

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**  
**FISIOPATOLOGIA E TOXICOLOGIA**  
**ÁREA DE ANÁLISES CLÍNICAS**

**Genótipos e Fenótipos de Resistência a Metais Pesados e Agrotóxicos  
em Patógenos de Alto Risco em Saúde Única**

Larissa Rodrigues Vicente

Dissertação para obtenção do Título de MESTRE

Orientador: Prof. Dr. Nilton Erbet Lincopan Huenuman (FCF-USP, ICB-USP).

\* Laboratório de Resistência Bacteriana & Alternativas Terapêuticas. Departamento de Microbiologia – ICB – USP. Avenida Lineu Prestes, nº 1374 – São Paulo/SP. F. 11 – 3091 7354. CEP: 05508-900. E-mail: [lincopan@usp.br](mailto:lincopan@usp.br)

São Paulo, 2022

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**  
**FISIOPATOLOGIA E TOXICOLOGIA**  
**ÁREA DE ANÁLISES CLÍNICAS**

**Genótipos e Fenótipos de Resistência a Metais Pesados e Agrotóxicos**  
**em Patógenos de Alto Risco em Saúde Única**

Larissa Rodrigues Vicente

Versão corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 6018.

Dissertação para obtenção do Título de MESTRE

Orientador: Prof. Dr. Nilton Erbet Lincopan Huenuman

\* Laboratório de Resistência Bacteriana & Alternativas Terapêuticas. Departamento de Microbiologia – ICB – USP. Avenida Lineu Prestes, nº 1374 – São Paulo/SP. F. 11 – 3091 7354. CEP: 05508-900. E-mail: [lincopan@usp.br](mailto:lincopan@usp.br)

São Paulo, 2022

Larissa Rodrigues Vicente

**Genótipos e Fenótipos de Resistência a Metais Pesados e Agrotóxicos em  
Patógenos de Alto Risco em Saúde Única**

Comissão Julgadora

da

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof. Dr. orientador/presidente

---

1o. Examinador

---

2o. examinador

---

3o. Examinador

---

4o. examinador

São Paulo, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2022.

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

**Ficha Catalográfica**

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e  
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação: Marlene  
Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

Vicente, Larissa Rodrigues

V632g Genótipos e Fenótipos de Resistência a Metais Pesados e Agrotóxicos em Patógenos de Alto Risco em Saúde Única / Larissa Rodrigues Vicente. -- São Paulo, 2022.

59p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas - Programa de Pós-Graduação em Farmácia

(Fisiopatologia e Toxicologia)

Orientador: Lincopan, Nilton

1. Bactérias multirresistentes. 2. Resistência antimicrobiana. 3. Resistoma. 4. Metais pesados. 5. Saúde única. I. T. II. Lincopan, Nilton, orientador.

CDD 616.014

## **Agradecimentos**

Agradeço à Deus, pela oportunidade de realizar essa pesquisa, pela saúde, por cuidar sempre de mim. Aos meus queridos pais Maria Lúcia Rodrigues Vicente, Dimas Vicente, ao meu irmão Miguel Rodrigues Vicente e aos meus colegas de trabalho.

Em especial ao meu orientador, professor Nilton Lincopan, pela oportunidade, paciência, aprendizados e apoio.

Gratidão a Louise Cerdeira, Fernanda Espósito, Brenda, Elder, Gregory e Karine por auxílio nos experimentos e por realizar as montagens dos genomas das cepas utilizadas neste estudo. À Bruna, Brenda, Fernanda, Louise, Quézia, Dany, Fábio, Miriam, Ralf que cederam as cepas para realização do presente trabalho. À Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal CAPES e ao Departamento de Fisiopatologia e Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas -USP, pela bolsa de estudo.

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

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho com muito carinho aos meus pais, Maria Lúcia Rodrigues Vicente, Dimas Vicente, ao meu irmão Miguel Rodrigues Vicente, aos meus colegas de trabalho e ao meu orientador Nilton Lincopan.

