados apresentados na presente análise sugerem que as proteínas GST, citocromo P-450, AmpC e bomba de efluxo Cu/Ag são essenciais para a comunidade bacteriana em ambientes de água doce.

A maioria dos genes identificados exclusivos de cada grupo não apresentam uma função conhecida até o momento, destacando a importância de se avaliar o perfil funcional dos micro-organismos específicos destes ambientes. Porém, a proteína citrato liase (COG3051, COG3052, COG3053 e COG3493 – Na⁺/citrate symporter) foi encontrada abundantemente apenas em amostras pertencentes ao grupo 3, que é caracterizado por amostras ambientais com baixas concentrações de sal. O complexo citrato liase é responsável por quebrar as moléculas de citrato em acetato e oxaloacetato, fazendo com que as linhagens que contenham este complexo tenham a capacidade de utilizar o citrato extracelular, disponibilizando fontes alternativas de nutrientes (MARTINO et al., 2016). O transportador de citrato (Na⁺/citrato simporter) se trata de um transportador eficiente para citrato, porém não é uma estrutura exclusiva, visto que a inativação destes genes leva ao transporte de citrato para o meio intracelular através de transportadores secundários, como simportadores e antiportadores (não mediados por sódio) (LI et al., 2016). Até o momento não há relatos da importância destes genes em células bacterianas, porém a presença destes genes exclusivamente no cluster 3 sugere que existe alguma vantagem adaptativa nas amostras pertencentes a este grupo.

4.5 Conclusões

Ambientes de água doce são de extrema importância para a vida humana. A análise do perfil funcional do microbioma destes ambientes podem revelar

informações importantes quanto aos nichos disponíveis para estes micro-organismos. Pela análise dos metagenomas disponíveis publicamente, foi possível observar que, apesar de se tratarem de ambientes de água doce, a pequena diferença no gradiente de salinidade pode representar alterações significativas no perfil funcional, determinados pelo nicho de cada ambiente. Neste trabalho foi possível comprovar a influência da salinidade no perfil funcional da comunidade microbiana.

Com relação aos genes exclusivos, pode ser sugerido que a maior parte destes genes codificam proteínas sem função conhecida, destacando a importância das análises funcionais da microbiota pertencente a estes ambientes, possibilitando determinar quais funções seriam essenciais para cada ambiente. Ainda foi possível determinar que a via para o transporte e metabolização de citrato se mostrou exclusiva para amostras de ambiente de água doce com baixas concentrações de sais, porém até o momento não é possível determinar qual a importância desta via para o *fitness* bacteriano neste ambiente. Este fato destaca a necessidade das análises físico-químicas em análises metagenômicas, que permitiriam análises de correlações para cada perfil gênico, permitindo maior entendimento quanto ao microbioma em ambientes de água doce.

5 CAPÍTULO 3: CARACTERÍSTICAS AMBIENTAIS E EFEITOS ANTRÓPICOS MODULAM A DIVERSIDADE DE PLASMÍDEOS NO RIO TIETÊ, BRASIL.

5.1 Resumo

Plasmídeos são conhecidos por apresentar a capacidade de serem transferidos lateralmente por um processo conhecido como conjugação, permitindo a troca e inovação de material genético em organismos procarióticos. Os genes presentes em plasmídeos não são essenciais para o desenvolvimento bacteriano, porém podem conferir vantagem adaptativa. A maioria dos trabalhos que analisam a diversidade de plasmídeos são dependentes do isolamento microbiano. Neste trabalho, foi utilizada uma abordagem metagenômica plasmidial (plasmidoma) de dois pontos do Rio Tietê (Brasil), que variam de acordo com o índice de qualidade de água (IQA) (local TIET 02800 com IQA ótimo e o local TIET 02400 IQA ruim). Dessa forma, baseado no plasmidoma, foi verificado que no ponto com maior atividade antrópica (TIET 02400) foram observados uma maior abundância de genes que conferem vantagens adaptativas quanto a presença de compostos tóxicos no ambiente, como transportadores transmembrana, bombas de efluxo, e genes que conferem resistência a compostos xenobióticos e metais pesados. Já no ponto com menor teor de poluentes (TIET 02800) os genes de maior abundância estão envolvidos no transporte e assimilação de substâncias observadas em baixas concentrações, como o fósforo. Desta forma, foi observado que os plasmídeos podem afetar o *fitness* ecológico comunidade bacteriana, visto que por meio da transferência lateral de genes envolvidos em processos adaptativos no ambiente e posterior seleção, podem favorecer a adaptação de determinados grupos microbianos.

Palavras-chave: Plasmidoma. Metagenômica. Metais pesados.

5.2 Introdução

A formas de recombinação e evolução gênica em organismos procarióticos ocorre necessariamente por mutações (ARBER, 2000), ou por eventos de

transferência lateral de genes (FROST et al., 2005; LUO et al., 2016). Estima-se que aproximadamente 75% de todos os genes procarióticos são passíveis de serem transferidos lateralmente (KLOESGES et al., 2011), interferindo de forma significativa no perfil metabólico de linhagens bacterianas. Vários estudos vêm evidenciando a influência da transferência lateral de genes no *fitness* bacteriano, como a aquisição de resistência a antibióticos (SAN MILLAN, 2018), metabolismo de compostos tóxicos (SEPPERUMAL; PALANIMANICKAM; SIVALINGAM, 2013) e fatores de virulência (YU et al., 2017). Estas características geralmente são adquiridas pela transferência de plasmídeos, em um fenômeno conhecido como conjugação. Com os avanços nas tecnologias de sequenciamento, se tornou possível realizar estudos independentes de cultivo, como a metagenômica, permitindo a extração e purificação de amostras de DNA extraídas de ambientes naturais, a fim de se obter o perfil funcional e taxonômico de grupos genômicos de interesse, como por exemplo os plasmídeos (BROWN KAV; BENHAR; MIZRAHI, 2013a).

Até o presente momento, os estudos envolvendo a diversidade de plasmídeos em ambientes de água doce têm sido negligenciados, visto que pouco se conhece desta diversidade e distribuição no ambiente. O Rio Tietê representa o principal rio do Estado de São Paulo, percorrendo 1136 km de leste a oeste, atravessando o estado de São Paulo, Brasil (DAEE, 2011). O rio Tietê se tornou eixo de crescimento e desenvolvimento das cidades, trazendo como consequência a necessidade das administrações públicas adotarem uma política de utilização do rio apenas como fonte de produção de energia e como veículo transportador de esgoto (MORTATTI; DE MORAES; PROBST, 2012). Estima-se que aproximadamente 700 toneladas de esgoto doméstico e industrial sejam despejados diariamente, principalmente na porção que atravessa a região metropolitana da grande São Paulo (CETESB, 2015). A região próxima a nascente (45 km após a nascente) recebe a maior parte da carga de resíduos, sendo a qualidade desta água classificada como péssima (CETESB, 2016) e o rio classificado como “morto” (PAGANINI, 2008) devido à ausência de oxigênio dissolvido. Porém, ao longo do percurso ocorrem processos de autodepuração do Rio, o qual recupera a característica de “rio limpo” (BARRENHA et al., 2018).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil funcional do plasmidoma em dois pontos do Rio Tietê, apresentando índice de qualidade de água

(IQA) ruim (TIET 02400) e IQA ótimo (TITR 02800), visando descrever o perfil funcional dos genes presentes em plasmídeos na bacia do rio Tietê e a sua possível correlação com a qualidade da água e a diversidade microbiana observada.

5.3 Metodologia

5.3.1 Coleta das amostras e processamento

As amostras de água foram coletadas de dois pontos do Rio Tietê, localizados no estado de São Paulo, Brasil, sendo o TIET 02400 (coletado no dia 03/09/2015, coordenadas: 23°05'12" S 47°40'41"O) com IQA ruim (IQA= 30) e TITR 02800 (coletado no dia 01/09/2015, coordenadas: 20°39'35S 51°08'48"O) com IQA ótima (IQA= 90) (Fig. 5.1). As amostras foram coletadas pela Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), sendo realizada a coleta da água superficial e estocados em galões de 20 litros e mantidas a 4°C até o processamento das mesmas. Foram coletados 8L para o ponto mais sujo (TIET 02400) e 50 L para o ponto TITR 02800. Esta diferença no volume analisado se deve à quantidade de material particulado presente nas amostras, o qual para amostras de baixa qualidade de água impede a filtração de um grande volume. A filtração foi realizada em duas etapas, primeiramente utilizando membranas de celulose de 1,2 µm com 144 mm de diâmetro, e uma segunda filtração utilizando membranas de celulose de 0,22 µm com 144 mm de diâmetro. Após filtração, as membranas de 0,22 µm foram estocadas em ultra-freezer a -80°C até a extração para plasmidoma e metagenoma.

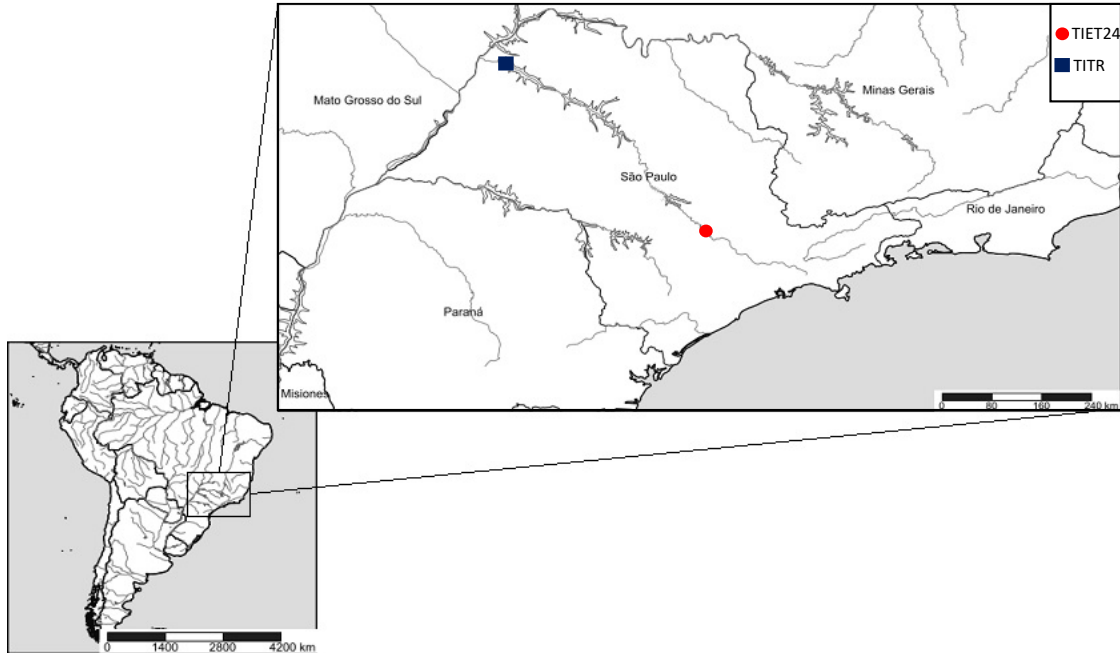


Figura 5.1: Localização dos pontos de amostragem utilizados para análise do plasmidoma. TIET24 representado em vermelho é referente ao ponto TIET 02400, e TITR representado em azul é referente ao ponto TITR 02800.

5.3.2 *Parâmetros físico-químicos*

Os parâmetros físico-químicos utilizados neste trabalho foram realizados pela CETESB no momento da coleta, e estão descritos no relatório “Qualidade de águas Superficiais”, do ano de 2015 publicados no site da empresa (<https://cetesb.sp.gov.br/>). Os índices de qualidade da água também são disponibilizados pela CETESB, e levam em consideração a integração dos parâmetros físico-químicos: demanda bioquímica de oxigênio (BDO), fósforo total, sódio, potássio, nitrogênio amoniacal, ferro total, alumínio total, carbono orgânico total (COT), ferro dissolvido, oxigênio dissolvido (OD), pH, temperatura, condutividade, nitrato e turbidez. Existem seis classes de IQA, sendo elas: ótimo (79-100), bom (51-79), regular (36-51), ruim (19-36) e péssimo (0-19).

5.3.3 *Extração do DNA plasmidial*

Para a extração do DNA plasmidial, os filtros de 0,22 μm (item 5.3.1) foram cortados em pedaços com o auxílio de tesoura e bisturi também esterilizados em placa de Petri. Os fragmentos foram pesados e 1,5 gr e colocados em tubos de 50 ml, sendo

realizada duas extrações para cada ponto de coleta, a fim de aumentar a quantidade de DNA plasmidial extraído. Foi utilizado o método de lise alcalina (KADO e LIU, 1981) com modificações. Brevemente, em cada tubo foram adicionados 13,125 ml de tampão de lise (3% SDS, 50 mM Tris pH 12,6) e incubado a 60°C durante 1 hora sob agitação a 100 rpm. Após este processo foi adicionado um volume de fenol/clorofórmio (1:1 vol/vol), agitado e centrifugado a 16.000 g a 4°C por 15 min. Após a centrifugação a fase aquosa foi coletada e repetido o processo de extração com fenol/clorofórmio. Após a segunda extração, foi adicionado um volume de clorofórmio na fase aquosa, agitado e centrifugado a 16.000 g a 4°C durante 15 min. O sobrenadante foi coletado e adicionado novamente um volume de clorofórmio, e repetido o passo anterior. Após a extração, foi adicionado 0,1 volume de acetato de sódio 3M (pH 5,2) e 0,6 volume de isopropanol absoluto, e incubado por 18h a 4°C. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 16.000 g a 4°C durante 30 min., o sobrenadante foi removido e adicionado 200 µL de etanol 70%, agitado e centrifugado a 16.000 g a 4°C durante 15 min. O sobrenadante foi removido e o precipitado foi seco a 37°C. A amostra final foi ressuspensa em 20 µL de água ultrapura estéril.

Para a remoção do DNA cromossomal que ainda poderia estar “contaminando” o metagenoma plasmidial, foi realizado tratamento com *plasmid-safe DNase* (PSD – Epicentre). Para isto, todo o volume de DNA plasmidial extraído foi tratado com PSD, sendo adicionado 5 µL do tampão do *plasmid-safe DNase*, 5 µL de PSD e 2 µL de 25 mM de ATP, completando o volume para 50 µL com água ultrapura. As amostras foram incubadas por 18h a 37°C e a reação inativada posteriormente pelo aquecimento a 70°C durante 30 min. Após a purificação, a ausência de DNA genômico foi confirmada, por meio da utilização de DNA em reações de PCR contendo *primers* específicos para o gene 16S rRNA (*primers* 8F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' e 1492R 5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3') e analisados em gel de agarose 0,8%. Em caso positivo, a purificação com PSD foi repetida. Posteriormente, foi adicionado 0,1 volume de acetato de sódio 3M (pH 5,2) e 0,6 volume de isopropanol absoluto, e incubado durante 18h a 4°C. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 16.000 g a 4°C durante 30 min., o sobrenadante foi removido e adicionado 200 µL de etanol 70%, agitado e centrifugado a 16.000 g a 4°C durante 15 min. O sobrenadante foi removido e o precipitado foi seco a 37°C. A amostra final foi ressuspensa em 10 µL de água ultrapura estéril.

Posteriormente, a fim de se obter a concentração necessária de DNA plasmidial de origem metagenômica, foi realizada amplificação randômica utilizando o kit *iLLustra Genomiphi V2 DNA amplification* (distribuído pela GE), seguindo as recomendações do fabricante.

As amostras foram enviadas para a DSMA Biotecnologia (Mogi das Cruzes, SP) para a construção das bibliotecas (kit TruSeq DNA PCR-Free) e sequenciamento em HiSeq 2500 com sequências de 101 pb *paired-end*, sendo obtido no total aproximadamente 15,8 Gb de dados (5,6 Gb para o ponto TIET 02400 e 10,2 para o ponto TITR 02800).

5.3.4 Análise do gene 16S rRNA

A análise do perfil procariótico baseado no *amplicon* 16S rRNA foi realizado nos dois pontos amostrados para o plasmidoma (Fig. 5.1). Para a extração do DNA, as membranas de 0,22 µm descritas no item 5.3.1 foram maceradas com o auxílio de nitrogênio líquido em cadinhos estéreis (400 mg de membranas foram maceradas). O DNA total foi extraído das membranas maceradas utilizando o kit de isolamento de DNA *Power Soil* (QIAGEN) seguindo as recomendações do fabricante. As regiões hiper-variáveis V3 e V4 foram sequenciadas para a avaliação da diversidade do gene 16S rRNA neste estudo. O DNA extraído foi enviado para DSMA Biotecnologia (Mogi das Cruzes, SP) para a amplificação e montagem das bibliotecas e sequenciamento em MiSeq com sequências de 300 pb *paired-end*.

5.3.5 Análises de bioinformática

A qualidade dos *reads* gerados foi verificada com o programa FastQC v.0.11.8, sendo descartadas as sequências com qualidade menor que Q20 (1 erro a cada 100 bases sequenciadas) e aparados 40 pb das extremidades utilizando o programa Geneious 7.1. A anotação taxonômica e funcional foi analisada utilizando o servidor MG-RAST (GLASS; MEYER, 2011), utilizando similaridade com o banco de dados SEED, COG e KEGG (com um máximo *e-value* de $\leq 10^{-5}$, utilizando 60% de similaridade). Foi realizada também a montagem *de novo* dos plasmídeos com o

parâmetro “—pre-correction” no programa IDBA-UD, como reportados por (PENG et al., 2012; JØRGENSEN et al., 2014).

Para comparação do perfil taxonômico (item 5.3.4) e funcional, foi utilizado como referência sequências dos mesmos pontos amostrados para plasmidoma, porém em períodos de coletas diferentes realizados em trabalhos anteriores (RADA, 2017). A classificação taxonômica do plasmidoma e metagenoma total foi realizada utilizando os resultados obtidos pelo MG-RAST, utilizando RefSeq como banco de dados (*e-value* de $\leq 10^{-5}$, utilizando 60% de similaridade). As análises estatísticas foram realizadas utilizando os dados do MG-RAST, com o programa R v.3.5.1 (<https://www.r-project.org/>). As análises de PCA foram realizadas utilizando o pacote “vegan”, e a representação gráfica utilizando o pacote “ggplot2”.

Já para a análise dos *amplicons* baseado no gene 16S rRNA, foi utilizado o programa *Quantitative Insights Into Microbial Ecology* (QIIME). Para isso, primeiramente, foi realizado a seleção dos *reads* com qualidades aceitáveis (qualidade maior que 20, retirada de *barcodes* e adaptadores, e excluídos *reads* menores que 50 pb) utilizando o programa Geneious 7.1. No programa QIIME foi realizado a montagem dos *contigs* com base no consenso de similaridade, utilizando o comando *join_paired_ends.py*, que permitirá o alinhamento e união das sequências *forward* e *reverse* em uma única sequência. Posteriormente, empregou-se o comando *pick_otus.py* com a finalidade de alocar as sequências em uma matriz de UTOs (Unidade Taxonômica Operacional), utilizando o algoritmo *uclust* com 97% de similaridade. Por fim, o comando *assign_taxonomy.py* foi empregado para realizar a classificação taxonômica a partir das sequências da matriz, sendo empregado o RDP *classifier* (COLE et al., 2007b) utilizando como referência o banco de dados *Greengenes* chamado *Caporoso Reference OTUs* (GREENGENE, 2012). Para este trabalho, o programa foi utilizado para a classificação taxonômica, sendo utilizado o programa R v.3.5.1 (<https://www.r-project.org/>) para análises de diversidade e abundância, utilizando os pacotes “vegan” e “ggplot2”.

Para descrição das sequências circulares, foi utilizado o método de detecção de circularidade entre os *scaffolds* (JØRGENSEN et al., 2014), com modificações propostas por KOTHARI et al. (2017). Os critérios utilizados para selecionar sequências circulares foram: a) tamanho do *scaffold* maior que 2 Kb, b) mais de 34 pb homólogos (*e-value* > $1e^{-5}$) no fim dos *scaffolds* na direção correta, c) pelo menos

dois pares de *reads* mapeados no final oposto aos *contig* analisado, com máximo de 500 pb do final do *scaffold*. A pipeline completa com os scripts em Perl estão depositadas em <https://github.com/yuwwu/detect-circ-plasmid> (KOTHARI et al., 2017).

5.4 Resultados

5.4.1 Parâmetros físico-químicos

Na tabela 5.1 são apresentados os parâmetros físico-químicos nos pontos do Rio Tietê avaliados no presente projeto. No ponto TITR 02800 foram obtidas concentrações consideravelmente mais baixas de ferro dissolvido e ferro total se comparado ao ponto TIET 02400, bem como a concentração de fósforo disponível na coluna d'água. Já no ponto TIET 02400 existem indicativos nos parâmetros físico-químicos que caracterizam este ponto com um índice de qualidade de água ruim, como por exemplo a concentração de nitrogênio amoniacal e a turbidez da água no momento da coleta. Desta forma, o ponto TITR 02800 foi classificado com um IQA ótimo, já o ponto TIET 02400 com IQA ruim.