## RESUMO

**Rodrigues. V. Larissa. Genótipos e Fenótipos de Resistência a Metais Pesados e Agrotóxicos em Patógenos de Alto Risco em Saúde Única 2022. Dissertação (Mestrado) -Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2022.**

As atividades industriais e de agronegócio, embora necessárias para o desenvolvimento da sociedade, tem causado sérios problemas ambientais devido à eliminação inadequada de seus efluentes, sendo o tratamento destes um dos assuntos mais importantes em relação ao controle de poluição. Os microrganismos podem ser utilizados como biomarcadores de contaminação, portanto, o conhecimento de mecanismos associados à resistência e a capacidade de imobilização e biotransformação de poluentes é um fator importante para a identificação de linhagens adaptadas, que podem ser eficientes no tratamento e na recuperação de áreas contaminadas. O objetivo do presente projeto foi avaliar o perfil de tolerância de patógenos bacterianos de alto risco em saúde única, aos metais pesados (mercúrio, prata, telúrio e arsênio) e ao agrotóxico glifosato; identificando o resistoma associado. A correlação fenótipo-genótipo foi avaliada em isolados de *Klebsiella pneumoniae* (n= 35), *Escherichia coli* (n=46), e *Salmonella* spp. (n=19), determinando a CIM pelo método de microdiluição, e analisando as respectivas sequências genômicas. Entre os isolados de *K. pneumoniae*, 32 cepas apresentaram CIM elevadas (64-512µg/mL) para o metal prata, dos quais 20 carregam o operon *silPABCRSE* responsável por conferir resistência. Uma cepa de *K. pneumoniae* carregando genes *terABCE* apresentou uma CIM de 64 µg/mL para telúrio. Seis cepas de *E. coli* apresentaram uma CIM >32 µg/mL para telúrio, sendo que 3 cepas carregam os genes *tehA/B*. Outras 6 cepas de *E. coli* apresentaram CIM para prata de 256-512 µg/mL, mas só duas carregaram genes *silPFCE*. Duas cepas de *Salmonella* apresentaram CIM 64-128 µg/mL para telúrio, e carregam genes *tehA/B* e *terABCDEF*. Em relação ao arsênio, 24 cepas de *E. coli* apresentaram uma CIM  $\geq$  512 µg/mL, e destas, 12 cepas carregam os genes *arsRBC*. *Salmonella* spp., que carregam o gene *merR* apresentaram CIMs de 8-16 µg/mL para mercúrio. Não foi possível correlacionar a presença do operon *phnC-P* (sugerido como responsável pela tolerância ao glifosato) com CIMs elevadas para este composto. Os resultados obtidos suportam a hipóteses que a exposição de bactérias de origem humana, animal e ambiental, aos metais pesados pode estar contribuindo para a seleção de linhagens tolerantes, sendo que a tolerância à prata mediada pelo operon *silPABCRSE* em *K. pneumoniae* foi predominante no grupo clonal CG258, característica com potencial de biomarcador que pode ser utilizado para monitorar o impacto do uso deste metal nas diferentes atividades humanas. Neste trabalho foi possível padronizar a técnica de PCR com os genes do operon *sil* de interesse.

**Palavras chaves:** Bactérias multirresistentes, Resistência antimicrobiana, Resistoma, Metais pesados, Saúde única, Prata, Biomarcador.