Tabela 5.1: Parâmetros físico-químicos dos pontos TITR 02800 e TIET 02400 analisados no momento da coleta (Fonte: CETESB, 2015)

Parâmetros físico-químicos	TIET 02400	TITR 02800
Condutividade	690	203
Oxigênio Dissolvido	2	8,4
pH	7,45	8,4
Temperatura do ar	24,3	26,3
Temperatura da água	27,6	31,8
Alumínio dissolvido	0,1	0,05
Alumínio total	5,925	0,05
Bário Total	0,1	0,06
Cádmio Total	0,0007	0,001
Carbono orgânico total	14,5	3,92
Chumbo Total	0,0145	0,008
Cloreto Total	68,1	19
Cobre Total	0,035	0,005
Cromo Total	0,03	0,005
DBO	14	2
Ferro dissolvido	0,3	0,007
Ferro Total	5,9	0,018
Fósforo Total	2,31	0,01
Manganês Total	0,2	0,005
Mercúrio Total	0,0002	0,0002

Níquel Total	0,025	0,01
Nitrogênio amoniacal	23,4	0,1
Nitrato	0,2	1
Nitrito	0,1	0,2
Potássio	13,5	5,8
Sódio	55	24,5
Sólido Dissolvido Total	216	132
Sólido Total	366	140
Turbidez	13	1,8
Zinco Total	0,15	0,005

5.4.2 Análise do DNA plasmidial

Primeiramente foi realizado a extração do DNA plasmidial, resultando em 137 ng. μl^{-1} e 158 ng. μl^{-1} para TIET 02400 e TITR 02800 respectivamente. Na etapa de purificação utilizando como controle o gene 16S rRNA foi possível verificar a eliminação do material genético possivelmente cromossomal (Fig. 5.2). Os resultados obtidos do sequenciamento estão descritos na tabela 5.2.

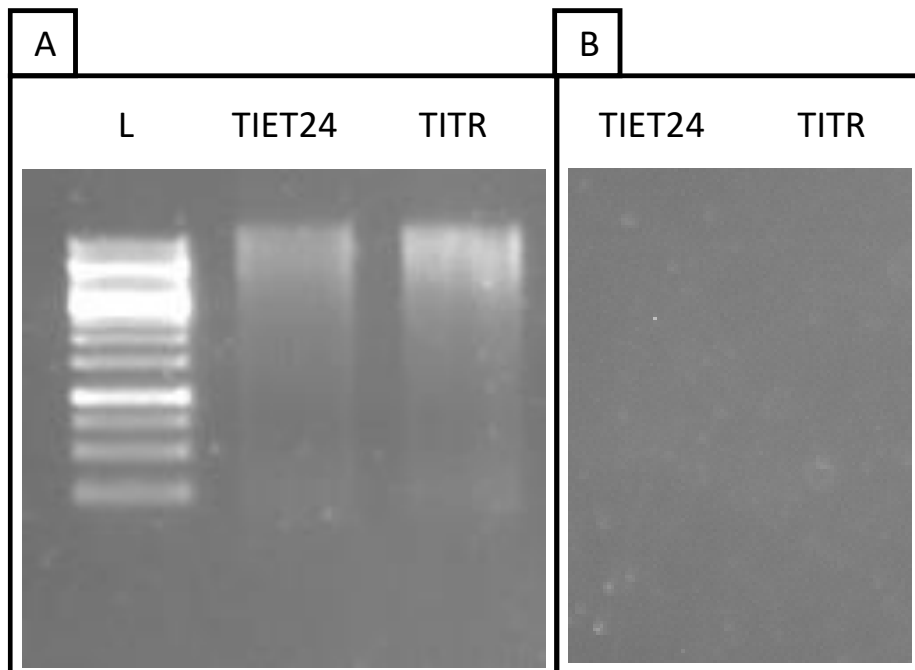


Figura 5.2: Validação da extração e método de purificação para sequenciamento do plasmidoma. Painel A: Gel PFGE 0,8% do DNA plasmidial obtido pela extração de plasmídeos da amostra do Rio Tietê. Painel B: Controle de qualidade para remoção do DNA bacteriano, determinado pelo sequenciamento para o gene 16S rRNA. L: Marcador 1kb.; TIET24: referente as análises para o ponto TIET 02400; e TITR: referente as análises para o ponto TITR 02800.

Tabela 5.2: Resultados do sequenciamento obtido para o plasmidoma das amostras do rio Tietê.

Amostra	No. Sequências	Filtradas	Após filtragem	Conteúdo GC
TIET 02400	22.618.078	1.119.599	21.498.479	42%
TITR 02800	39.847.768	2.109.142	37.738.626	45%

5.4.3 Análise funcional

Foi utilizado o perfil funcional obtido pelo banco de dados COG (anotados pelo servidos MG-RAST, a nível de função) para as extrações do plasmidoma e metagenoma total (RADA, 2017). Pela análise de redundância (RDA), foi possível obter 88,8% de explicação dos dados (RDA1= 48%, RDA2= 40,8%), com separação das amostras plasmidiais (Plas_TITR e Plas_TIET24) das amostras do metagenoma total.

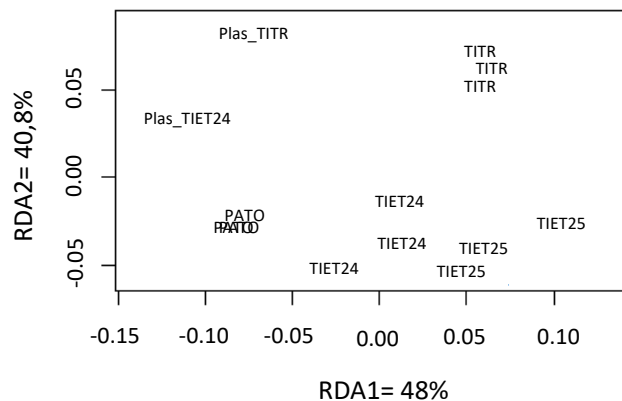


Figura 5.3: Análise de redundância (RDA) utilizando o perfil funcional do plasmidoma e metagenoma do Rio Tietê. RDA utilizando o perfil funcional com base no banco de dados COG (nível de função). Amostras: PATO (metagenômica do ponto PATO 02900), TIET24 (metagenômica do ponto TIET 02400), TIET25 (metagenômica do ponto TIET 02500), TITR (metagenômica do ponto TITR 02800), Plas_TIET24 (Plasmidoma do ponto TIET 02400) e Plas_TITR (Plasmidoma do ponto TITR 02800).

Pela contribuição dos perfis funcionais que distribuem os pontos na análise de coordenadas (Tabela 5.3), é possível determinar que os genes relacionados ao “Metabolismo e transporte de aminoácidos”, “metabolismo e transporte de carboidratos”, “motilidade celular”, “mecanismo de defesa”, “metabolismo e transporte de íon inorgânico”, “biossíntese, catabolismo e transporte de metabólitos secundários” e “mecanismo de transdução de sinais” foram relacionados ao plasmidoma, e conseqüentemente permitiram a diferenciação entre as amostras metagenômicas e plasmidiais.

Tabela 5.3: Análise de correlação baseada na distribuição obtida pelo RDA (Fig. 4.3) utilizando as análises de COG (nível 1). PC1 e PC2 significam a posição espacial de cada variável analisada; r^2 = correlação; $Pr(>r)$ = significância.

	PC1	PC2	r ²	Pr(>r)
Metabolismo e transporte de aminoácidos	-0.99948	0.03236	0.9933	0.001
Metabolismo e transporte de carboidratos	-0.93929	0.34313	0.9287	0.001
Controle do ciclo celular, divisão celular e partição cromossomal	-0.93751	-0.34795	0.9870	0.001
Motilidade celular	-0.95595	0.29353	0.8415	0.001
Dinâmica e estrutura da cromatina	-0.77657	-0.63003	0.7702	0.001
Metabolismo e transporte de coenzima	-0.98682	-0.16183	0.9545	0.001
Citoesqueleto	0.56575	0.82457	0.1956	0.298
Mecanismo de defesa	-0.98339	0.18150	0.9384	0.001
Conversão e produção de energia	-0.99192	-0.12683	0.9673	0.001
Estruturas extracelulares	0.17501	0.98457	0.6297	0.004
Metabolismo e transporte de íon inorgânico	-0.95614	0.29291	0.9557	0.001
Metabolismo e transporte de lipídeos	-0.99058	-0.13693	0.9827	0.001
Metabolismo e transporte de nucleotídeos	-0.97776	-0.20971	0.9254	0.001
Modificação pós-traducional, chaperonas	-0.99126	-0.13190	0.9367	0.001
Modificação e processamento do RNA	-0.76244	-0.64706	0.9549	0.001
Replicação, recombinação e reparo	-0.99565	-0.09319	0.9571	0.001
Biossíntese, catabolismo e transporte de metabólitos secundários.	-0.92780	0.37309	0.9255	0.001
Mecanismo de transdução de sinais	-0.94345	0.33152	0.8255	0.001

O perfil funcional, baseado em SEED (*e-value* de 10^{-5}), do plasmidoma mostrou que os genes pertencentes aos subsistemas “Aminoácidos e derivados”, “Carboidratos” e “Metabolismo proteico” foram os mais abundantes. Comparando os dois pontos amostrados, o ponto TIET 02400 (Plas_TIET24) apresentou uma maior abundância de genes classificados como “Transporte transmembrana”, “parede celular e cápsula” e “virulência, doença e defesa”. Já o ponto TITR 02800 (Plas_TITR) apresentou maior abundância para “aminoácidos e derivados”, “carboidratos”, “cofatores, vitaminas, grupos prostéticos e pigmentos”, “metabolismo do fósforo” e “fotossíntese” (Fig. 5.4).

Com relação aos genes de resistência a antibióticos, foi possível encontrar genes voltados às classes de antibióticos fluoroquinolonas com abundância de 0,32% para o ponto TITR 02800 e 0,22% em TIET 02400, β -lactâmicos com abundância de 0,9% para TITR 02800 e 0,86% para TIET 02400, eritromicina com abundância de 0,014% para o ponto TITR 02800 e 0,048% em TIET 02400, e aminoglicosídeos, vancomicina e fosfomicina em abundâncias menos representativas, além de bombas de efluxo que conferem resistência a multidrogas (Tabela 5.1A- anexo). Já com relação a genes voltados a resistência me compostos tóxicos, houve maior abundância de genes voltados a resistência de cádmio-zinco-cobalto (0,26% para TIET 02800 e 0,82% para TIET 02400), porém o gene que confere resistência apenas para cádmio foi mais abundante em TITR 02800 (0,006%) se comparado ao ponto TIET 02400 (0,0016%). Além dos genes de resistência a cádmio, genes que conferem resistência a arsênio (0,17% em TITR 02800 e 0,19% em TIET 02400), cromo (0,019% em TITR 02800 e 0,065% em TIET 02400) e cobre (0,027% em TITR 02800 e 0,034% em TIET 02400) também foram representativos (Tabela 5.1A- anexo)

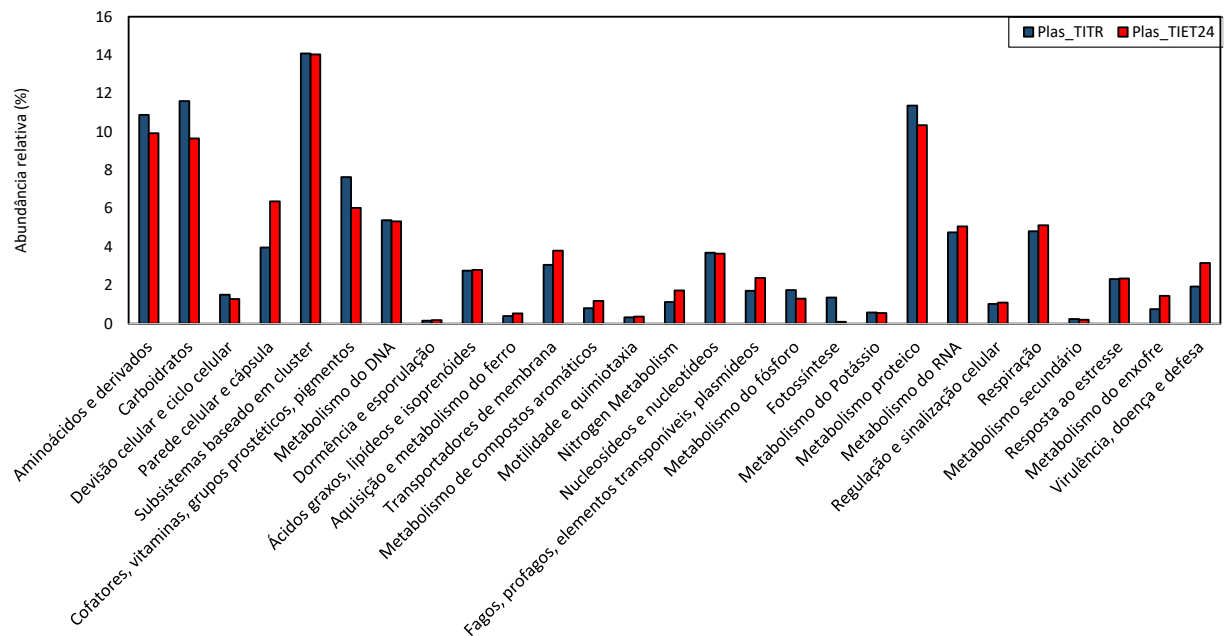


Figura 5.4: Análise do perfil funcional baseado em SEED (nível 1) para os pontos TITR 02800 (Plas_TITR – IQA ótimo) e TIET 02400 (Plas_TIET24 – IQA ruim). Dados representados pela abundância relativa em porcentagem.

5.4.4 Possíveis hospedeiros dos plasmídeos presentes no Rio Tietê

Foi realizada a análise filogenética das sequências de DNA plasmidial metagenômico (meta-plasmidoma), utilizando os *reads* contra o banco de dados RefSeq (plataforma MG-RAST utilizando *e-value* de 10^{-5}). A maior parte das sequências foi classificada como pertencente ao domínio Bacteria, com poucos representantes para os domínios Archaeae, Eukaryota e Vírus (Figura 5.1A - anexo). Selecionando apenas as sequências pertencentes ao domínio Bactéria, foi possível observar que membros dos filos Proteobacteria (56%), Cyanobacteria (22%) e Actinobacteria (10%) são dominantes nas amostras avaliadas. Com relação as famílias bacterianas, houve dominância de Burkholderiaceae (20%), Comamonadaceae (6,5%), Rhodocyclaceae (4,4%) e Nostocaceae (4,3%) (Fig. 5.2A-anexo).

Ainda foi realizada a comparação entre a distribuição dos filos obtido do plasmidoma com a distribuição na diversidade bacteriana obtida por meio do sequenciamento de bibliotecas do gene 16S rRNA das mesmas amostras utilizadas na extração do DNA plasmidial. As análises de diversidade foram realizadas utilizando a pipeline do QIIME (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*). De forma

semelhante aos resultados observados com o plasmidoma, os filos Proteobacteria (33%), Cyanobacteria (28%) e Actinobacteria (27%) foram dominantes, embora tenha apresentado abundância significativamente diferente (Fig. 5.2.2). Baseado no perfil taxonômico do metagenoma total (RADA, 2018) foi observado que Proteobacteria (64%), Cyanobacteria, (13%) Bacterioidetes (8,3%) e Actinobacteria (6,5%) foram os grupos dominantes.

Com relação a distribuição dos filos nos dois pontos amostrados para plasmidoma e metagenoma baseado no *amplicon* 16S rRNA, o ponto TITR 02800 apresentou mais representantes para os filos Cyanobacteria (44% para plasmídeos e 56% para diversidade bacteriana), seguido de Actinobacteria (11% para plasmídeos e 17% para diversidade bacteriana) e Proteobacteria (30% para plasmídeos e 12% para diversidade bacteriana). Porém, o filo Proteobacteria apresentou maior abundância para o plasmidoma se comparado a diversidade bacteriana (40% mais representativo no plasmidoma). Já o ponto TIET 02400 foi dominado pelos filos Proteobacteria (82% para plasmídeos e 54% para diversidade bacteriana) e Actinobacteria (8% para plasmídeos e 17% para diversidade bacteriana), sendo mais de 80% dos plasmídeos pertencentes ao filo Proteobacteria (Fig. 5.5).

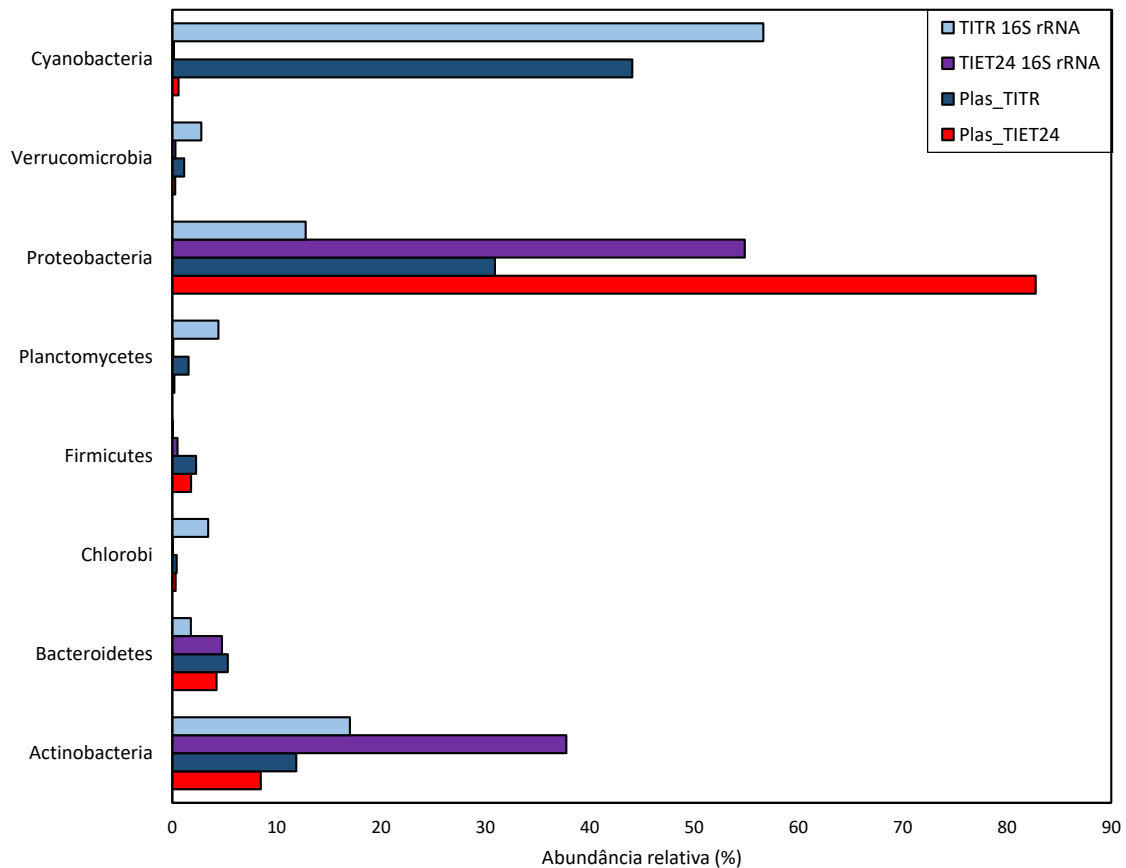


Figura 5.5: Distribuição taxonômica (a nível de filo) dos possíveis hospedeiros das sequências plasmidiais em cada ponto (Plas_TITR – Plasmidoma do ponto TITR 02800 e Plas_TIET24 – Plasmidoma do ponto TIET 02400) e dos dados obtidos pelo sequenciamento baseado no *amplicon* 16S rRNA para cada ponto (TITR 16S rRNA – 16S rRNA do ponto TITR 02800 e TIET24 16S rRNA – 16S rRNA do ponto TIET 02400). Dados demonstrados pela abundância relativa em porcentagem.

Baseado na análise taxonômica das sequências do plasmidoma, em comparação ao metagenoma total obtido em estudo anterior (RADA, 2017), para o ponto TITR 02800 os filos Proteobacteria e Cyanobacteria foram dominantes, nos dois sequenciamentos. Foram encontrados 49% das sequências relacionadas ao filo Proteobacteria nas amostras do metagenoma, e apenas 31% no plasmidoma, e com relação ao filo Cyanobacteria, 25% foram relacionados para o metagenoma total, e 44% para o plasmidoma. Já para o ponto TIET 02400 o filo Actinobacteria não foi representativo no metagenoma total como ocorreu no metagenoma baseado em 16S rRNA (sendo anotado apenas 9% para o ponto TITR 02800 e 11% para TIET 02400) (Fig. 5.6).

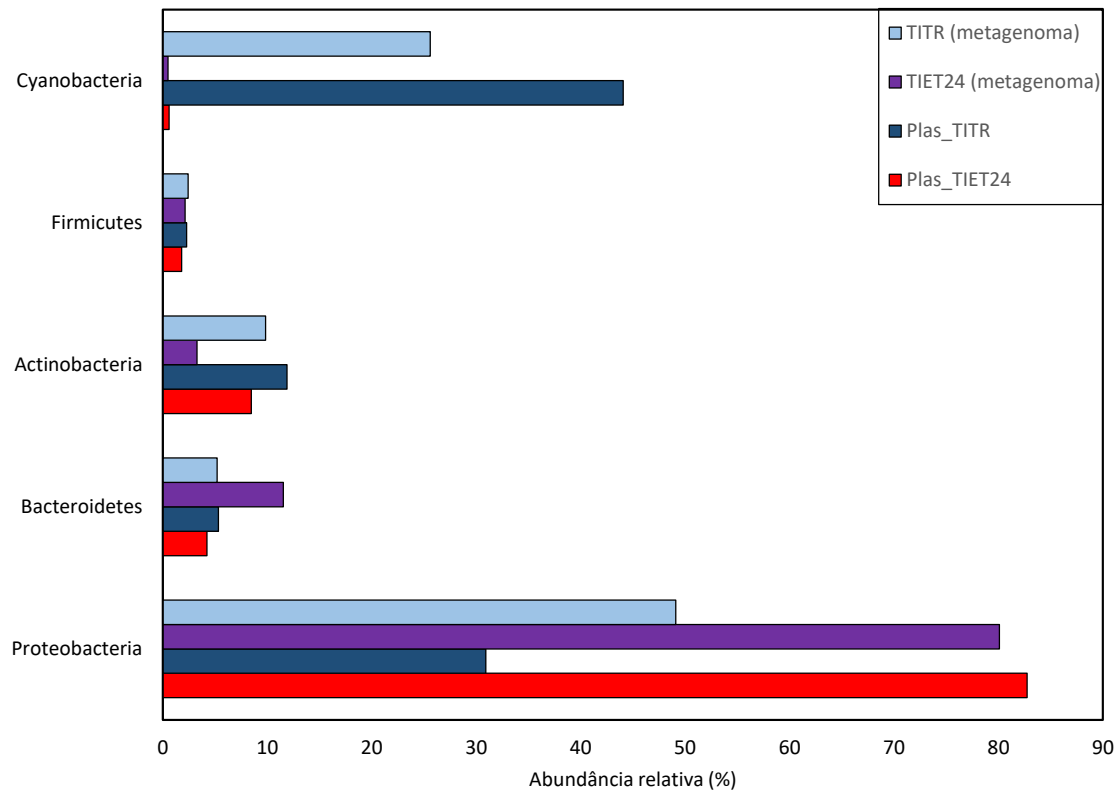


Figura 5.6: Distribuição taxonômica (utilizando o banco de dados RefSeq, a nível de filo) dos possíveis hospedeiros das sequências plasmidiais em cada ponto (Plas_TITR – Plasmidoma do ponto TITR 02800 e Plas_TIET24 – Plasmidoma do ponto TIET 02400) e dos dados obtidos pelo sequenciamento do metagenoma total para cada ponto (TITR (metagenoma) – análise taxonômica do metagenoma total do ponto TITR 02800 e TIET24 (metagenoma) – análise taxonômica do metagenoma total do ponto TIET 02400). Dados demonstrados pela abundância relativa em porcentagem.

Utilizando a classificação ao nível taxonômico de Família, os índices de diversidade (Shannon e Simpson) para o ponto TITR 02800 foram mais elevados se comparado com o ponto TIET 02400. Porém, quando analisado o índice de equitabilidade de Pielou o sequenciamento obtido do plasmidoma do ponto TITR 02800 (Plas_TITR) foi 12% mais elevado se comparado ao metagenoma (Tabela 5.4).

Tabela 5.4: Índices de diversidade (Shannon e Simpson) e equitabilidade (Equitabilidade de Pielou) calculados nos pontos TITR 02400 e TITR 02800 para os sequenciamento de metagenoma total, metagenoma baseado no *amplicon* 16S rRNA e plasmidoma.

Parâmetros	Shannon	Simpson	Pielou (equitabilidade)
<i>TIET 02400 metagenoma</i>	3,452146	0,9214877	0,6473520
<i>TITR 02800 metagenoma</i>	3,981769	0,9535392	0,7466677
<i>TIET 02400 16S rRNA</i>	1,996824	0,7758243	0,3901576
<i>TITR 02800 16S rRNA</i>	1,881157	0,6881555	0,4033841
<i>TIET 02400 plasmidoma</i>	3,143723	0,8555784	0,5889836
<i>TITR 02800 plasmidoma</i>	4,471661	0,9783685	0,8385331

A análise taxonômica baseada em famílias para as amostras do metagenoma total (RADA, 2017) mostrou que Pseudomonadaceae (18%), Burkholderiaceae (6,6%), Comamonadaceae (6,1%) e Enterobacteriaceae (6%) foram dominantes. Porém, analisando os dados obtidos pelo amplicon 16S rRNA houve dominância das famílias Synechococcaceae (26%), Rhodocyclaceae (17%) e Mycobacteriaceae (15%), além de serem encontrados representantes para as famílias de Pelagibacteriaceae (3%) e Microcystaceae (4,5%), não encontrados nas amostras de metagenoma total e plasmidoma (Fig. 5.7 e 5.8).

Para os dados obtidos pela análise do plasmidoma, foi observado que para a amostra do ponto TIET 02400 a família Burkholderiaceae (35%) foi a mais abundante, seguida pelas famílias Comamonadaceae (8,9%), Rhodocyclaceae (7,6%) e Alcaligenaceae (5,8 %) (Figura 4.7). Para as amostras do ponto TITR 02800, foi observado que a família Nostocaceae (8,5%) foi a mais abundante, seguida pelas famílias Burkholderiaceae (5,2%), Comamonadaceae (4,2%), Streptomycetaceae (3,4%) e Planctomycetaceae (2,9%) (Fig. 4.7 e 4.8).

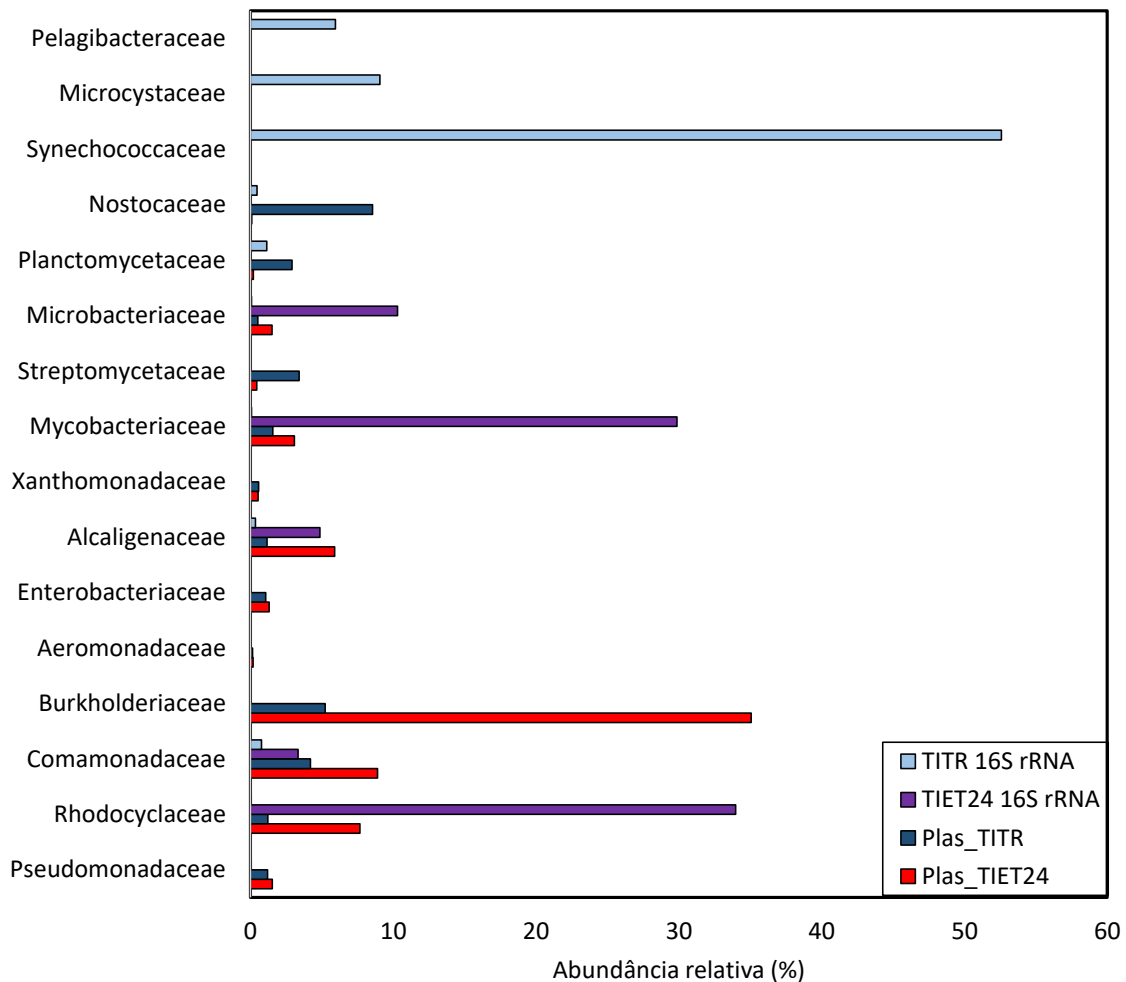


Figura 5.7: Distribuição taxonômica (a nível de família) dos possíveis hospedeiros das sequências plasmidiais em cada ponto (Plas_TITR – Plasmidoma do ponto TITR 02800 e Plas_TIET24 – Plasmidoma do ponto TIET 02400) e dos dados obtidos pelo sequenciamento baseado no *amplicon* 16S rRNA para cada ponto (TITR 16S rRNA – 16S rRNA do ponto TITR 02800 e TIET24 16S rRNA – 16S rRNA do ponto TIET 02400). Dados demonstrados pela abundância relativa em porcentagem.

Analisando a diversidade do metagenoma total, a família Pseudomonadaceae foi dominante nos dois pontos analisados (TIET 02400 e TITR 02800 com 21% e 14% respectivamente), não sendo uma família abundante no plasmidoma (representando menos de 2%). As famílias Xanthomonadaceae e Enterobacteraceae foram representativas apenas no metagenoma total do ponto TITR 02800 (8% e 8,7% respectivamente). Já para o ponto TIET 02400, as famílias mais abundantes (com exceção de Pseudomonadaceae) foram Rhodocyclaceae (9,4%), Comamonadaceae (8,9%) e Burkholderiaceae (7,7%) (Fig. 4.8).

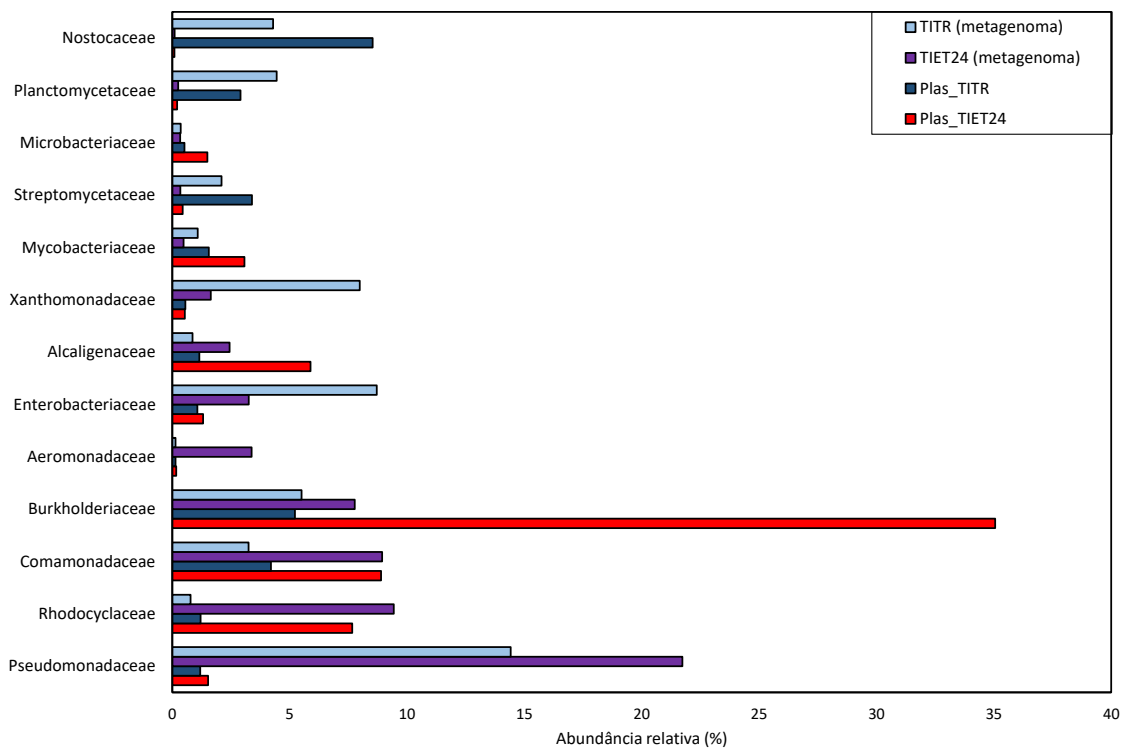


Figura 5.8: Distribuição taxonômica (utilizando o banco de dados RefSeq, a nível de família) dos possíveis hospedeiros mais representativos das sequências plasmidiais em cada ponto (Plas_TITR – Plasmidoma do ponto TITR 02800 e Plas_TIET24 – Plasmidoma do ponto TIET 02400) e dos dados obtidos pelo sequenciamento do metagenoma total para cada ponto (TITR (metagenoma) – análise taxonômica do metagenoma total do ponto TITR 02800 e TIET24 (metagenoma) – análise taxonômica do metagenoma total do ponto TIET 02400). Dados demonstrados pela abundância relativa em porcentagem.

5.5 Discussão

No presente trabalho, o plasmidoma de dois pontos, no Rio Tietê, contrastantes em relação ao nível de poluentes foi avaliado. De acordo com LIMA (2015) e ORTIZ (2015) estes locais são contrastantes quando à diversidade taxonômica e perfil físico-químico, sendo observado que as condições no ambiente, tais como turbidez, pH, alumínio e ferro são os principais fatores que modulam a diversidade e a riqueza de espécies. A variação nos parâmetros físico-químicos poderia justificar a variação na diversidade plasmidial, sendo este o principal motivo para a seleção dos pontos, além da relação com o impacto ambiental ao qual o ponto TIET 02400 está exposto.

Primeiramente foi realizado a comparação na distribuição dos filos presentes nos plasmídeos do Rio Tietê com os presentes no banco de dados ACLAME (*A Classification of Mobile Genetic Elements*). Esta análise permitiu observar que o perfil

dos possíveis hospedeiros encontrados no plasmidoma do rio Tietê difere do observado em trabalhos anteriores que compõe as sequencias do banco de dados ACLAME. A análise do plasmidoma do rumem de bovinos também apresentou discrepâncias quanto a comparação com os bancos de dados disponíveis, sendo dominado pelos filos Firmicutes, Proteobacteria e Bacteroidetes (KAV et al., 2012).

A comparação dos dados gerados nos 2 pontos do Rio Tietê, a distribuição dos filos bacterianos presentes no metagenoma (total e baseado em *amplicon*) e os possíveis hospedeiros plasmidiais seguiram a mesma abundância (Fig. 4.6 e 4.7). Porém, quando comparado ao nível taxonômico de família (Fig. 4.7 e 4.8), houveram alterações significativas, principalmente se comparado o metagenoma baseado em *amplicon* com o plasmidoma. Famílias como Microbacteriaceae, Mycobacteraceae, Rhodocyclaceae, Pelagibacteraceae, e Mycrocystaceae foram abundantes apenas no sequenciamento baseado em 16S rRNA, sendo Pelagibacteraceae, Mycrocystaceae e Pelagibacteraceae encontrados de forma exclusiva, determinando a ausência ou baixa abundância de sequencias plasmidiais nos pontos amostrados. Sequencias para a família Burkholderiaceae não foram abundantes no sequenciamento baseado no *amplicon* do gene 16S rRNA, porém foram abundantes no plasmidoma. Análises prévias realizadas nos mesmos pontos amostrados utilizando dados de bibliotecas do gene 16S rRNA demonstram que também não foi possível encontrar representantes para a família Burkholderiaceae (LIMA, 2015). A abundância de plasmídeos relacionados a família Burkholderiaceae no ponto TIET 02400 (que apresenta IQA ruim) pode indicar vantagens adaptativas que poderiam selecionar a presença e transferência destes genes em um local com elevada ação antrópica. Já foram relatados plasmídeos para o gênero Burkholderia com a capacidade de degradar e metabolizar o inseticida organofosforado fenitrothion (HAYATSU; HIRANO; TOKUDA, 2000). Ambientes que recebem descargas de efluentes são contaminados com pesticidas, corantes, plásticos e solventes que contém em sua constituição compostos nitroaromáticos como o 4-nitrocatecol. CHAUHAN et al. (2000) demonstraram uma via alternativa para metabolização de 4-nitrocatecol, e demonstraram que os genes que determinam esta via metabólica estão presentes em sequencias plasmidiais de *Burkholderia cepacia*, possibilitando a transferência destes genes e a possibilidade de metabolização deste composto tóxico por outras linhagens bacterianas. Além disto, o despejo de esgotos introduzem uma nova comunidade aos corpos d'água

(MCLELLAN; FISHER; NEWTON, 2015), e com isto a introdução de linhagens virulentas. Algumas cepas de *Burkholderia* são consideradas patogênicas (DREVINEK; MAHENTHIRALINGAM, 2010; MOLCHANOVA; AGEEVA, 2015), e já foram descritos plasmídeos que comportam genes de virulência (AGNOLI et al., 2012). Desta forma, é possível deduzir que a maior abundância de genes voltados a fatores de virulência e ao metabolismo de compostos aromáticos no ponto TIET 02400 (se comparado ao ponto TITR 02800) pode estar relacionado a abundância de plasmídeos de *Burkholderia*, principalmente por se encontrar em uma região com maior despejo de resíduos domésticos e industriais.

Analisando o perfil funcional, primeiramente foi realizado a comparação entre o plasmidoma e o metagenoma total em análise de redundância (RDA) (Fig. 5.3). Pela distribuição dos pontos analisados, os pontos do plasmidoma se distanciaram dos pontos relativos ao metagenoma total, validando o sequenciamento como não relativo a DNA metagenômico. Os principais fatores que contribuíram para a separação do plasmidoma em relação ao metagenoma total foram os genes relacionados às funções de “motilidade celular”, “mecanismos de defesa”, “metabolismo e transporte de íon inorgânico”, “catabolismo e transporte de metabólitos secundários” e “mecanismo de transdução de sinais” (tabela 5.3). Estes genes geralmente são relacionados ao aumento de *fitness* ecológico (WINK, 2003; VILA-AIUB; GUNDEL; PRESTON, 2015), e a presença destes genes em sequencias plasmidiais aumentariam a adaptação das linhagens bacterianas às condições do ambiente.

Com relação ao perfil funcional (Fig. 5.4), o ponto TIET 02400 (IQA ruim) apresentou mais genes que codificam proteínas relacionadas às classes de “transporte transmembrana”, “parede celular e cápsula” e “virulência, doença e defesa” se comparado ao ponto TITR 02800. O ponto TIET 02400 recebe grandes quantidade de resíduos domésticos e industriais diariamente, o que o classifica com IQA ruim e pode ser comprovado pela presença de grandes concentrações de nitrogênio amoniacal e turbidez (tabela 5.1). Desta forma, os genes que codificam proteínas associadas a síntese de cápsula presente em plasmídeos pode ser um indicativo de seleção pela presença de xenobióticos (ARSHAD et al., 2016). Além disto, analisando os genes que codificam proteínas voltadas a “virulência, doenças e defesa”, houve maior abundância de genes associados ao fenótipo de resistência a antibióticos e compostos tóxicos. Por estarem em plasmídios, poderiam ser distribuídos

horizontalmente por meio de conjugação, garantindo vantagens adaptativas a comunidade decorrente do despejo de resíduos. A maior porcentagem de genes voltados a capacidade de degradar compostos aromáticos juntamente com proteínas transportadoras do tipo ABC e bombas de efluxo podem indicar aumento do *fitness* bacteriano mediado por conjugação no ponto TIET 02400, já que estes sistemas estão relacionados a presença de determinados xenobióticos, como agroquímicos e metais pesados. Comparando amostras de água doce em regiões urbanizadas, é possível verificar aumento na abundância de genes que conferem resistência a antibióticos e compostos tóxicos (como zinco e cádmio), bem como bombas de efluxo e transportadores do tipo ABC em amostras urbanizadas se comparada a amostras de ambientes não-urbanizados (MEDEIROS et al., 2016). Porém, os trabalhos relacionando ambientes de água doce com a urbanização são realizados com base no metagenoma total. A presença destes genes em amostras plasmidiais, indicam a vantagens adaptativas a presença de compostos tóxicos. Os principais genes voltados a resistência a substâncias tóxicas foram relacionados a cádmio-zinco-cobalto, sendo mais abundante no ponto TIET 02400, onde as concentrações de zinco foram mais elevadas se comparado ao ponto TITR 02800. Porém, no ponto TITR 02800 os níveis de cádmio foram mais elevados, sendo também observado uma maior abundância de genes voltados a resistência especificamente ao cádmio. Estas relações sugerem que as características ambientais determinam a seleção de genes de resistência a substâncias tóxicas presentes nestes plasmídeos.