## ABSTRACT

Industrial and agribusiness activities have caused serious environmental problems due to the inadequate disposal of their effluents, the treatment of which being one of the most important issues in relation to pollution control. Microorganisms can be used as biomarkers of contamination, therefore the knowledge of mechanisms associated with resistance and the immobilization and biotransformation capacity of pollutants can be an important factor for the identification of adapted strains, efficient in the treatment and recovery of contaminated areas. The aim of this study was to evaluate the tolerance profile of critical priority bacterial pathogens relevant in One Health, to heavy metals (mercury, silver, tellurium, and arsenic) and to the pesticide glyphosate, identifying the associated resistome. The phenotype-genotype correlation was evaluated in antibiotic-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* ( $n=35$ ), *Escherichia coli* ( $n=46$ ), and *Salmonella* spp. ( $n=19$ ), by MIC determination using the microdilution method, and by analysis of their respective genomic sequences. Among the isolates of *K. pneumoniae*, 32 strains showed elevated MIC (64-512  $\mu\text{g/mL}$ ) for silver metal, of which 20 carried the *silPABCRSE* operon responsible for conferring resistance. A strain of *K. pneumoniae* carrying *terrace* genes showed a MIC of 64  $\mu\text{g/mL}$  for tellurium. Six strains of *E. coli* showed an MIC > 32  $\mu\text{g/mL}$  for tellurium, with 3 strains carrying the *Thea/B* genes. Other 6 strains of *E. coli* showed MIC for silver of 256-512  $\mu\text{g/mL}$ , but only two carried *silPFCE* genes. Two strains of *Salmonella* showed MIC 64-128  $\mu\text{g/mL}$  for tellurium and carried *the/B* and *terABCDEFG* genes. In relation to arsenic, 24 strains of *E. coli* had a MIC  $\geq 512 \mu\text{g/mL}$ , and of these, 12 strains carried the *arsRBC* genes. *Salmonella* spp., which carried the *mer* gene, had MICs of 8-16  $\mu\text{g/mL}$  for mercury. It was not possible to correlate the presence of the *phonic-P* operon (suggested as responsible for glyphosate tolerance) with elevated MICs for this compound. The silver tolerance mediated by the operon *sil* was a predominant feature in *K. pneumoniae* strains belonging to the clonal group CG258, suggesting an intrinsic property that has contributed to the persistence and wide dissemination of CG258 within a One Health context, which could be used as a biomarker to monitor the impact of the use of silver compounds and silver-based biomaterial on different human activities. In this work it was possible to standardize the PCR technique with the genes of the *sil operon* of interest.

**Keywords:** Multidrug-resistant bacteria, Antimicrobial resistance, Resisted, Heavy metals, One Health, Silver, Biomarker.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Esquema ilustrativo do sistema de efluxo da resistência a prata em bactérias. .....	13
<b>Figura 2:</b> Representação ilustrativa dos mecanismos antibacterianos multialvo de nanopartículas de prata (nag) na superfície celular.....	14
<b>Figura 3:</b> Esquema ilustrativo do contexto genético de genes conferindo resistência à prata. ....	31
<b>Figura 4.</b> PCR com os genes de interesse de Prata.....	32
<b>Figura 5.</b> Árvore filogenética com isolados de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	33

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Características epidemiológicas e genótipos de resistência das cepas selecionadas. .....	16
<b>Tabela 2.</b> Cepas ATCC selecionadas para o presente estudo.....	17
<b>Tabela 3:</b> Genes controle do banco de NCBI.....	21
<b>Tabela 4.</b> Sequência dos <i>primers</i> utilizados neste estudo ... ..	22
<b>Tabela 5.</b> Genótipo e fenótipo de resistência aos metais pesados em <i>K. pneumoniae</i> estudadas. ....	23
<b>Tabela 6.</b> Genótipo e fenótipo de resistência aos metais pesados em <i>E. coli</i> estudadas. ....	26
<b>Tabela 7:</b> Genótipo e fenótipo de resistência aos metais pesados em <i>Salmonella spp.</i> estudadas.....	29

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABC	Transportadores De Cassete De Ligação Ao ATP (do inglês, ATP Binding Cassette)
AM	Amazonas
ARG	Argentina
ATBs	Antibióticos
ATCC	American Type Culture Colletion
BO	Bolívia
BR	Brasil
CC	Complexo Clonal
CH	Chile
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory StandardsInstitute
ID	Identidade
GO	Goiás
HgCl <sub>2</sub>	Cloreto de Mercúrio
TeCl <sub>4</sub>	Tetracloroeto de Telúrio
AgCl	Cloreto de Prata
AsCl <sub>3</sub>	Cloreto de Arsênio
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (do inglês Deoxyribonucleic Acid)
LI	Lima
NB	Ñuble
OMS	Organização Mundial Da Saúde
PB	Paraíba
PCR	Reação Em Cadeia Da Polimerase (do inglês, Polymerase Chain Reaction)
PE	Perú
PR	Paraná
RN	Rio Grande Do Norte
RND	Resistência-Nodulação-Divisão (do inglês, Resistance Nodulation Division)

RS Rio Grande do Sul

SC Santa Catarina

ST Sequência Tipo (do inglês Sequence Type)

### **LISTA DE SÍMBOLOS**

°C - Graus Celsius

H - Hora(s)

mL - Mililitro(s)

Min - Minuto(s)

pb - Par De Bases

s - Segundo(s)

µg - Micrograma(s)

µl - Microlitro(s)

> - Maior

% - Porcentagem

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
1.1. Seleção de populações bacterianas resistentes aos antimicrobianos .....	10
1.2 Metais pesados.....	10
1.3 Agrotóxicos .....	12
1.4 Genes envolvidos na resistência aos metais pesados e agrotóxicos .....	12
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>15</b>
2.1 Objetivo Geral .....	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>16</b>
3.1 Seleção de cepas bacterianas .....	16
3.2 Recuperação dos isolados.....	17
3.3 Determinação da CIM (concentração inibitória mínima).....	17
3.4 Extração de DNA e Sequenciamento .....	18
3.5 Identificação de genes de resistência a metais pesados <i>in silico</i> .....	18
3.6 Análise de genes de resistência a metais pesados.....	18
3.7 Filogenômica .....	19
3.8 Extração de DNA para PCR .....	19
3.9 PCR.....	19
3.9.1 Sequências de primers .....	21
3.9.2 Árvore Filogenética .....	21
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>23</b>
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>39</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>40</b>

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. Seleção de populações bacterianas resistentes aos antimicrobianos**

Os ambientes contaminados por metais tóxicos e agrotóxicos normalmente são derivados de atividades agrícolas, industriais ou domésticas, permitindo o seu acúmulo, visto que estes não são degradados. Vários estudos realizados apresentaram dados mostrando um aumento na concentração de metais e agrotóxicos no ambiente, que podem induzir um aumento da tolerância na comunidade dos microrganismos, principalmente das bactérias. Assim de acordo com as várias pressões seletivas do meio (que inclui os contaminantes e antimicrobianos), muitos microrganismos que possuem genes de resistência a diferentes moléculas podem ser selecionados (CONGEEVARAM *et al.*, 2007; DOPSON e HOLMES, 2014; OROZCO *et al.*, 2019).

Os mecanismos de resistência incluem bombas de efluxo, transporte ativo, exclusão através da barreira de permeabilidade, desintoxicação enzimática, e até mesmo por uma redução da sensibilidade dos alvos celulares a íons metálicos. Estes mecanismos são frequentemente adquiridos pela transferência horizontal de genes que são carregados por plasmídeo, contribuindo para a adaptação da comunidade bacteriana ou até mesmo por transformação (CONGEEVARAM *et al.*, 2007; DOPSON e HOLMES, 2014; OROZCO *et al.*, 2019).

As bactérias que adquirem resistência formam subpopulações que toleram aos efeitos dos agentes antimicrobianos- antibióticos, desinfetantes, metais pesados ou agrotóxicos. Especificamente, a exposição a metais pesados e agrotóxicos causam um estresse oxidativo em bactérias e estimula a presença das cepas resistentes (OROZCO *et al.*, 2019).

### **1.2 Metais pesados**

Nos países em desenvolvimento, o rápido crescimento populacional e a urbanização aumentam a geração de grandes quantidades de resíduos sólidos, muitos destes são despejados em lençóis freáticos e nos solos, inclusive há metais pesados nestes locais. Os metais pesados que se encontram em ambientes naturais se originam de atividades industriais, como na fabricação de produtos químicos, pigmentos, tintas, petroquímicos e baterias (CHITAMBAR, 2010; KOMÁREK; VANEK e ETTLER, 2013).

Os metais são um grupo de elementos químicos, que em seu estado puro são sólidos, possuem brilho, dureza, boa condutividade térmica e elétrica. Dentro deste grupo, existem alguns elementos que apresentam uma densidade mais elevada ( $>4,0 \text{ g/cm}^3$ ), os quais são denominados metais pesados. Eles possuem valores elevados em sua massa específica, massa atômica, e número atômico (KOMÁREK; VANEK e ETTLER, 2013).

Alguns metais pesados causam efeitos nocivos em organismos por terem propriedades cancerígenas, mutagênicas e acumulativas. Suas principais propriedades são os elevados níveis de bioacumulação e reatividade no organismo, no qual afetam diversas reações em seu metabolismo, são agentes tóxicos porque não são sintetizados nem destruídos (CHITAMBAR, 2010).