Ainda com relação a genes relacionados a aquisição de ferro, a sua abundância foi 33% maior em TIET 02400 do que em TITR 02800 (Fig. 5.4). A concentração de ferro total e dissolvido foi mais abundante em TIET 02400 em relação a TITR 02800 (Tabela 5.1). Segundo RADA (2018), mais genes relacionados a aquisição e metabolismo do ferro estão presentes no ponto TITR 02800 se comparado a TIET 02400 em análises de metagenoma total. Este resultado correlaciona negativamente com a concentração ferro total e dissolvido, o que seria esperado já que a presença de sideróforos no genoma bacteriano auxiliaria na aquisição de ferro em ambientes com baixas concentrações (BOITEAU et al., 2018). Até o momento, a presença de genes que codificam sideróforos em plasmídeos foi descrito apenas em *Vibrio anguillarum*, em que a aquisição de ferro tem sua função relacionada a fatores de virulência (WELCH; CHAI; CROSA, 2000; ALICE; LÓPEZ; CROSA, 2005). Houve

maior abundância de representantes para a família Vibrionaceae no metagenoma e no plasmidoma para o ponto TIET 02400 (0,45%) em comparação ao ponto TITR 02800 (0,42%). Apesar da concentração de ferro ser maior no ponto TIET 02400 se comparado ao ponto TITR 02800, a abundância de sideróforos em plasmídeos pode estar relacionada a presença de linhagens patogênicas, que se utilizam da aquisição de ferro do hospedeiro como fator de virulência, como no caso do *Vibrio anguillarum*.

No plasmidoma a abundância de genes voltados para fotossíntese variou entre as amostras do ponto TITR 02800 (1,3%) e do ponto TIET 02400 (0,08%). O filo Cyanobacteria (Nostocaceae e Prochlorococcaceae) foi abundante no ponto TITR 02800 no metagenoma e no plasmidoma, sugerindo a abundância de plasmídeos para as famílias Nostocaceae e Prochlorococcaceae. Estas famílias apresentam a capacidade de realizar fotossíntese, e a presença de genes fotossintéticos em sequências plasmidiais poderia indicar ganho de fitness ecológico no ponto TITR 02800, relacionado a vantagens no ganho energético (RIMSHA et al., 2014). Além disto, as famílias Prochlorococcaceae e Chroococcaceae foram correlacionadas com a capacidade fotossintética e “cofatores, vitaminas e pigmentos” por Haggerty and Dinsdale (2017), e comparando com os dados demonstrados na figura 5.4, os genes que codificam proteínas para “cofatores, vitaminas, grupo prostético e pigmentos” foi 25% mais abundante no ponto TITR 02800 se comparado ao ponto TIET 02400. Além das características dos filios, a presença de genes fotossintéticos em sequências plasmidiais podem ser selecionadas pela menor turbidez no ponto com IQA ótimo (TITR 02800). A turbidez influencia diretamente na taxa de fotossíntese em microorganismos aquáticos (WAIDNER; KIRCHMAN, 2007). Com menores taxa de turbidez, ocorre a seleção de genes fotossintéticos em sequências plasmidiais, relacionando ao aumento de genes voltados a fotossíntese no ponto TITR 02800.

Com relação aos genes que codificam proteínas associadas ao metabolismo do fósforo, no ponto TITR 02800 estes genes foram 35% mais abundância em relação ao ponto TIET 02400 (Fig. 5.4). A concentração de fósforo total em TITR 02800 foi de 0,01 mg/L, sendo que para o ponto TIET 02400 foi de 2,31 mg/L (Tabela 5.1). Como a maior parte dos genes anotados para o metabolismo do fósforo são relacionados a proteínas responsáveis pelo transporte e assimilação, é possível deduzir que a presença destes genes em plasmídeos confere vantagem adaptativa para a

comunidade bacteriana no ponto TITR 02800, já que garantiria maior assimilação de fósforo.

Além das características ambientais afetarem a diversidade bacteriana e as funções metabólicas encontradas em um determinado ambiente, elas também afetam a seleção dos genes que são passíveis de serem transferidos lateralmente. Ou seja, o nicho ecológico microbiano seleciona tanto ao nível de diversidade taxonômicas quanto ao nível gênico. A seleção de plasmídeos de acordo com as características físico-químicas do Rio Tietê é um indício de que ocorre uma pressão de seleção também em fatores gênicos não essenciais, caracterizando aumento do *fitness* ecológico para algumas espécies e mantendo estes plasmídeos onde dadas características gênicas sejam essenciais e/ou vantajosas.

Desta forma, conclui-se que plasmídeos relacionados a família *Burkholderiaceae* está relacionado ao ponto com maior despejo de resíduos domésticos e industriais (TIET 02400) no rio Tietê, provavelmente pela presença de genes relacionados a degradação de compostos tóxicos. Além disto, genes relacionados ao metabolismo do ferro também foram mais abundantes no ponto TIET 02400 em relação ao ponto TITR 02800, sendo possivelmente relacionados a fatores de virulência. O ponto TITR 02800 é caracterizado como um ambiente limpo (IQA ótimo), sendo encontrados genes voltados ao ganho de *fitness* ecológico pela presença de genes relacionados ao ganho energético (como maior porcentagem de genes relacionados a fotossíntese) e aquisição de elementos encontrados em baixas concentrações (como o fósforo). Sendo assim, pode-se concluir que os genes encontrados em sequencias plasmidiais, além de determinar vantagens adaptativas para os hospedeiros, são selecionados pelas características do ambiente.

6 CAPÍTULO 4: DIVERSIDADE DE GENES QUE CONFEREM RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS

6.1 Resumo

O uso indiscriminado de antibióticos traz agravantes quanto a seleção de espécies bacterianas resistentes a maior parte dos antibióticos disponíveis atualmente. Além disto, a presença de antimicrobianos no ambiente traz consequências adversas quando a composição da comunidade microbiana. Rios geralmente recebem cargas de antibióticos por processos de lixiviação e despejo de resíduos urbanos determinando a seleção de espécies resistentes em ambientes naturais. Desta forma o objetivo deste trabalho foi avaliar por meio de análise metagenômica a distribuição e abundância de genes de resistência a antibióticos em quatro pontos do Rio Tietê. Para isto, foi realizada a busca pelos genes e correlacionados com as características físico-químicas de cada ponto, que apresentam índices de qualidade de água (IQA) distintos. Foi possível verificar que os pontos com IQA ótimo, bom e regular agruparam com relação aos genes que conferem resistência a antibióticos, sendo que apenas o ponto com IQA péssimo ficou separado. O ponto com IQA péssimo (TIET 02400) foi o que apresentou maior abundância de genes associados a resistência a antibióticos e maior equitabilidade se comparado aos outros três pontos com qualidade de água melhor. O ponto com IQA ótimo (TITR 02800) teve em sua maioria, genes de resistência a antibióticos caracterizados como bombas de efluxo, sugerindo que possa estar ocorrendo co-seleção destas bombas de efluxo pela presença de outros compostos na água. Além disto, baseado no gradiente na concentração de metais pesados no rio Tietê, foi observada correlação positiva entre a abundância de genes que conferem resistência a sulfonamidas, MLS e aminoglicosídeos e a presença de alumínio, chumbo e cobre. Desta forma, é possível determinar que as características ambientais podem selecionar genes que conferem resistência a antibióticos por co-seleção gênica, ou seja, em algumas situações as condições ambientais podem determinar a presença de genes de importância clínica, destacando a importância da implementação no tratamento de rios e receptores finais de despejos domésticos e industriais.

Palavras-chave: Rio Tietê. Metagenômica. Atividade antrópica.

6.2 Introdução

Agentes antimicrobianos tem sido utilizado em grande quantidade nas últimas décadas, tendo o seu crescimento a partir da introdução de sulfonamidas na década dos anos 1930 (RODRIGUEZ-MOZA; WEINBERG, 2010). O uso de antibióticos se faz importante pela ação no tratamento de doenças infecciosas, não sendo utilizado apenas em humanos, mas também em práticas veterinárias, agricultura e aquicultura (KÜMMERER, 2009). Estima-se que metade do total de antibióticos produzidos são utilizados na produção animal, não somente para a prevenção e tratamento de doenças, mas também para a promoção de crescimento (SEILER; BERENDONK, 2012). Como consequência do uso indiscriminado de antimicrobianos, há um aumento na abundância de genes que conferem resistência a antibióticos (antibiotic resistance genes – ARG), o que atualmente é o maior desafio para a segurança da saúde pública (RODRIGUEZ-MOZAZ et al., 2015). Estima-se que 700.000 mortes são decorrentes de doenças infecciosas causadas por bactérias resistentes a antibióticos, o que dificulta o processo de tratamento (GUYOMARD-RABENIRINA et al., 2017). Porém, o aumento de ARGs não é associado apenas ao uso de antibióticos pelos humanos, estudo recentes sugerem que alguns patógenos humanos resistentes a antibióticos são correlacionados ao uso de antibióticos de outras fontes, principalmente no uso veterinário (PROIA et al., 2016). ARGs são encontrados frequentemente em amostras de solo, sedimento, águas superficiais e lodo, sendo considerados reservatórios para resistência (ZHANG; ZHANG, 2011). Estudos recentes têm demonstrado que a troca de ARGs entre bactérias de ambientes naturais e patógenos clínicos ocorrem via transferência lateral. A relação de bactérias ambientais no processo de resistência a antibióticos de patógenos humanos indicam a importância de se entender e analisar a diversidade de ARGs em amostras ambientais, com o objetivo de identificar potencial reservatórios desses genes (XU et al., 2016b). Atualmente, pesquisas envolvendo bactérias resistentes são focadas em ambientes hospitalares, negligenciando ambientes naturais, principalmente aqueles com elevada ação antrópica e despejo de resíduos.

A ação antrópica nos diversos biomas pode desencadear a disseminação e evolução de ARGs (PROIA et al., 2016). Ambientes de água doce são afetados diretamente por poluentes urbanos, o que pode levar ao entendimento que estes

ambientes se tratam de *hotspots* para a seleção e disseminação de genes que conferem resistência a antibióticos. Desta forma, os rios urbanos devem ser alvos para estudos e entendimento da propagação de ARGs (LI et al., 2015b; YANG et al., 2017). O despejo de resíduos urbanos em rios tem por consequência o aumento na concentração de metais pesados. Existe uma forte relação entre a presença de ARGs e metais pesados, determinados por um processo de co-seleção (SEILER; BERENDONK, 2012; DI CESARE et al., 2016). Uma das explicações deste processo seria a presença de *integrons*, como o *integron* de classe 1, que aumenta o *fitness* bacteriano em ambientes impactados (DI CESARE et al., 2016). Com a comunidade bacteriana exposta a algum estresse químico (decorrente da ação antrópica como metais pesados, antibióticos, dentre outros), ocorre a co-seleção do cassete de genes que configuram o *integron*, selecionando a resistência para diversos compostos químicos. Este processo também pode ser encontrado em plasmídeos e transposons que contenham genes de resistência a determinados compostos químicos (XU et al., 2016a; ZHOU et al., 2016).

Além disto, a concentração de metais pesados geralmente é muito mais elevada se comparada a concentração de antibióticos em ambientes de água doce, visto que os metais não são expostos a degradação, assim como ocorre com os antibióticos (DEMIRBAS, 2008). Além de metais pesados, alguns agroquímicos, como os herbicidas são relacionados com o aumento na resistência a antibióticos, como o uso de doses sub-letais de dicamba, 2,4-D e glifosato. O processo de co-seleção pode ser derivado do aumento da expressão de bombas de efluxo, ou pela síntese reduzida de alguma porinas de membrana (KURENBACH et al., 2015). Pelo processo de lixiviação, rios próximos a regiões de elevada atividade agrícola recebem concentrações significantes de agroquímicos, o que poderia levar, por consequência, ao processo de co-seleção de genes que conferem resistência a antibióticos.

O rio Tietê é considerado o principal rio do estado de São Paulo (Brasil), percorrendo 1.136 km até desaguar o rio Paraná. Por consequência da sua extensa utilização, ocorreu a diminuição das áreas naturais e aumento da ação antrópica, levando a crescente ocupação do solo, destruição e substituição das formações vegetais primitivas por pastagens e culturas, além de receber grandes quantidades de poluentes industriais e esgotos domésticos (MORTATTI; DE MORAES; PROBST, 2012; ORTIZ-VERA et al., 2018). Estima-se que 700 toneladas de esgoto doméstico

e indústrias sejam despejados diariamente no rio. Sob condições normais, os rios apresentam a capacidade de degradar as cargas poluidoras de origem orgânica por um processo biológico denominado autodepuração. Na região metropolitana de São Paulo (onde a maior carga de poluentes é descarregada), o processo de autodepuração não é evidenciado, por consequência da quantidade de esgoto lançada no rio e também ao percurso que o Tietê percorre após os processos de retificação. Porém, alguns quilômetros a jusante da região metropolitana, o rio começa a encontrar as condições apropriadas para a autodepuração, levando a “recuperação” do rio. Apesar da qualidade da água ser classificada como boa, é possível detectar elevados níveis de coliformes fecais, fosfato total e principalmente metais, tais como cádmio (Cd), chumbo (Pb), cobre (Cu), níquel (Ni) e zinco (Zn) (CETESB, 2016). Desta forma, o objetivo deste trabalho foi realizar o levantamento da diversidade de genes que conferem resistência a antibióticos e avaliar a correlação entre a abundância destes genes com as características físico-químicas do Rio Tietê, principalmente pelos níveis de metais tóxicos.

6.3 Material e métodos

6.3.1 Pontos amostrados

Foi realizado a coleta da água superficial de quatro pontos, com localização geográfica distintas do Rio Tietê, Estado de São Paulo, Brasil (Fig. 6.1). A seleção dos locais amostrados foram baseados no Índice de Qualidade de Água (IQA-determinado pela variação dos parâmetros físico-químico), bem como nos índices de diversidade e riqueza em trabalhos realizados anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa (LIMA, 2015; RADA, 2017; ORTIZ-VERA et al., 2018).

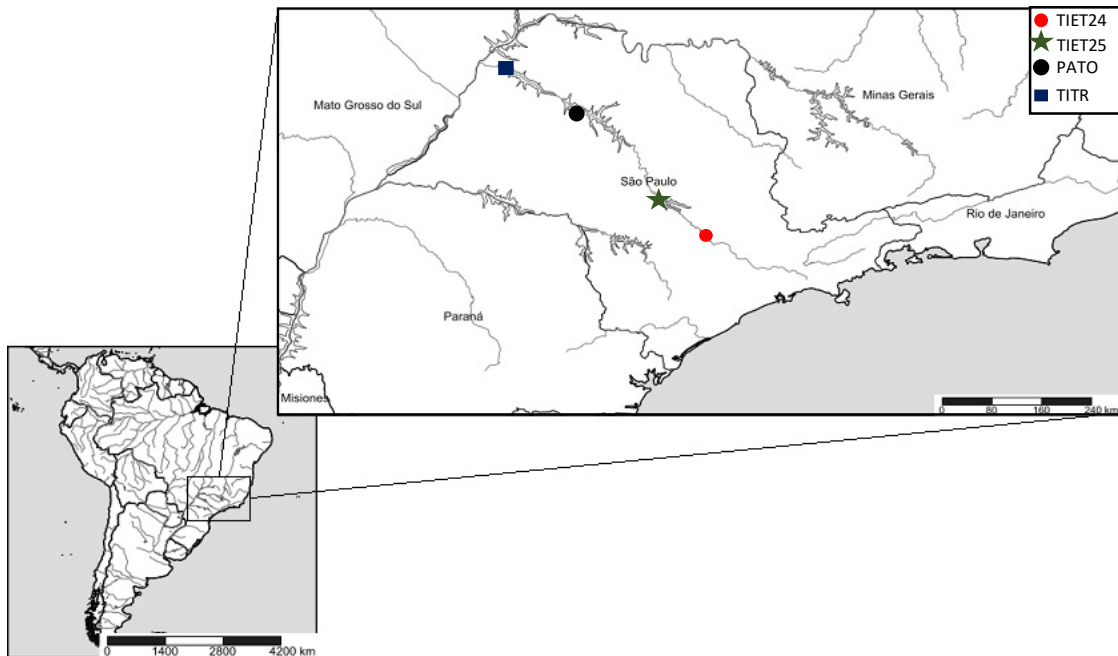


Figura 6.1: Localização dos pontos de amostragem utilizados para análise do plasmidoma. TIET24 representado em vermelho é referente ao ponto TIET 02400, TIET25 representado em verde é referente ao ponto TIET 02500, PATO representado em preto é referente ao ponto PATO 02900, e TITR representado em azul é referente ao ponto TITR 02800.

O volume de água coletado foi determinado pelas características do ambiente. O ponto TIET02400 apresentou alta quantidade de nutrientes e baixa disponibilidade de oxigênio, por este motivo foi realizada a coleta de aproximadamente 6,5 L de água em triplicatas. Já os pontos TIET02500, PATO02900 e TITR02800 apresentaram baixa quantidade de nutrientes e alta disponibilidade de oxigênio, sendo necessário a coleta de 16,5 L de água por réplica a fim de se obter quantidades suficientes de DNA para sequenciamento. As coletas foram realizadas pela Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) e mantidas a 4°C até o processo de filtração. As amostras foram filtradas em membranas de celulose com 1,2 e 0,22 μm de porosidade, com 144 mm de diâmetro, e mantidas sob refrigeração a -80°C.

6.3.2 Extração do DNA e sequenciamento

As amostras utilizadas neste trabalho foram geradas por RADA (2018), como descrito a seguir.

Após a filtração, as membranas de 0,2 e 1,2 μm , foram maceradas com nitrogênio líquido e o DNA foi extraído utilizando o protocolo descrito por Castro et al., 2011 (CITAÇÃO) com modificações. Em tubos de 50 ml, 10 g de filtro macerado foi

diluído em 15 ml de tampão de extração (Tris/HCl 100 mM, pH 8.0, Fosfato de Sódio 100 mM, EDTA 100 mM, pH 8.0, NaCl 1.5 M, CTAB 1% w/v) e submetidos a sucessivos ciclos de congelamento /descongelamento (40 min). Após a última etapa de descongelamento, foram adicionados 4,5 ml de SDS 20% e 2,5 ml de Isotiocianato de Guanidina (5 M) e incubados durante 2 h a 65 °C, e posteriormente centrifugados a 5000 g, a 10 °C durante 1 h, sendo coletado o sobrenadante. Foi adicionado 12 ml de Clorofórmio/Álcool Isoamílico (24:1) a centrifugado a 5000 g durante 1 h a 10 °C. O sobrenadante precipitado com 20 ml de Isopropanol 70% (v/v) durante 20 min à temperatura ambiente, sendo posteriormente centrifugado durante 90 min a 5000 g a 10 °C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em 500 µl de TE pH 8.0. Foi adicionado iguais volumes de tampão Tris-Fenol/Clorofórmio seguido de centrifugação a 1000 xg durante 10 min à temperatura ambiente. O sobrenadante foi coletado e adicionado igual volume de Clorofórmio/Ácido Isoamílico e centrifugado a 1000 xg durante 10 min. O sobrenadante (DNA) foi transferido para um novo tubo e estocado a -20 °C. Após extração, o gDNA foi preparado de acordo com instruções da empresa responsável MacroGen Inc., (<https://dna.macrogen.com/eng/>) e enviado para sequenciamento na plataforma Illumina® HiSeq2000. Todas as amostras foram enviadas em triplicata.

6.3.3 *Parâmetros físico-químicos*

Os parâmetros físico-químicos utilizados neste trabalho foram gerados pela CETESB no momento da coleta, e estão descritos no relatório “Qualidade de águas Superficiais”, do ano de 2015 publicados no site da empresa (<https://cetesb.sp.gov.br/>).

6.3.4 *Análises bioinformáticas*

Foram analisados os *reads* com qualidade para a busca de genes que conferem resistência a antibióticos. O banco de dados utilizado foi o MEGARes (LAKIN et al., 2017), que contém aproximadamente 4.000 genes de resistência a antibióticos curados manualmente. Para a anotação dos genes, foi utilizado a ferramenta AMRPlusPlus.

6.3.5 Análises estatísticas

A diversidade de genes que conferem resistência a antibióticos foi comparada com os parâmetros físico-químicos. As análises de abundância e correlação foram realizadas utilizando o programa R v3.5.1. A análise de correlação foi realizada pela correlação de Pearson, e os resultados apresentados utilizando o pacote ggplot2.

6.4 Resultados

6.4.1 Parâmetros físico-químicos

Os parâmetros físico-químicos no Rio Tietê são medidos periodicamente pela CETESB e disponibilizados anualmente no relatório de águas superficiais. Na tabela 6.1 são descritos os parâmetros considerados para a obtenção do índice de qualidade de águas (IQA) nos quatro pontos utilizados neste trabalho, além da comparação com os limites estabelecidos pelo CONAMA.

Tabela 6.1: Parâmetros físico-químicos avaliados pela CETESB nos pontos amostrados e comparação dos limites estabelecidos pelo CONAMA. Fonte: CETESB 2014. (RADA, 2017)

Parâmetros	Limite CONAMA	TIET02400	TIET02500	PATO02900	TITR02800
Condutividade ($\mu\text{S/cm}$)	-	685	441	209	171
OD (mg/L)	>5	1,2*	5,26	2,7*	7,6
DBO (mg/L)	<5	55*	6*	7*	2
Fósforo total (mg/L)	<0,1	3,36*	0,36*	0,45*	0,017
Nitrato (mg/L)	<10	< 0,2	5,66	< 1	< 1
N-amoniacal (mg/L)	<3,7	22,3*	0,4*	3,42	0,1
Turbidez (UNT)	<100	120*	11,7	7,6	2,7
E.coli (UFC/100 ml)	<600	6900*	80	468	1

Clorofila a (mg/L)	<30	-	32,41*	1,07	10,16
UGRHI	-	10	13	19	19
Classificação – IQA	-	péssima	boa	regular	ótima
Valor do IQA	-	15	60	47	86

Como é possível observar na tabela 6.1, as amostras utilizadas neste trabalho foram classificadas como ótima (TITR02800), boa (TIET02500), regular (PATO02900) e péssima (TIET02400), abrangendo todos os limites de IQA passíveis de serem comparados. Baseado na análise de componentes principais (PCA), foi possível observar que não houve agrupamento entre os quatro pontos analisados, obtendo 91,5% de explicação (PC1=72,4% e PC2=19,1%) da variação (Figura 6.2). Baseado na contribuição dos parâmetros na separação das amostras, destaca-se o nitrato como o principal fator na separação do TIET02500 dos outros pontos, sendo encontrado 5,66 mg/L, que apesar de estar abaixo do estabelecido pelo CONAMA é mais elevado se comparado às outras amostras que variam de 0,2-1 mg/L. O ponto PATO02900 foi considerado com IQA regular no período em que foi realizado a coleta, e de acordo com o PCA, a concentração de cádmio, embora esteja abaixo de 0,001 mg/L (ainda dentro do estabelecido pelo CONAMA), é o fator que mais determina a diferença entre ponto dos demais pontos avaliados. Os parâmetros Cobre, Chumbo, Cloreto, Sódio, Condutividade, Potássio, Cromo, Níquel, Sólidos Totais, Zinco, Alumínio dissolvido, Alumínio total, Turbidez, Magnésio, Fósforo, Demanda Bioquímica de Oxigênio, Ferro total, Bário, Temperatura do ar e Carbono Orgânico Total foram determinantes para a separação do ponto TIET02400.

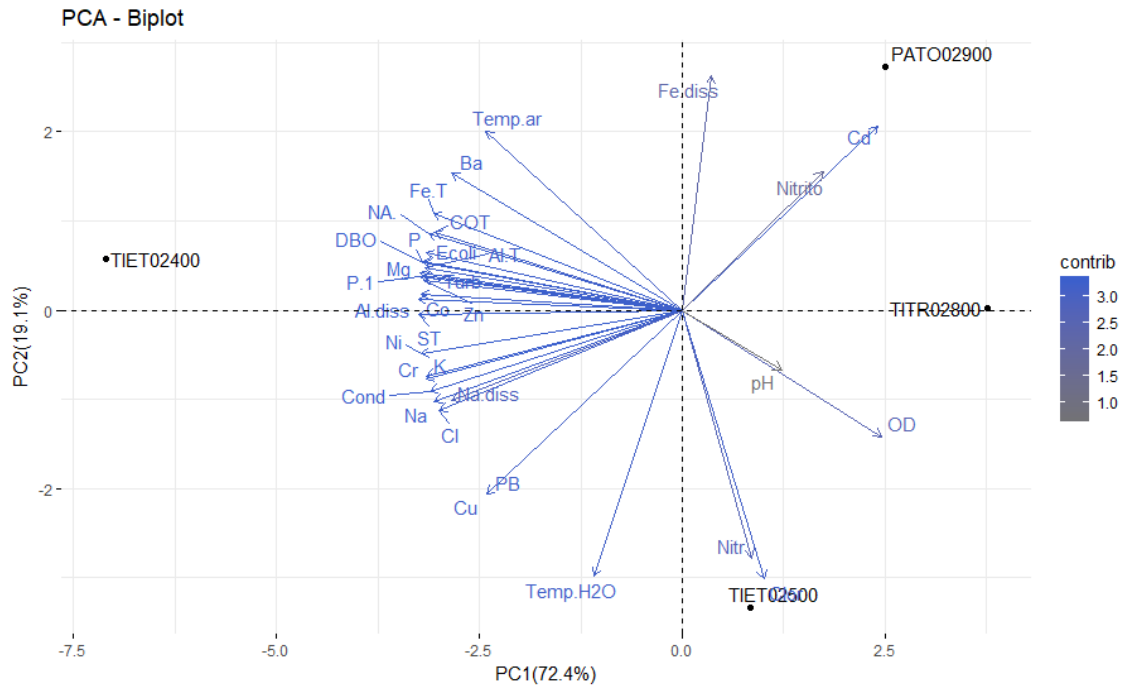


Figura 6.2: Análise de componentes principais (PCA) utilizando os parâmetros físico-químicos disponibilizados pela CETESB. Os pontos correspondem aos pontos selecionados para a coleta, e as setas correspondem a contribuição de cada parâmetro no agrupamento das amostras. Parâmetros: Ferro dissolvido (Fe.diss), Cádmio (Cd), Nitrito (Nitrito), pH (pH), Oxigênio Dissolvido (OD), Nitrito (Nitr), Temperatura da água (Temp.H2O), Cobre (Cu), Chumbo (PB), Cloreto (Cl), Sódio (Na), Condutividade (Cond), Potássio (K), Cromo (Cr), Níquel (Ni), Sólidos Totais (ST), Zinco (Zn), Alumínio dissolvido (Al.diss), Alumínio total (Al.T), Turbidez (Turb), Magnésio (Mg), Fósforo (P), Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), Ferro total (Fe.T), Bário (Ba), Temperatura do ar (Temo.ar) e Carbono Orgânico Total (COT).

6.4.2 Correlação entre os pontos baseado na resistência a antibióticos

Inicialmente, foi realizado uma análise de coordenadas principais para verificar o grau de similaridade entre as réplicas, além do nível de agrupamento entre os pontos avaliados (Fig. 6.3). Em uma análise preliminar, a réplica 2 do ponto TITR 02800 apresentou uma variação muito grande em relação as outras amostras, e por este motivo foi retirada das análises subsequentes (Fig. 6.1A- anexo).

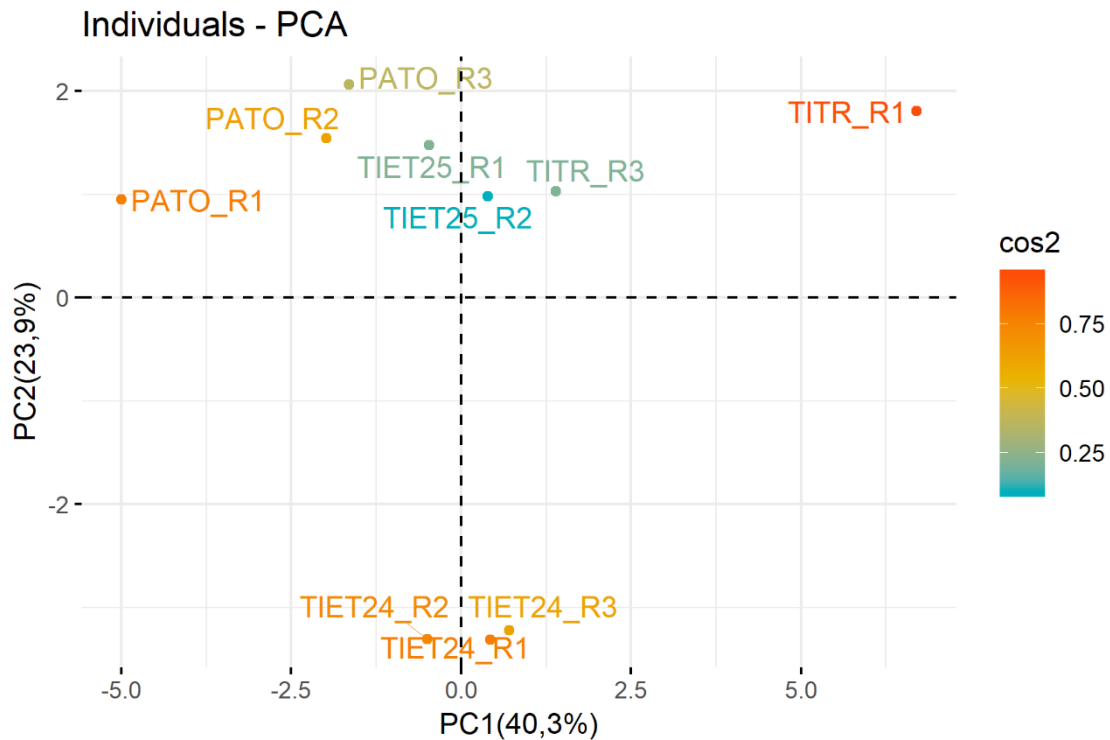


Figura 6.3: Análise de componentes principais (PCA) utilizando os genes que conferem resistência a antibióticos nas amostras do Rio Tietê. TITR_R1, TITR_R2 e TITR_R3 correspondem ao ponto TITR02800 (réplicas 1, 2 e 3 respectivamente). TIET24_R1, TIET24_R2 e TIET24_R3 correspondem ao ponto TIET02400 (réplicas 1, 2 e 3 respectivamente). TIET25_R1 e TIET25_R2 correspondem ao ponto TIET02500 (réplicas 1 e 2 respectivamente).

Foi possível obter uma explicação de 64,2% (PC1=40,3% e PC2= 23,9%). De acordo com o agrupamento, é possível verificar a separação das três réplicas do ponto TIET02400 (IQA péssimo), e a formação de um agrupamento com os pontos PATO, TIET 02500 e TITR.

6.4.3 Diversidade de genes que conferem resistência a antibióticos

Para realizar a análise quantitativa dos genes que conferem resistência a antibióticos, foi utilizado o banco de dados MEGAs contra os *reads* com qualidades boas do metagenoma do Rio Tietê. Este banco de dados faz a classificação dos genes a nível de classe, mecanismo e grupos. Neste trabalho foram utilizados os dados de grupo e classes.

Ao longo do Rio Tietê, foram identificados 556 genes que conferem resistência a 22 classes diferentes de antibióticos. Na figura 6.4, o ponto TIET 02400, que apresenta IQA péssimo, apresentou significativamente mais genes que conferem resistência a antibióticos se comparado aos outros locais, com aumento de 63% ao segundo ponto com maior abundância (TITR 02800). Já os pontos TITR 02800, TIET 02500 e PATO 02900 não apresentaram diferenças significativas em relação à abundância de genes associados à resistência à antibióticos.

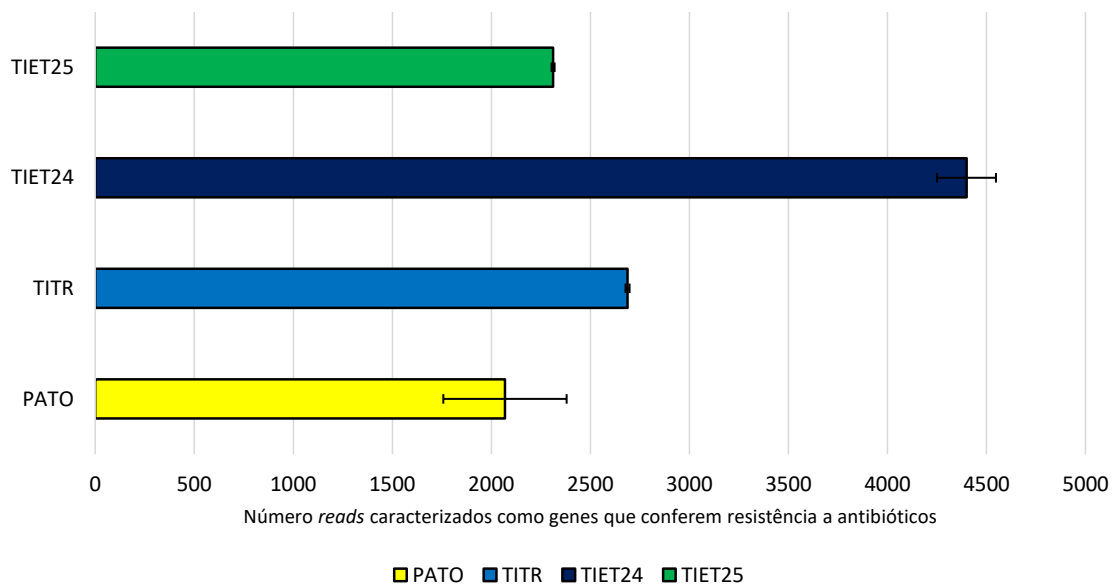


Figura 6.4: Número de *reads* que apresentaram similaridade a genes que conferem resistência a antibióticos. Pontos: TIET 02500 (TIET25), TIET 2400 (TIET24), TITR 02800 (TITR) e PATO 02900 (PATO).

A abundância relativa dos 22 genes mais abundantes está representada na figura 6.5 (na forma de porcentagem). O gene *rpoB* teve a maior abundância relativa em todos os pontos, variando de $6,4 \times 10^{-3}$ cópias/16S rRNA (PATO 02900) à $9,97 \times 10^{-3}$ cópias/16S rRNA (TITR 02800). Os outros genes com maior abundância em todos os pontos são *gyrA* (variando de $3,73 \times 10^{-3}$ cópias/16S rRNA em TIET 02400 a $5,43 \times 10^{-3}$ cópias/16S rRNA em TIET 02500), e *tufAB* ($2,56 \times 10^{-3}$ cópias/16S rRNA em PATO 02900 à $8,51 \times 10^{-3}$ cópias/16S rRNA em TITR 02800).

Analisando os grupos de genes exclusivos na degradação/eliminação de antibiótico/xenobióticos (não relacionado a mutação em algum gene constitutivo como

nos genes citados anteriormente), o gene *oxa*, é encontrado com maior prevalência no ponto TIET 02400 com $5,50 \times 10^{-3}$ cópias/16S rRNA (se comparado aos outros três pontos que variam de $1,52 \times 10^{-3}$ cópias/16S rRNA a $1,86 \times 10^{-3}$ cópias/16S rRNA). Ainda com relação ao ponto TIET 02400, o gene *sull* (gene que confere resistência a sulfonamidas) apresenta maior abundância ($5,07 \times 10^{-3}$ cópias/16S rRNA) se comparado ao segundo ponto mais abundante (TIET 02500- $8,24 \times 10^{-4}$ cópias/16S rRNA). *sme* foi o grupo que apresentou maior abundância no ponto TITR 02800 ($3,16 \times 10^{-2}$ cópias/16S rRNA), representando 43% de todos os genes de resistência presentes neste ponto (Figura 6.5).

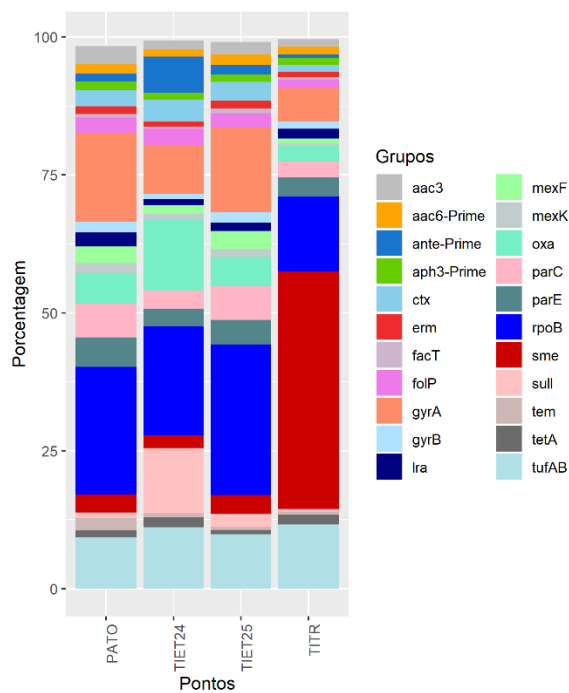


Figura 6.5: Abundância relativa dos genes que conferem resistência a antibióticos nas amostras do Rio Tietê. Grupos: representam os genes. Pontos: PATO corresponde ao ponto PATO02900, TITR corresponde ao ponto TITR02800, TIET24 corresponde ao ponto TIET02400 e TIET25 corresponde ao ponto TIET02500. Os valores são representados pelas médias das triplicatas.

A abundância relativa dos genes que conferem resistência às classes de antibióticos (antibióticos aos quais os genes conferem resistência), estão apresentados na figura 6.6 (representados em porcentagem).

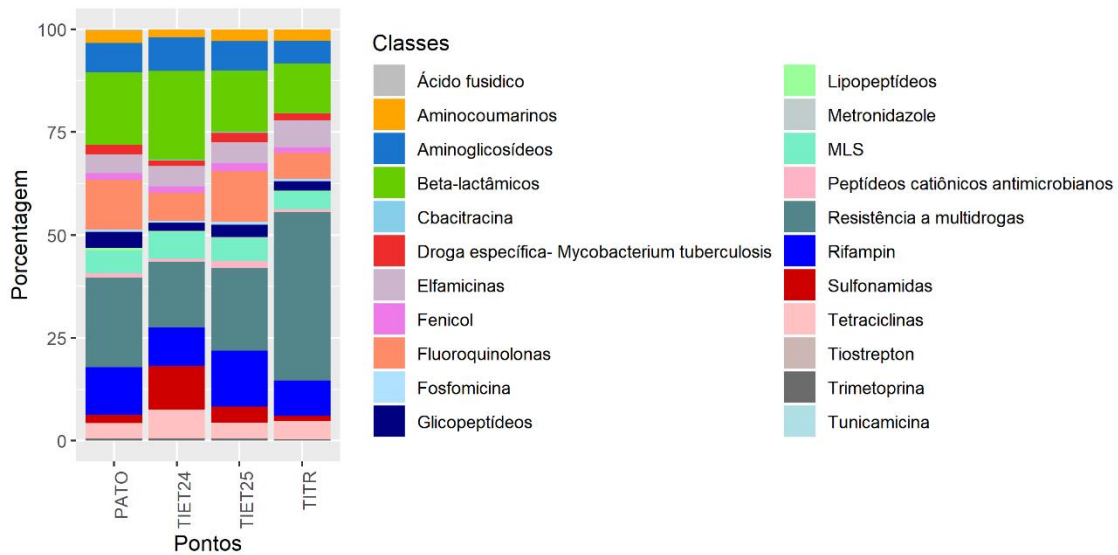


Figura 6.6: Abundância relativa das classes de antibióticos aos quais os genes conferem resistência nas amostras do Rio Tietê. Classe: representam as classes de antibióticos. Pontos: PATO corresponde ao ponto PATO02900, TITR corresponde ao ponto TITR02800, TIET24 corresponde ao ponto TIET02400 e TIET25 corresponde ao ponto TIET02500. Os valores são representados pela média das triplicatas.

O ponto TITR 02800 apresenta a prevalência maior abundância de genes associados a resistência a multidrogas (representando 40% com $5,33 \times 10^{-2}$ cópias/16S rRNA). Já os genes para resistência a sulfonamidas tem maior abundância no ponto TIET02400 ($1,05 \times 10^{-2}$ cópias/16S rRNA) se comparado aos outros pontos que variam de $1,18 \times 10^{-3}$ cópias/16S rRNA (PATO 02900) a $3,01 \times 10^{-3}$ cópias/16S rRNA. De forma geral, o ponto TIET02400 apresentou maior diversidade de genes se comparado aos outros pontos, visto que houve uma maior equitabilidade na distribuição dos genes, sem existir prevalência de um gene em específico, como ocorreu em TIET02800. Isto pode ser decorrência a maior taxa de despejo de resíduos próximo a este ponto. Não há relatos da presença de antibióticos no Rio Tietê, porém a prevalência destes genes de resistência a antibióticos pode ocorrer também de forma indireta, com a presença de metais pesados e outras moléculas orgânicas que serviriam como pressão de seleção para tais genes.

6.4.4 *Influência dos fatores ambientais na distribuição dos genes de resistência a antibióticos*

A análise da quantificação de metais pela CETESB (tabela 6.2) mostrou que o ponto TIET 02400 (IQA péssimo) apresenta as maiores concentrações dos metais bário, ferro total, zinco, cobre total, níquel, alumínio (dissolvido e total), cromo e manganês. Por outro lado, a concentração de ferro dissolvido é mais elevada no ponto PATO 02900 (Tabela 6.2).

Tabela 6.2: Concentração de metais pesados encontrados nos quatro pontos analisados*.

<i>Parâmetro</i>	TIET 02400	TIET 02500	PATO 02900	TITR 02800
<i>Ferro dissolvido</i>	0,44	0,1	1,47	0,11
<i>Ferro total</i>	3,6	0,56	0,456	0,017
<i>Zinco</i>	0,26	0,02	0,005	0,006
<i>Cobre dissolvido</i>	0,009	0,009	0,005	0,005
<i>Cobre total</i>	0,05	0,01	0,005	0,005
<i>Níquel</i>	0,04	0,02	0,01	0,01
<i>Chumbo</i>	0,009	0,009	0,008	0,008
<i>Cádmio</i>	0,0007	0,0007	0,001	0,001
<i>Mercúrio</i>	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002
<i>Alumínio dissolvido</i>	0,27	0,1	0,075	0,05
<i>Alumínio total</i>	13,8	0,26	0,118	0,05
<i>Cromo</i>	0,04	0,02	0,005	0,005

* dados obtidos do relatório de qualidade de água 2015 da CETESB.

Foi realizada a análise de correlação de Spearman entre os parâmetros físico-químicos do Rio Tietê (principalmente metais pesados e indicadores de despejo de resíduos) e os antibióticos aos quais as linhagens bacterianas apresentam resistência (Fig. 6.7). Neste gráfico estão representados apenas as variáveis que apresentaram significância, a tabela completa se encontra na figura 6.2A- anexo.

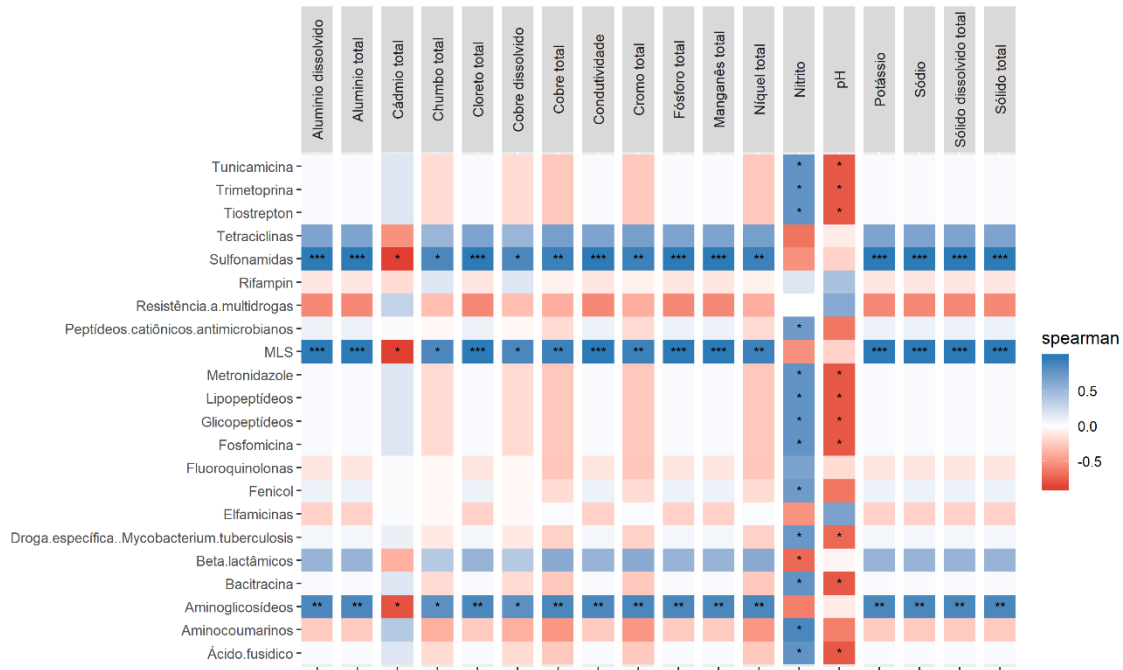


Figura 6.7: Análise de correlação de Spearman utilizando a abundância das classes de antibióticos correlacionados com os parâmetros físico-químicos dos pontos amostrados. Parâmetros: Alumínio dissolvido, Alumínio total, Cádmió total, Chumbo total, Cloreto total, Cobre total, Cobre dissolvido, Fósforo total, Manganês total, Níquel total, Nitrito (Nitrito), pH, Potássio, Sódio, Sólido dissolvido total e Sólido total.

O nitrito afetou de forma significativa ($p < 0,05$) todas as classes de antibióticos (com exceção de tetraciclina, sulfonamidas, rifampin, resistência a multidrogas, MLS, fluoroquinolonas, eifamicinas e aminoglicosídeos), afetando positivamente a presença destes genes, ou seja, com o aumento nas concentrações de nitrito, houve também o aumento da abundância dos genes que conferem resistência a estas classes de antibióticos. Já o nitrogênio amoniacal (indicador de despejo de resíduos em períodos recentes) não influenciou a presença de nenhuma classe de genes (Fig. 6.2A- anexo).

Além do nitrito, o pH foi o outro fator que afetou a abundância de genes associados à resistência a várias classes de antibióticos (tunicamicina, trimetoprina, metronidazole, lipopeptídeos, glicopeptídeos, fosfomicina, droga específica para *Mycobacterium tuberculosis*, bacitracina e ácido fusídico) com $p < 0,05$, porém, diferentemente de nitrito este parâmetro correlacionou negativamente a presença destes genes, ou seja, com o aumento do pH houve a diminuição dos genes para estas classes de antibióticos.

Dentre os metais avaliados, o alumínio, cromo, cádmio, níquel e chumbo correlacionaram positivamente com os genes de resistência a antibióticos para as classes de aminoglicosídeos, sulfonamidas e MLS (macrólidos, lincosamidas e estreptograminas). O aumento na concentração destes metais (além de outras características ambientais) afetam positivamente a presença destes genes ao longo do Rio Tietê, com exceção a concentração de cádmio, que afeta negativamente estas três classes genes de resistência a antibióticos.

A figura 6.8 apresenta a análise anterior (figura 6.7) considerando apenas os 50 genes (grupos) mais abundantes. Os genes *sul1* e *sul2* são relacionados a resistência às sulfonamidas, e apresentaram correlação positiva com a presença dos metais e outros parâmetros físico-químicos, como sódio e potássio. Outros genes que apresentaram correlações positivas foram *oxa*, *msr*, *mphE*, *ges*, *ctx* e *cphA*, que se tratam de genes que conferem resistência a β -lactâmicos. Porém, os genes *srt*, *sme*, *hlyD*, e *cme* também relacionados a β -lactâmicos correlacionaram negativamente. Além deste, o grupo ant3-dprime apresentou correlação positiva a presença de alumínio, cloreto, cobre, cromo, fósforo, manganês, níquel, potássio e sódio (grupo que confere resistência a aminoglicosídeos).

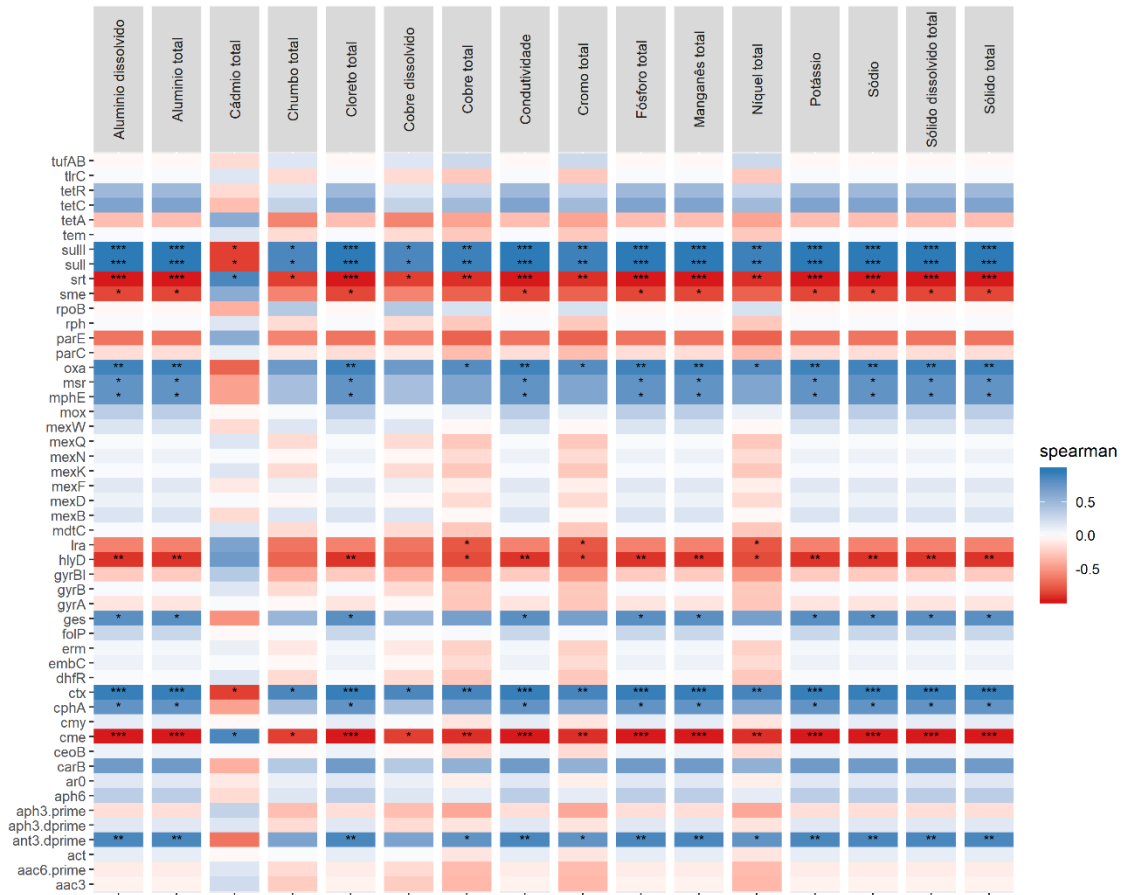


Figura 6.8: Análise de correlação de Spearman utilizando a abundância dos genes que conferem resistência a antibióticos correlacionados com os parâmetros físico-químicos dos pontos amostrados. Parâmetros: Alumínio dissolvido, Alumínio total, Cádmio total, Chumbo total, Cloreto total, Cobre total, Cobre dissolvido, Fósforo total, Manganês total, Níquel total, Nitrito (Nitrito), pH, Potássio, Sódio, sólido dissolvido total e Sódio total.

6.5 Discussão

Compostos nitrogenados frequentemente são relacionados com os níveis de qualidade de água (CHANG et al., 2015). Desta forma, pode-se deduzir que houve despejo de resíduos orgânicos recente a data da coleta, visto que a quantificação de nitrogênio amoniacal é maior do que o estabelecido pelo CONAMA, que permite valores menos que 3,7 mg/L (Tabela 6.1). Já o nitrogênio oxidado (avaliado pela quantificação do nitrato e nitrito) são encontrados em concentrações menores. A presença de nitrogênio oxidado pode indicar que houve despejo de resíduos, porém o ambiente teve um período de resposta, acarretando a um processo de autodepuração, em que a microbiota tem a capacidade de eliminar compostos tóxicos.

O ponto de coleta TIET 02400 se localiza em uma região metropolitana do Estado de São Paulo (Fig. 6.1), conseqüentemente recebendo diariamente grandes quantidades de resíduos domésticos e industriais. A localização deste ponto explica o nível de poluição determinados pelos parâmetros físico-químicos, bem como os níveis elevados de nitrogênio amoniacal. Como o ambiente não apresenta um tempo de recuperação após o despejo dos resíduos, as taxas de nitrogênio oxidados se mantem baixas. Já os pontos TIET 02800, PATO 02900 e TITR 02800 se encontram em regiões com populações que variam entre 25 e 40 mil habitantes, muito menor se comparada a região do ponto TIET 02400 que é de aproximadamente 670 mil habitantes. Como consequência a quantidade de resíduos que poderiam ser despejados no rio é menor.

Baseado na análise de PCA dos parâmetros físico-químicos (Fig. 6.2), e na tabela com as concentrações de metais pesados (Tabela 6.2), cádmio e ferro dissolvido foram os únicos fatores que não contribuíram com a separação do ponto TIET 02400. Concentrações elevadas de metais pesados é uma evidência de atividade antrópica sendo exercida próxima a regiões de água doce. Os pontos TITR 02800 e TIET 02500 apresentam os melhores índices de qualidade de água, sendo que TITR 02800 e PATO 02900 se encontram em regiões que apresentam elevada atividade agrícola, que também é conhecida com causar impactos em rios pelo processo de lixiviação, porém não são detectados pela análise dos parâmetros físico-químicos.

Como observado na análise de PCA com a diversidade de genes que conferem resistência a antibióticos (Fig. 6.3), o ponto com índice de qualidade péssima se distanciou das outras amostras com IQA ótima, boa e regular. Além disto, como seria esperado, o ponto TIET 02400 (IQA péssimo) teve 40% mais genes voltados a resistência a antibióticos se comparado aos outros pontos (Fig. 6.4). Por se tratar de um ambiente com maior impacto antrópico, esperava-se encontrar uma seleção maior para genes que conferem resistência, seja pela seleção direta pela presença dos antibióticos, ou por processos de co-seleção pela presença de metais pesados e outros xenobióticos, selecionando plasmídeos e *integrons* presentes em cepas resistentes e possíveis de serem transferidos lateralmente (LI et al., 2015b; PROIA et al., 2016).

Baseado nos ambientes de água doce explorados quanto a genes de resistência a antibiótico, ambientes de aquacultura (SEILER; BERENDONK, 2012) e os lagos presentes na Suíça (PROIA et al., 2016) apresentaram os genes *sul* com maior abundância. No Rio Tietê, o gene *sulI* foi mais abundante, variando de 10^{-4} a 10^{-3} cópias/16S rRNA (Fig. 6.5), aproximadamente a mesma relação de genes encontrados em lagos impactados pela ação antrópica localizados na China (YANG et al., 2017). A maior parte dos estudos envolvendo genes que conferem resistência a antibióticos em ambientes de água doce são baseados em análises específicas para os genes *sul*, *qnr* e *tet*, desta forma restringindo a análise de outros genes que podem conferir resistência. No Rio Tietê, apesar de o gene *sulI* ser apontado como um dos mais abundantes, os genes *tufAB*, *sme*, *rpoB*, *parC*, *oxa* e *gyrA* foram mais abundantes. Porém, estes genes são constitutivos no genoma bacteriano, e o processo de resistência seria a alteração de alguns aminoácidos impossibilitando a ação do antimicrobiano a molécula proteica formada. Este fato pode ser uma justificativa da abundância destes genes na análise de resistência a antibióticos.

Por outro lado, os genes *sme* são bombas de efluxo com a capacidade de eliminar os antibióticos aminoglicosídeos, cafosporinas e fluoroquinolonas, caracterizados como bomba de efluxo a multidrogas. Estes genes foram encontrados abundantemente em todo o Tietê, porém no TITR02800 foi mais abundante, se comparando aos outros pontos do rio. Bombas de efluxo tem sido relacionados não somente a eliminação de antibióticos em linhagens bacterianas, mas também para eliminação de agroquímicos, inclusive levando a processos de co-seleção (KURENBACH et al., 2015). Como o ponto TITR02800 está localizada em uma região reconhecida por apresentar a agricultura como principal atividade econômica, os genes *sme* podem estar sendo selecionados não apenas pela possível presença de antibióticos na água, mas também pela pressão de seleção de agroquímicos.

Com relação a influência a atividade antrópica na distribuição de genes que conferem resistência a antibióticos, o ponto TIET02400 apresentou IQA péssimo, mais genes relacionados a resistência e maior equitabilidade. O despejo de resíduos domésticos e industriais levam a maior pressão de seleção para genes de resistência, pela presença de antibióticos e co-seleção por metais pesados, agroquímicos e despejo de xenobióticos que possam levar a eventos de resistência por bombas de

efluxo ou eventos de transferência lateral de genes (CHENIA, 2016; MARTINI et al., 2016).

Apesar de não obtermos os dados das concentrações de antibióticos nas amostras coletadas, podemos deduzir que a presença destes químicos esteja em quantidades inferiores aos encontrados em ambientes hospitalares ou solos que apresentem atividades pecuárias. Em um trabalho realizado em tanques de peixes que foram exposto a tetraciclina, sulfonamida, zinco e cobre, foi observado que houve correlação entre os genes *tetO*, *tetQ*, *tetW* e *sul3* que conferem resistência a tetraciclina e sulfonamidas com a presença de cobre e zinco (HE et al., 2017). Diversos outros ambientes apresentam correlação entre a presença de metais pesados e o processo de seleção a genes de resistência a antibióticos. Este fato levanta a importância de se estabelecer programas de controle da ação antrópica em ambientes como rios, lagos e solo, já que pode se tratar de problemas na saúde pública de forma indireta.

Foi realizado uma análise de correlação de Spearman com os parâmetros físico-químicos ao longo do Rio Tietê juntamente com a abundância de genes que conferem resistência a antibióticos (Fig. 6.7), e podemos observar que existe forte correlação entre os genes que conferem resistência aos antibióticos sulfonamidas, MLS e aminoglicosídeos, sendo positivamente selecionados com o aumento na concentração da maior parte dos metais pesados analisados, com exceção do cádmio que apresentou seleção negativa. Como esperado, os genes que conferem resistência a sulfonamidas (*sulI*, *sulII* e *sulIII*) também forma selecionados positivamente pela presença dos metais pesados (Fig. 6.8). Em ambientes naturais como rios e solo, os genes *sul* são mais recalcitrantes que outros genes que conferem resistência a antibióticos, porém aqui é possível demonstrar que a presença de metais pesados e outros parâmetros relacionados ao IQA determinam o aumento da abundância destes genes. Desta forma, espera-se encontrar estes genes em amostrar com maior impacto antrópico, como no ponto TIET02400 analisado neste trabalho.

Interessantemente, os parâmetros nitrito e pH influenciaram de forma significativa positivamente e negativamente (respectivamente) a diversidade de quase todos os antibióticos (Fig. 6.7). Até o momento, não existe uma explicação para que exista a seleção destes genes baseados nestes parâmetros físico-químicos, porém nitrito é um indicativo de ambientes com despejo de resíduos já tratados. Como no

Rio Tietê não há políticas de tratamento de água, a recuperação do Rio se dá pelo metabolismo microbiológico. Desta forma, micro-organismos envolvidos no processo de autodepuração podem conter genes de degradação a xenobióticos em plasmídeos e *integrons*, bem como apresentar genes de resistência a antimicrobianos nos mesmos plasmídeos, levando a co-seleção destes genes e justificando a correlação positiva deste parâmetro com a resistência aos antibióticos analisados.

Desta forma, pode-se concluir que as características ambientais no rio Tietê selecionam genes relacionados a resistência a antibióticos provavelmente por processos de co-seleção. A presença de metais tóxicos, assim como as características ambientais determinadas pelo despejo de resíduos domésticos e industriais no ponto com IQA péssimo, selecionou maior abundância de genes relacionados a resistência a antibióticos. O ponto com IQA ótimo foi caracterizado por bombas de efluxo, que podem determinar a resistência a diversos xenobióticos, como agroquímicos e antibióticos. Sendo assim, ambientes naturais podem selecionar genes de interesse clínico, apontando a necessidade de políticas voltadas a preservação de ambientes naturais visando melhorias na saúde pública.

7 CONCLUSÕES

- A diversidade funcional analisada em ambientes de água doce são selecionadas principalmente pelas características ambientes, independentemente da posição geográfica.
- As pequenas alterações na concentração de salinidade em ambientes de água doce selecionam genes voltados ao metabolismo de sódio e potássio, principalmente.
- A maior parte dos genes considerados acessórios em amostras metagenômicas em ambientes de água doce ainda não são caracterizados, indicando a importância de se explorar o perfil funcional e genes específicos em cada ambiente.
- A diversidade plasmidial em amostras do rio Tietê são selecionadas pelas características ambientais.
- O ponto TIET 02400 (com IQA ruim), apresentou maior abundância de genes relacionados ao transportadores transmembrana, bombas de efluxo, e genes que conferem resistência a compostos xenobióticos e metais pesados se comparado ao ponto TITR 02800 (IQA ótimo), demonstrando adaptações às condições ambientais, provavelmente decorrentes da ação antrópica.
- O plasmidoma do ponto TITR 02800 foi observado maior abundância de genes envolvidos no transporte e assimilação de substâncias observadas em baixas concentrações, como o fósforo.
- Foi observado que os plasmídeos podem afetar o *fitness* ecológico comunidade bacteriana, visto que por meio da transferência lateral de genes envolvidos em processos adaptativos no ambiente e posterior seleção, podem favorecer a adaptação de determinados grupos microbianos.
- Com relação aos genes que conferem resistência a antibióticos, os pontos com IQA ótimo, bom e regular agruparam sendo que apenas o ponto com IQA péssimo ficou separado.

- O ponto com IQA péssimo (TIET 02400) foi o que apresentou maior abundância de genes associados a resistência a antibióticos e maior equitabilidade se comparado aos outros três pontos com qualidade de água melhor.

- O ponto com IQA ótimo (TITR 02800) teve em sua maioria, genes de resistência a antibióticos caracterizados como bombas de efluxo, sugerindo que possa estar ocorrendo co-seleção destas bombas de efluxo pela presença de outros compostos na água.

-Baseado no gradiente na concentração de metais pesados no rio Tietê, foi observada correlação positiva entre a abundância de genes que conferem resistência a sulfonamidas, MLS e aminoglicosídeos e a presença de alumínio, chumbo e cobre.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados e conclusões mostrados no presente trabalho, é possível considerar que as condições ambientais afetam de forma significativa o perfil funcional de micro-organismos. Além disto, a seleção de plasmídeos em um habitat também é determinada pelas condições do ambiente. Também é possível pontuar as vias metabólicas pertinentes frente às características do ambiente, como a presença de metais pesados e despejo de resíduos industriais e domésticos. Pela análise de genes que conferem resistência a antibióticos, verificou-se que eventos de co-seleção determinados por concentrações mais elevadas de metais pesados.

Visto o que foi apresentado neste trabalho, se faz importante analisar vias alternativas na transferência lateral de genes, como o perfil metabólico de genes presentes próximos a transposases. Além disto, seria importante analisar a diversidade de bacteriófagos, a fim de verificar se existe a influência de vírus na diversidade bacteriana, além das características ambientais. E ainda verificar o impacto que profagos exercitam em genomas bacterianos, utilizando para isto genomas completos de *Burkholderia* spp. Desta forma, seria possível verificar a influência de vários fatores que influenciariam na diversidade e perfil funcional em ambientes de água doce.

REFERÊNCIAS¹

ABELL, R. et al. Freshwater Ecoregions of the World: A New Map of Biogeographic Units for Freshwater Biodiversity Conservation. **BioScience**, v. 58, n. 5, p. 403, 2008. Disponível em: <<https://academic.oup.com/bioscience/article-lookup/doi/10.1641/B580507>>.

AFIUNE, G.; MOTA, J. **Projeto Tietê**. Disponível em: <<http://apublica.org/projeto-tiete/>>. Acesso em: 05 de maio de 2018.

AGNOLI, K. et al. Exposing the third chromosome of Burkholderia cepacia complex strains as a virulence plasmid. **Molecular Microbiology**, v. 83, n. 2, p. 362–378, 2012.

AGUIRRE, M. et al. Unraveling the environmental and anthropogenic drivers of bacterial community changes in the Estuary of Bilbao and its tributaries. p. 1–22, 2017.

ALICE, A. F.; LÓPEZ, C. S.; CROSA, J. H. Plasmid- and chromosome-encoded redundant and specific functions are involved in biosynthesis of the siderophore anguibactin in Vibrio anguillarum 775: A case of chance and necessity? **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 6, p. 2209–2214, 2005.

ANTIQUERA, P. A. P. et al. Environmental change and predator diversity drive alpha and beta diversity in freshwater macro and microorganisms. n. March, p. 1–14, 2018.

ARBER, W. Genetic variation: Molecular mechanisms and impact on microbial evolution. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, n. 1, p. 1–7, 2000.

ARSHAD, M. et al. Threading the Needle: Small-Molecule Targeting of a Xenobiotic Receptor to Ablate Escherichia coli Polysaccharide Capsule Expression Without Altering Antibiotic Resistance. **Journal of Infectious Diseases**, v. 213, n. 8, p. 1330–1339, 2016.

ÁVILA, M. P. et al. Seasonality of freshwater bacterioplankton diversity in two tropical shallow lakes from the Brazilian Atlantic Forest. **FEMS microbiology ecology**, v. 93, n. 1, 2017.

¹ De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2012. 24 p.

BARRENHA, P. I. I. et al. Multivariate analyses of the effect of an urban wastewater treatment plant on spatial and temporal variation of water quality and nutrient distribution of a tropical mid-order river. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 190, n. 1, 2018.

BHAYA, D. et al. Population level functional diversity in a microbial community revealed by comparative genomic and metagenomic analyses. **The ISME Journal**, v. 1, n. 8, p. 703–713, 2007. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/ismej.2007.46>>.

BOITEAU, R. M. et al. Patterns of iron and siderophore distributions across the California Current System. **Limnology and Oceanography**, p. 1–14, 2018. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/lno.11046>>.

BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114–2120, 2014.

BOSCARI, A. et al. BetS Is a Major Glycine Betaine / Proline Betaine Transporter Required for Early Osmotic Adjustment in *Sinorhizobium meliloti*. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 10, p. 2654–2663, 2002.

BOUGHATTAS, I. et al. Impact of heavy metal contamination on oxidative stress of *Eisenia andrei* and bacterial community structure in Tunisian mine soil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 22, p. 18083–18095, 2017. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11356-017-9449-8>>.

BROWN, B. L. et al. Metagenomic analysis of planktonic microbial consortia from a non-tidal urban-impacted segment of James River. **Standards in Genomic Sciences**, p. 1–14, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s40793-015-0062-5>>.

BROWN, C. J. et al. Diverse broad-host-range plasmids from freshwater carry few accessory genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 24, p. 7684–7695, 2013a.

BROWN, C. J. et al. Diverse broad-host-range plasmids from freshwater carry few accessory genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, p. 7684–7695, 2013b.

BROWN KAV, A.; BENHAR, I.; MIZRAHI, I. A method for purifying high quality and high yield plasmid DNA for metagenomic and deep sequencing approaches. **Journal of Microbiological Methods**, v. 95, n. 2, p. 272–279, 2013a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2013.09.008>>.

BROWN KAV, A.; BENHAR, I.; MIZRAHI, I. A method for purifying high quality and high yield plasmid DNA for metagenomic and deep sequencing approaches. **Journal of Microbiological Methods**, v. 95, n. 2, p. 272–279, 2013b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2013.09.008>>.

CANI, P. D.; EVERARD, A. Talking microbes: When gut bacteria interact with diet and host organs. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 60, n. 1, p. 58–66, 2016.

CASCALES, E.; CHRISTIE, P. J. The versatile bacterial type IV secretion systems. **Nature Reviews Microbiology**, v. 1, n. 2, p. 137–149, 2003.

CAVALCANTE, A. et al. Anthropogenic impact on mangrove sediments triggers differential responses in the heavy metals and antibiotic resistomes of microbial. 2016.

CETESB. **Qualidade das águas superficiais no estado de São Paulo 2014**. 2. ed. São Paulo: CETESB, 2015. 520 p.

CETESB. **Qualidade das águas superficiais no estado de São Paulo 2015**. 2. ed. São Paulo: CETESB, 2016. 562 p.

CETESB. **Qualidade das águas interiores no estado de São Paulo 2016**. São Paulo: CETESB, 2017. 287 p.

CHACON, K. N. et al. Tracking metal ions through a Cu/Ag efflux pump assigns the functional roles of the periplasmic proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 43, p. 15373–15378, 2014. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1411475111>>.

CHANG, F.-J. et al. Modeling water quality in an urban river using hydrological factors – Data driven approaches. **Journal of Environmental Management**, v. 151, p. 87–96, 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030147971400591X>>.

CHAUHAN, A.; SAMANTA, S. K.; JAIN, R. K. Degradation of 4-nitrocatechol by *Burkholderia cepacia*: A plasmid- encoded novel pathway. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 5, p. 764–772, 2000.

CHENIA, H. Y. Prevalence and characterization of plasmid-mediated quinolone resistance genes in *Aeromonas* spp. isolated from South African freshwater fish. **International Journal of Food Microbiology**, v. 231, p. 26–32, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.04.030>>.

CHIARAMONTE, J. B.; ROBERTO, C.; PAGIORO, T. A. Large scale distribution of bacterial communities in the upper Paraná River floodplain. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 1197, p. 1187–1197, 2014.

COLE, J. J. et al. Plumbing the global carbon cycle: Integrating inland waters into the terrestrial carbon budget. **Ecosystems**, v. 10, n. 1, p. 171–184, 2007a.

COLE, J. R. et al. The ribosomal database project (RDP-II): Introducing myRDP space and quality controlled public data. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. SUPPL. 1, p. 169–172, 2007b.

COSTA, T. R. D. et al. Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 6, p. 343–359, 2015. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrmicro3456>>.

DAEE. **Histórico do Rio Tietê**. Disponível em: <http://www.daee.sp.gov.br/index.php?option=com_content&id=793:historico-do-rio-tiete&Itemid=53>. Acesso em: 12 junho de 2018.

DAMKJAER, S.; TAYLOR, R. The measurement of water scarcity: Defining a meaningful indicator. **Ambio**, v. 46, n. 5, p. 513–531, 2017.

DANG, B. et al. Conjugative multi-resistant plasmids in Haihe River and their impacts on the abundance and spatial distribution of antibiotic resistance genes. **Water Research**, v. 111, p. 81–91, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2016.12.046>>.

DAVOLOS, D.; PIETRANGELI, B. A molecular study on bacterial resistance to arsenic-toxicity in surface and underground waters of Latium (Italy). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 96, p. 1–9, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.05.039>>.

DELMAR, J. A.; SU, C.-C.; YU, E. W. Bacterial Multidrug Efflux Transporters. **Annual**

Review of Biophysics, v. 43, n. 1, p. 93–117, 2014. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-biophys-051013-022855>>.

DEMIRBAS, A. Heavy metal adsorption onto agro-based waste materials: A review. **Journal of Hazardous Materials**, v. 157, n. 2–3, p. 220–229, 2008.

DEVKOTA, B.; IMBERGER, J. Upper and Middle Tiete River Basin dam-hydraulic system, travel time and temperature modeling. **Journal of Hydrology**, v. 475, p. 12–25, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhydrol.2012.07.025>>.

DI, A. et al. Rainfall increases the abundance of antibiotic resistance genes within a riverine microbial community *. **Environmental Pollution**, p. 1–6, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2017.04.036>>.

DI CESARE, A. et al. Co-occurrence of integrase 1, antibiotic and heavy metal resistance genes in municipal wastewater treatment plants. **Water Research**, v. 94, p. 208–214, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2016.02.049>>.

DREVINEK, P.; MAHENTHIRALINGAM, E. Burkholderia cenocepacia in cystic fibrosis: Epidemiology and molecular mechanisms of virulence. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16, n. 7, p. 821–830, 2010.

DUDGEON, D. et al. Freshwater biodiversity: Importance, threats, status and conservation challenges. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 81, n. 2, p. 163–182, 2006.

DUPONT, C. L. et al. Functional tradeoffs underpin salinity-driven divergence in microbial community composition. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, 2014.

EILER, A. et al. Productivity and salinity structuring of the microplankton revealed by comparative freshwater metagenomics. v. 16, p. 2682–2698, 2014.

ESCOBAR-ZEPEDA, A.; DE LEÓN, A. V. P.; SANCHEZ-FLORES, A. The road to metagenomics: From microbiology to DNA sequencing technologies and bioinformatics. **Frontiers in Genetics**, v. 6, n. DEC, p. 1–15, 2015.

EVANS, S. E.; WALLENSTEIN, M. D. Climate change alters ecological strategies of soil bacteria. **Ecology Letters**, v. 17, n. 2, p. 155–164, 2014.

FALKINHAM, J. O. et al. Epidemiology and Ecology of Opportunistic Premise Plumbing Pathogens: *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium avium*, and *Pseudomonas aeruginosa*. **Environmental Health Perspectives**, v. 120, n. 8, p. 1042–1048, 2015.

FESSLE, A. T. et al. Complete sequence of a plasmid from a bovine methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring a novel *ica*-like gene cluster in addition to antimicrobial and heavy metal resistance genes. **Veterinary Microbiology**, v. 200, p. 95–100, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.07.010>>.

FIGUEROA, J. M. . et al. Freshwater biodiversity in the rivers of the Mediterranean Basin. **Hydrobiologia**, p. 137–186, 2013.

FORTUNATO, C. S.; CRUMP, B. C. Microbial gene abundance and expression patterns across a river to ocean salinity gradient. **PLoS ONE**, v. 10, n. 11, p. 1–22, 2015.

FORYS, E. a.; ALLEN, C. R.; WOJCIK, D. P. Influence of the proximity and amount of human development and roads on the occurrence of the red imported fire ant in the lower Florida Keys. **Biological Conservation**, v. 108, n. 1, p. 27–33, 2002.

FROST, L. S. et al. Mobile genetic elements: The agents of open source evolution. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 9, p. 722–732, 2005.

FUJIMOTO, M. et al. Spatiotemporal distribution of bacterioplankton functional groups along a freshwater estuary to pelagic gradient in Lake Michigan. **Journal of Great Lakes Research**, v. 42, n. 5, p. 1036–1048, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jglr.2016.07.029>>.

GARCIA-NAVARRO, F. J. G. et al. Primary Producers and Anthropogenic Signs Related to the Flood Plain Soils of the Tablas de Daimiel Wetland. **Geosciences**, 2018.

GARMENDIA, L. et al. Metagenomics and antibiotics. **Clinical Microbiology and Infection**, 2012.

GILLINGS, M. R. et al. Mobilization of a Tn402-like class 1 integron with a novel cassette array via flanking miniature inverted-repeat transposable element-like structures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 18, p. 6002–6004,

2009.

GILLINGS, M. R. Evolutionary consequences of antibiotic use for the resistome, mobilome, and microbial pangenome. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. January, p. 1–10, 2013.

GLASS, E. M.; MEYER, F. The Metagenomics RAST Server: A Public Resource for the Automatic Phylogenetic and Functional Analysis of Metagenomes. **Handbook of Molecular Microbial Ecology I: Metagenomics and Complementary Approaches**, v. 8, p. 325–331, 2011.

GLEICK, P. H.; PALANIAPPAN, M. Peak water limits to freshwater withdrawal and use. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 25, p. 11155–11162, 2010. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1004812107>>.

GREEN, E. R.; MECSAS, J. Bacterial Secretion Systems – An overview. **American society for Microbiology**, v. 4, n. 1, p. 1–32, 2015.

GREENGENES. **16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. 2012.** Disponível em: http://greengenes.lbl.gov/Download/Sequence_Data/Fasta_data_files/. Acesso em 08 set. 2018.

GUAZZARONI, M. et al. Novel acid resistance genes from the metagenome of the Tinto River , an extremely acidic environment. v. 15, p. 1088–1102, 2013.

GUYOMARD-RABENIRINA, S. et al. Resistance to antimicrobial drugs in different surface waters and wastewaters of Guadeloupe. **PLoS ONE**, v. 12, n. 3, p. 1–17, 2017.

HAGGERTY, J. M.; DINSDALE, E. A. Distinct biogeographical patterns of marine bacterial taxonomy and functional genes. **Global Ecology and Biogeography**, p. 177–190, 2017.

HARRISON, E.; BROCKHURST, M. A. Plasmid-mediated horizontal gene transfer is a coevolutionary process. **Trends in Microbiology**, v. 20, n. 6, p. 262–267, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2012.04.003>>.

HAWLEY, E. R.; HESS, M. Metagenome sequencing of the prokaryotic microbiota of

the hypersaline and meromictic soap lake, washington. **Genome announcements**, v. 2, n. 1, p. e01212-13, 2014. Disponível em: <<http://genomea.asm.org/content/2/1/e01212-13.full%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3900905&tool=pmcentrez&rendertype=abstract%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3900905%7B&%7Dtool=pmcentrez%7B&%7Drende>>.

HAYATSU, M.; HIRANO, M.; TOKUDA, S. Involvement of two plasmids in fenitrothion degradation by Burkholderia sp. strain NF100. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 4, p. 1737–1740, 2000.

HE, X. et al. Evolution of corresponding resistance genes in the water of fish tanks with multiple stresses of antibiotics and heavy metals. **Water Research**, v. 124, p. 39–48, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2017.07.048>>.

HOEKSTRA, A. Y.; MEKONNEN, M. M. The water footprint of humanity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 9, p. 3232–3237, 2012. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1109936109>>.

HOLLAND, R. A. et al. Global impacts of energy demand on the freshwater resources of nations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 48, p. E6707–E6716, 2015. Disponível em: <<http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1507701112>>.

HUGERTH, L. W. et al. Metagenome-assembled genomes uncover a global brackish microbiome. **Genome Biology**, p. 1–18, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s13059-015-0834-7>>.

HYATT, D. et al. Prodigal: Prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. **BMC Bioinformatics**, v. 11, 2010.

ILIEV, I. et al. Metagenomic profiling of the microbial freshwater communities in two Bulgarian reservoirs. **Journal of Basic Microbiology**, v. 57, n. 8, p. 669–679, 2017.

JECHALKE, S. et al. Effects of 100 years wastewater irrigation on resistance genes, class 1 integrons and IncP-1 plasmids in Mexican soil. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. MAR, p. 1–10, 2015.

JØRGENSEN, T. S. et al. Hundreds of circular novel plasmids and DNA elements identified in a rat cecum metamobilome. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. 1–9, 2014.

KAV, a. B. et al. Insights into the bovine rumen plasmidome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, p. 5452–5457, 2012.

KLEIN GOLDEWIJK, K.; BEUSEN, A.; JANSSEN, P. Long-term dynamic modeling of global population and built-up area in a spatially explicit way: HYDE 3.1. **Holocene**, v. 20, n. 4, p. 565–573, 2010.

KLOESGES, T. et al. Networks of gene sharing among 329 proteobacterial genomes reveal differences in lateral gene transfer frequency at different phylogenetic depths. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 2, p. 1057–1074, 2011.

KODZIUS, R.; GOJOBORI, T. Marine metagenomics as a source for bioprospecting. **Marine Genomics**, v. 24, p. 21–30, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.margen.2015.07.001>>.

KOTHARI, A. et al. Plasmid DNA analysis of pristine groundwater microbial communities reveal extensive presence of metal resistance genes. **bioRxiv**, p. 8–19, 2017.

KULLISAAR, T. et al. Complete glutathione system in probiotic *Lactobacillus fermentum* ME-3. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 46, n. 5, p. 481–486, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1134/S0003683810050030>>.

KÜMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part II. **Chemosphere**, v. 75, n. 4, p. 435–441, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.11.086>>.

KUMMU, M. et al. How close do we live to water? a global analysis of population distance to freshwater bodies. **PLoS ONE**, v. 6, n. 6, 2011.

KURENBACH, B. et al. Sublethal Exposure to Commercial Formulations of the Herbicides Changes in Antibiotic Susceptibility in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Mbio.Asm.Org**, v. 6, n. 2, p. 1–9, 2015.

KURENBACH, B. et al. Herbicide ingredients change *Salmonella enterica* sv. Typhimurium and *Escherichia coli* antibiotic responses. **Microbiology**, 2017. Disponível em: <<http://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.000573.v>>

1>.

LAKIN, S. M. et al. MEGARes: An antimicrobial resistance database for high throughput sequencing. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. D1, p. D574–D580, 2017.

LEE, C.-T. et al. The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 34, p. 10798–10803, 2015. Disponível em: <<http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1503129112>>.

LEGENDRE, P. Interpreting the replacement and richness difference components of beta diversity. **Global Ecology and Biogeography**, v. 23, n. 11, p. 1324–1334, 2014.

LI, D. et al. MEGAHIT: An ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. **Bioinformatics**, v. 31, n. 10, p. 1674–1676, 2015a.

LI, J. et al. Antibiotic-resistant genes and antibiotic-resistant bacteria in the effluent of urban residential areas, hospitals, and a municipal wastewater treatment plant system. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 6, p. 4587–4596, 2015b.

LI, Z. et al. Metagenomic Analysis of Genes Encoding Nutrient Cycling Pathways in the Microbiota of Deep-Sea and Shallow-Water Sponges. **Marine Biotechnology**, v. 18, n. 6, p. 659–671, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10126-016-9725-5>>.

LIU, Y. Y. et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 2, p. 161–168, 2016. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7)>.

LUO, W. et al. Diverse gene functions in a soil mobilome. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 101, p. 175–183, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.07.018>>.

MADSEN, E. L. Microorganisms and their roles in fundamental biogeochemical cycles. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, n. 3, p. 456–464, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2011.01.008>>.

MALOUFI, S. et al. Environmental heterogeneity among lakes promotes hyper b - diversity across phytoplankton communities. p. 633–645, 2016.

MARTINI, M. C. et al. Genomics of high molecular weight plasmids isolated from an on-farm biopurification system. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–13, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep28284>>.

MARTINO, G. P. et al. Aroma compounds generation in citrate metabolism of *Enterococcus faecium*: Genetic characterization of type I citrate gene cluster. **International Journal of Food Microbiology**, v. 218, p. 27–37, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.11.004>>.

MAZUR, A.; KOPER, P. Rhizobial plasmids — replication, structure and biological role. **Central European Journal of Biology**, v. 7, n. 4, p. 571–586, 2012.

MCLELLAN, S. L.; FISHER, J. C.; NEWTON, R. J. The microbiome of urban waters. **International Microbiology**, p. 141–149, 2015.

MEDEIROS, J. D. et al. Comparative metagenome of a stream impacted by the urbanization phenomenon. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 835–845, 2016.

MEZITI, A.; TSEMENTZI, D. Anthropogenic effects on bacterial diversity and function along a river-to-estuary gradient in Northwest Greece revealed by metagenomics. v. 0, 2016.

MOLCHANOVA, E. V.; AGEEVA, N. P. Use of the Phytopathogenic Effect for Studies of *Burkholderia* Virulence. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 158, n. 4, p. 517–519, 2015.

MORENO-FORERO, S. K. et al. Comparison of differential gene expression to water stress among bacteria with relevant pollutant-degradation properties. **Environmental Microbiology Reports**, v. 8, n. 1, p. 91–102, 2016.

MORITA, Y. et al. NorM of *Vibrio parahaemolyticus* Is an Na⁺-Driven Multidrug Efflux Pump. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 23, p. 6694–6697, 2000.

MORTATTI, J.; DE MORAES, G. M.; PROBST, J. L. Heavy metal distribution in recent sediments along the Tietê River basin (São Paulo, Brazil). **Geochemical Journal**, v.

46, n. 1, p. 13–19, 2012.

NATH DAS, S.; MANDAL, M.; MANDAL, S. Plasmid Mediated Antibiotic and Heavy Metal Co-Resistance in Bacterial Isolates from Mahananda River Water (Malda, India). **Translational Medicine**, v. 6, n. 4, p. 6–11, 2016. Disponível em: <<https://www.omicsonline.org/open-access/plasmid-mediated-antibiotic-and-heavy-metal-coresistance-in-bacterial-isolates-from-mahananda-river-water-malda-india-2161-1025-1000185.php?aid=83465>>.

NEWTON, R. J. et al. **A Guide to the Natural History of Freshwater Lake Bacteria**. [s.l: s.n.]v. 75

NEWTON, R. J.; MCLELLAN, S. L. A unique assemblage of cosmopolitan freshwater bacteria and higher community diversity differentiate an urbanized estuary from oligotrophic Lake Michigan. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. SEP, p. 1–13, 2015.

NORDMANN, P.; POIREL, L. Plasmid-mediated colistin resistance: An additional antibiotic resistance menace. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 5, p. 398–400, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2016.03.009>>.

OH, J. et al. Biogeography and individuality shape function in the human skin metagenome. **Nature**, v. 514, n. 7520, p. 59–64, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nature13786>>.

OH, S. et al. Metagenomic Insights into the Evolution, Function, and Complexity of the Planktonic Microbial Community of Lake Lanier, a Temperate Freshwater Ecosystem □ †. **APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY**, v. 77, n. 17, p. 6000–6011, 2011.

OJAVEER, H. et al. Status of Biodiversity in the Baltic Sea. v. 5, n. 9, 2010.

OLCHANHESKI, L. R. et al. Mechanisms of tolerance and high degradation capacity of the herbicide mesotrione by *Escherichia coli* strain DH5- α . **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. 1–8, 2014.

ORTIZ-VERA, M. P. et al. Influence of water quality on diversity and composition of fungal communities in a tropical river. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 14799, 2018. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41598-018-33162-y>>.

PAGANINI, W. DA S. **A identidade de um rio de contrastes. O Tietê e seus múltiplos usos.** 2da Edição ed. São Paulo: AESABESP, 2008.

PENG, Y. et al. IDBA-UD: A de novo assembler for single-cell and metagenomic sequencing data with highly uneven depth. **Bioinformatics**, v. 28, n. 11, p. 1420–1428, 2012.

PERGENT-MARTINI, C.; LEJEUSNE, C.; CHEVALDONNE, P. Climate change effects on a miniature ocean: the highly diverse, highly impacted Mediterranean Sea. n. December, 2009.

PICCINI, C.; GARCÍA-ALONSO, J. Bacterial diversity patterns of the intertidal biofilm in urban beaches of Río de la Plata. **Marine Pollution Bulletin**, v. 91, n. 2, p. 476–482, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.08.039>>.

PIEKARSKA, K. et al. Co-existence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants and mutations in *gyrA* and *parC* among fluoroquinolone-resistant clinical Enterobacteriaceae isolated in a tertiary hospital in Warsaw, Poland. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 45, n. 3, p. 238–243, 2015.

PLEWNIAK, F. et al. Metagenomic insights into microbial metabolism affecting arsenic dispersion in Mediterranean marine sediments. **Molecular Ecology**, v. 22, n. 19, p. 4870–4883, 2013.

PRIONE, L. P. et al. GST activity and membrane lipid saturation prevents mesotrione-induced cellular damage in *Pantoea ananatis*. **AMB Express**, v. 6, n. 1, 2016.

PROIA, L. et al. Occurrence and persistence of antibiotic resistance genes in river biofilms after wastewater inputs in small rivers. **Environmental Pollution**, v. 210, p. 121–128, 2016.

RADA, L.R.P.M. **Microbioma da bacia do Rio Tietê: Diversidade funcional e taxonômica.** 2018. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

RANDALL, C. P. et al. Silver resistance in Gram-negative bacteria: A dissection of endogenous and exogenous mechanisms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 4, p. 1037–1046, 2014.

REN, L. et al. Warming and nutrient enrichment in combination increase stochasticity and beta diversity of bacterioplankton assemblages across freshwater mesocosms. **ISME Journal**, v. 11, n. 3, p. 613–625, 2017.

RIBEIRO, M. **Despoluição do Tietê avança, mas num ritmo aquém do esperado**. Disponível em: <<https://noticias.uol.com.br/opiniaocoluna/2016/10/07/despoluicao-do-tiete-avanca-mas-num-ritmo-aquem-do-esperado.htm>>. Acesso em: 04 de Abril de 2017.

RICKMAN, J. K.; CONNOR, E. F. The effect of urbanization on the quality of remnant habitats for leaf-mining Lepidoptera on *Quercus agrifolia*. **Ecography**, v. 26, n. 6, p. 777–787, 2003.

RIMSHA, R. et al. Bioactive substances of cyanobacteria (*Nostoc muscorum*): a review. **International Journal of Pharma Sciences and Research**, v. 5, n. 7, p. 320–322, 2014.

RODRIGUEZ-MOZA, S.; WEINBERG, H. S. Meeting report: Pharmaceuticals in water-an interdisciplinary approach to a public health challenge. **Environmental Health Perspectives**, v. 118, n. 7, p. 1016–1020, 2010.

RODRIGUEZ-MOZAZ, S. et al. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river. **Water Research**, v. 69, p. 234–242, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2014.11.021>>.

ROSSUM, T. Van et al. Year-Long Metagenomic Study of River Microbiomes Across Land Use and Water Quality. v. 6, n. December, p. 1–15, 2015.

SAMANTA, A. et al. An investigation on heavy metal tolerance and antibiotic resistance properties of bacterial strain *Bacillus* sp . isolated from municipal waste. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research Scholars**, v. 2, n. 1, p. 178–189, 2012. Disponível em: <<http://scholarsresearchlibrary.com/archive.html>>.

SAN MILLAN, A. Evolution of Plasmid-Mediated Antibiotic Resistance in the Clinical Context. **Trends in Microbiology**, v. xx, p. 1–8, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.06.007>>.

SANTOLARIA, Z. et al. Natural and anthropic effects on hydrochemistry and major and trace elements in the water mass of a Spanish Pyrenean glacial lake set.

Environmental Monitoring and Assessment, v. 189, n. 7, 2017.

SATINSKY, B. M. et al. The Amazon continuum dataset: quantitative metagenomic and metatranscriptomic inventories of the Amazon River plume, June 2010. p. 1–7, 2014.

SATINSKY, B. M. et al. Metagenomic and metatranscriptomic inventories of the lower Amazon River, May 2011. **Microbiome**, p. 1–8, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s40168-015-0099-0>>.

SCHLACHER, K.; GOODMAN, M. F. Lessons from 50 years of SOS DNA-damage-induced mutagenesis. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 8, n. 7, p. 587–594, 2007.

SCHMIED, H. M. et al. Sensitivity of simulated global-scale freshwater fluxes and storages to input data, hydrological model structure, human water use and calibration. **Hydrology and Earth System Sciences**, v. 18, n. 9, p. 3511–3538, 2014.

SCHWAN, W. R.; WETZEL, K. J. Osmolyte transport in *Staphylococcus aureus* and the role in pathogenesis. **World Journal of Clinical Infectious Diseases**, v. 6, n. 2, p. 22–27, 2016.

SEILER, C.; BERENDONK, T. U. Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. DEC, p. 1–10, 2012.

SENTCHILLO, V. et al. Community-wide plasmid gene mobilization and selection. **The ISME journal**, v. 7, n. 6, p. 1173–86, 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3660673&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

SEPPERUMAL, U.; PALANIMANICKAM, A.; SIVALINGAM, G. Plasmid mediated endosulfan degradation by *Bacillus ciradans* and *Acinetobacter* species. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research Scholars**, v. 3, n. 6, p. 15–20, 2013.

SHARRAR, A. M. et al. Novel Large Sulfur Bacteria in the Metagenomes of Groundwater-Fed Chemosynthetic Microbial Mats in the Lake Huron Basin. v. 8, n. May, p. 1–15, 2017.

SIMON, H.; KELEMEN, S.; BEGY, R. C. Anthropogenic influences on the sedimentation

rates of lakes situated in different geographic areas. **Journal of Environmental Radioactivity**, v. 173, p. 11–17, 2017.

SKOV, R. L.; MONNET, D. L. Plasmid-mediated colistin resistance (*mcr-1* gene): three months later, the story unfolds. **Euro surveillance**, v. 21, n. 9, p. 1–6, 2016.

SOCOLAR, J. B. et al. How should beta-diversity inform biodiversity conservation? **Trends in Ecology & Evolution**, v. xx, n. 1, p. 1–14, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26701706>%0A<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016953471500289X>>.

STRAYER, D. L.; DUDGEON, D. Freshwater biodiversity conservation: recent progress and future challenges. **Journal of the North American Benthological Society**, v. 29, n. 1, p. 344–358, 2010. Disponível em: <<http://www.journals.uchicago.edu/doi/10.1899/08-171.1>>.

TAYLOR, R. Rethinking water scarcity: The role of storage. **Eos**, v. 90, n. 28, p. 237–238, 2009.

THOMAS, C. M.; NIELSEN, K. M. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 9, p. 711–721, 2005.

TOPP, E. et al. Accelerated Biodegradation of Veterinary Antibiotics in Agricultural Soil following Long-Term Exposure, and Isolation of a Sulfamethazine-degrading sp. **Journal of Environment Quality**, v. 42, n. 1, p. 173, 2013. Disponível em: <<https://www.agronomy.org/publications/jeq/abstracts/42/1/173>>.

TOYAMA, D. et al. Metagenomics Analysis of Microorganisms in Freshwater Lakes of the Amazon Basin. **Genome announcements**, v. 4, n. 311745, p. 4–5, 2016.

TRINGE, S. G. et al. Comparative metagenomics of microbial communities. **Science**, v. 308, n. 5721, p. 554–557, 2005.

TSEMENTZI, D. et al. Evaluation of metatranscriptomic protocols and application to the study of freshwater microbial communities. **Environmental Microbiology Reports**, v. 6, n. 6, p. 640–655, 2014.

TSENG, C.-H. et al. Microbial and viral metagenomes of a subtropical freshwater

reservoir subject to climatic disturbances. **The ISME journal**, v. 7, n. 12, p. 2374–86, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23842651>>.

VILA-AIUB, M. M.; GUNDEL, P. E.; PRESTON, C. Experimental Methods for Estimation of Plant Fitness Costs Associated with Herbicide-Resistance Genes. **Weed Science**, v. 63, n. SP1, p. 203–216, 2015. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0043174500015150/type/journal_article>.

VOLLMER, D.; REGAN, H. M.; ANDELMAN, S. J. Assessing the sustainability of freshwater systems: A critical review of composite indicators. **Ambio**, v. 45, n. 7, p. 765–780, 2016.

VUONO, D. C. et al. Disturbance and temporal partitioning of the activated sludge metacommunity. **ISME Journal**, v. 9, n. 2, p. 425–435, 2015.

W Aidner, L. A.; Kirchman, D. L. Aerobic anoxygenic phototrophic bacteria attached to particles in turbid waters of the Delaware and Chesapeake estuaries. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 12, p. 3936–3944, 2007.

Wan, Y. et al. Temporal and spatial variations of aquatic environmental characteristics and sediment bacterial community in five regions of Lake Taihu. **Aquatic Ecology**, v. 51, n. 3, p. 343–358, 2017.

Welch, T. J.; Chai, S.; Crosa, J. H. The overlapping *angB* and *angG* genes are encoded within the trans-acting factor region of the virulence plasmid in *Vibrio anguillarum*: Essential role in siderophore biosynthesis. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 23, p. 6762–6773, 2000.

Wink, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. **Phytochemistry**, v. 64, n. 1, p. 3–19, 2003.

Wu, S. et al. WebMGA: A customizable web server for fast metagenomic sequence analysis. **BMC Genomics**, v. 12, n. Cd, 2011.

Xu, L. et al. High-throughput profiling of antibiotic resistance genes in drinking water treatment plants and distribution systems. **Environmental Pollution**, v. 213, p. 119–126, 2016a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2016.02.013>>.

XU, Y. et al. Occurrence and distribution of antibiotics, antibiotic resistance genes in the urban rivers in Beijing, China. **Environmental Pollution**, v. 213, p. 833–840, 2016b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2016.03.054>>.

YANG, Y. et al. Antibiotic resistance genes in surface water of eutrophic urban lakes are related to heavy metals, antibiotics, lake morphology and anthropic impact. **Ecotoxicology**, v. 26, n. 6, p. 831–840, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10646-017-1814-3>>.

YU, S. et al. Research advances of exotoxin gene and related vaccines of *Clostridium perfringens*. **Animal Husbandry and Feed Science**, v. 9, p. 108–111, 2017.

ZEGLIN, L. H. Stream microbial diversity in response to environmental changes: Review and synthesis of existing research. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. MAY, p. 1–15, 2015.

ZHAN-MING, C.; CHEN, G. Q. Virtual water accounting for the globalized world economy: National water footprint and international virtual water trade. **Ecological Indicators**, v. 28, p. 142–149, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolind.2012.07.024>>.

ZHANG, T.; ZHANG, X.-X.; YE, L. Plasmid Metagenome Reveals High Levels of Antibiotic Resistance Genes and Mobile Genetic Elements in Activated Sludge. **PLoS ONE**, v. 6, n. 10, p. e26041, 2011.

ZHANG, X. X.; ZHANG, T. Occurrence, abundance, and diversity of tetracycline resistance genes in 15 sewage treatment plants across china and other global locations. **Environmental Science and Technology**, v. 45, n. 7, p. 2598–2604, 2011.

ZHANG, Y. H. P.; LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, n. 7, p. 797–824, 2004.

ZHAO, J. et al. Diversity change of microbial communities responding to zinc and arsenic pollution in a river of northeastern China. **Journal of Zhejiang University-SCIENCE B**, v. 15, n. 7, p. 670–680, 2014. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1631/jzus.B1400003>>.

ZHOU, B. et al. Prevalence and dissemination of antibiotic resistance genes and coselection of heavy metals in Chinese dairy farms. **Journal of Hazardous Materials**,

v. 320, p. 10–17, 2016. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.08.007>>.

ZWART, G. et al. Typical freshwater bacteria: An analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 28, n. 2, p. 141–155, 2002.

ANEXOS

Tabela 5.1A: Genes relacionados a resistência a metais pesados e antibióticos nos pontos TITR 02800 e TIET 02400 no plasmidoma.

Mecanismo de defesa	TITR 02800	TIET 02400
Resistência a cobalto-zinco-cádmio	0,263206	0,819956
Bomba de efluxo- Resistência a multidrogas	0,172635	0,514652
Resistência a fluoroquinolonas	0,317203	0,219566
Homeostase do cobre	0,066032	0,215605
Resistência a arsênico	0,16995	0,194984
Beta-lactamase	0,092929	0,086146
Resistência a metilina	0,081923	0,079371
Resistance_to_chromium_compounds	0,018826	0,064748

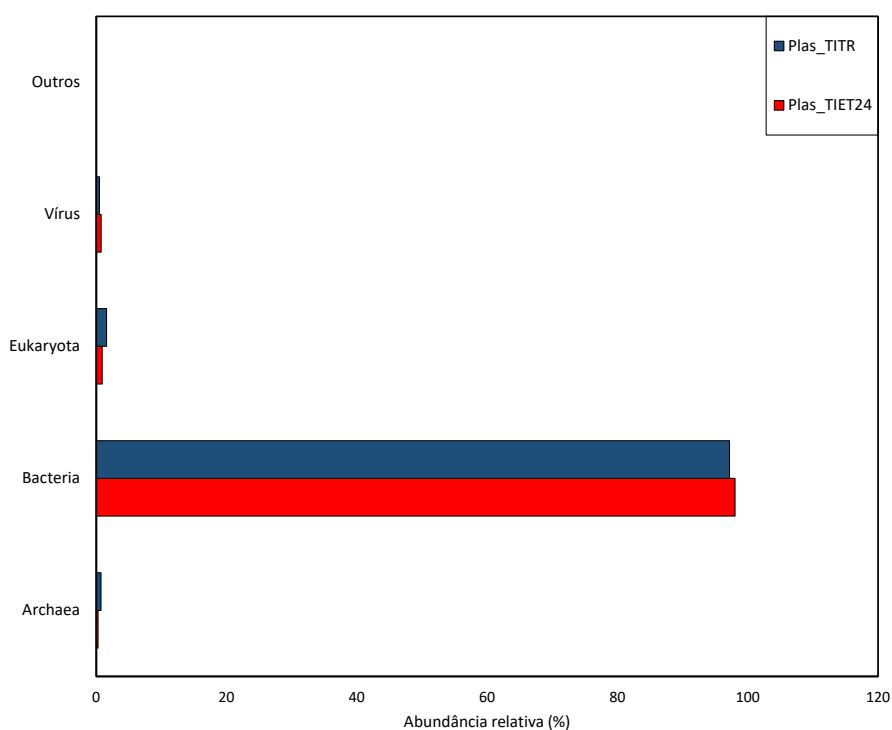


Figura 5.1A: Diversidade taxonômica dos possíveis hospedeiros plasmidiais considerando Domínios.

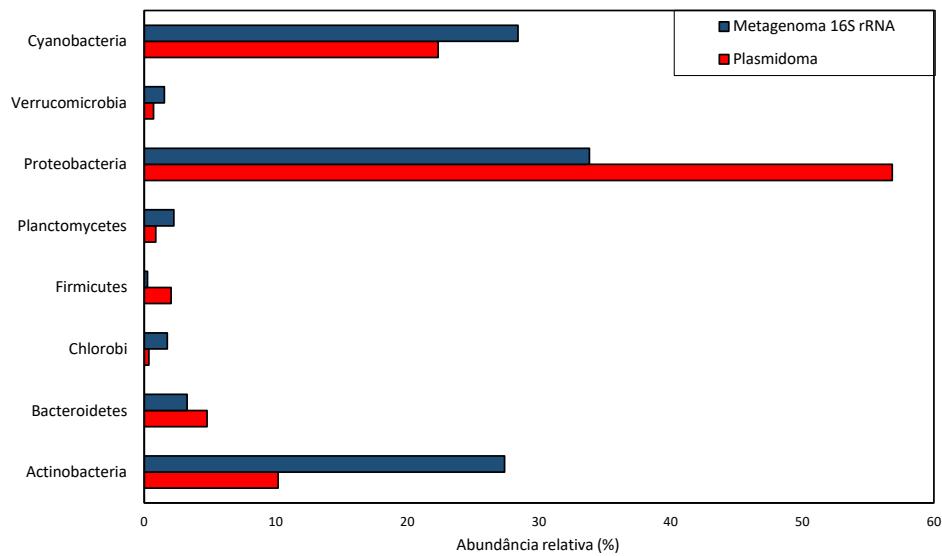


Figura 5.2A: Distribuição taxonômica (a nível de filo) dos possíveis hospedeiros das sequências plasmidiais (Plasmidoma) e dos dados obtidos pelo sequenciamento baseado no *amplicon* 16S rRNA (Metagenoma). Dados demonstrados pela abundância relativa em porcentagem.

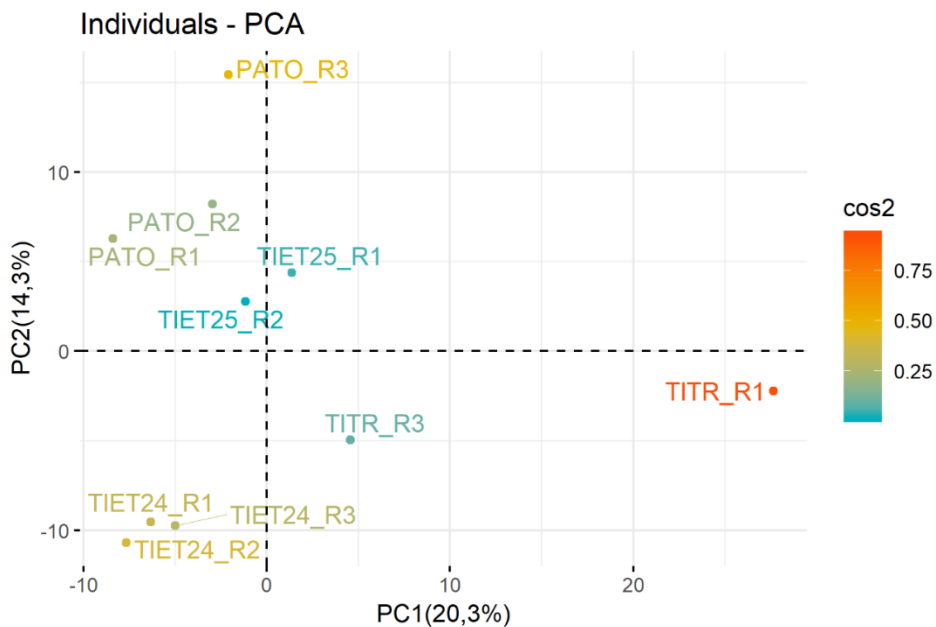


Figura 6.2A: Análise de componentes principais (PCA) utilizando os genes que conferem resistência a antibióticos nas amostras do Rio Tietê. TITR_R1, TITR_R2 e TITR_R3 correspondem ao ponto TITR02800 (réplicas 1, 2 e 3 respectivamente). TIET24_R1, TIET24_R2 e TIET24_R3 correspondem ao ponto TIET02400 (réplicas 1, 2 e 3 respectivamente). TIET25_R1 e TIET25_R2 correspondem ao ponto TIET02500 (réplicas 1 e 2 respectivamente).