O mercúrio e arsênio foram utilizados por muitos anos em alguns medicamentos quimioterápicos e até em antimicrobianos, porém, seu uso foi reduzido quase totalmente nos últimos 50 anos. Outros metais como prata e o cobre tem sido utilizados em produtos de consumo, na medicina, agricultura, fabricação de teclados de computador e na confecção de roupas (KOMÁREK; VANEK e ETTLER, 2013).

Os metais pesados são altamente tóxicos para a maioria dos microrganismos, no entanto existem bactérias que possuem uma variedade de mecanismos de resistência que as tornam capazes de tolerar elevadas concentrações destes metais, assim esses microrganismos podem ser utilizados como agentes de remoção de metais (biorremediação) por meio de mecanismos de absorção e adsorção (CONGEEVARAM *et al.*, 2007; GAYLARDE *et al.*, 2005). Espécies bacterianas resistentes podem sobreviver em ambientes contaminados por metais pesados independentemente dos níveis de contaminação, se tornando predominantes nestes ambientes. Em relação a tolerância a estes metais, o mecanismo principal que regula as concentrações de metal intracelular está relacionado com o transporte de membrana (DOPSON e HOLMES, 2014; ZHANG *et al.*, 2018). Outro mecanismo de resistência das bactérias aos metais pesados está relacionado na produção de exopolissacarídeos (EPSs), os quais possibilitam uma maior capacidade de adsorção de metais, sendo associada aos grupos funcionais presentes nos EPSs (COLIN *et al.*, 2013; WANG, 2007).

Um dos metais utilizados neste estudo foi a prata, essa que compõe materiais antibacterianos há milhares de anos, atualmente ela tem sido utilizada de forma predominante em ambientes hospitalares e no cotidiano (em filtros, medicamentos e no revestimento de vários materiais domésticos). O consumo descontrolado de materiais que contêm a prata, pode aumentar a disseminação da resistência/tolerância à prata em microrganismos, o que vem sendo relatado em muitos estudos atuais (TALAPKO *et al.*, 2020).

### 1.3 Agrotóxicos

Na agricultura, o uso de agrotóxicos visa controlar ervas daninhas que prejudicam à produtividade no campo, entretanto estes produtos são utilizados de forma exagerada em campos agrícolas. Os alimentos contaminados são a principal fonte de colonização e infecção de humanos e um fator de risco para a transferência de genes de resistência antimicrobiana. Alguns microrganismos possuem mecanismos de adaptação para sobreviver em ambientes impactados, os quais podem ser baseados na degradação dos herbicidas; contudo, sabe-se pouco sobre o mecanismo de ação dos herbicidas nos organismos procariontes, assim como a sua influência na diversidade e na função das comunidades microbianas afetadas (IMFELD e VUILLEUMIER, 2012).

O Brasil é um dos maiores produtores agrícolas do mundo, no qual exporta produtos como soja, milho e café, entre outros, conseqüentemente este setor utiliza diversos artifícios para melhorar e aprimorar a produção, como o uso de fertilizantes e agrotóxicos de forma intensiva, atingindo diversos ambientes como as águas superficiais, o solo, o ar, e até mesmo os próprios alimentos. Indiretamente, o setor da agropecuária pode ser afetado, onde solos e águas contaminadas podem entrar em contato com o alimento dos animais de produção (ex., frangos, suínos e bovinos) (PIGNATI, *et al.*, 2017; BOTE *et al.*, 2019).

Os herbicidas mais utilizados entre os anos de 2012 à 2018 no Brasil foram o glifosato, 2,4-D, atrazina, haloxifope-P-metílico, lactofem, diquate, flumetsulam, imazetapir. Neste projeto foi estudado o herbicida de amplo espectro denominado glifosato, N- (Fosfometil) glicina, é um dos pesticidas mais usados no mundo para eliminar todos os tipos de ervas daninhas, ele tem como alvo a enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintase (EPSPS) na via do chiquimato e interrompe a formação de aminoácidos aromáticos e outros compostos vegetais secundários da planta. A presença de contaminantes dos componentes dos herbicidas na soja e no milho tratados com glifosato expõe a microbiota dos animais de campo (PIGNATI, *et al.*, 2017; BOTE *et al.*, 2019).

### 1.4 Genes envolvidos na resistência aos metais pesados e agrotóxicos

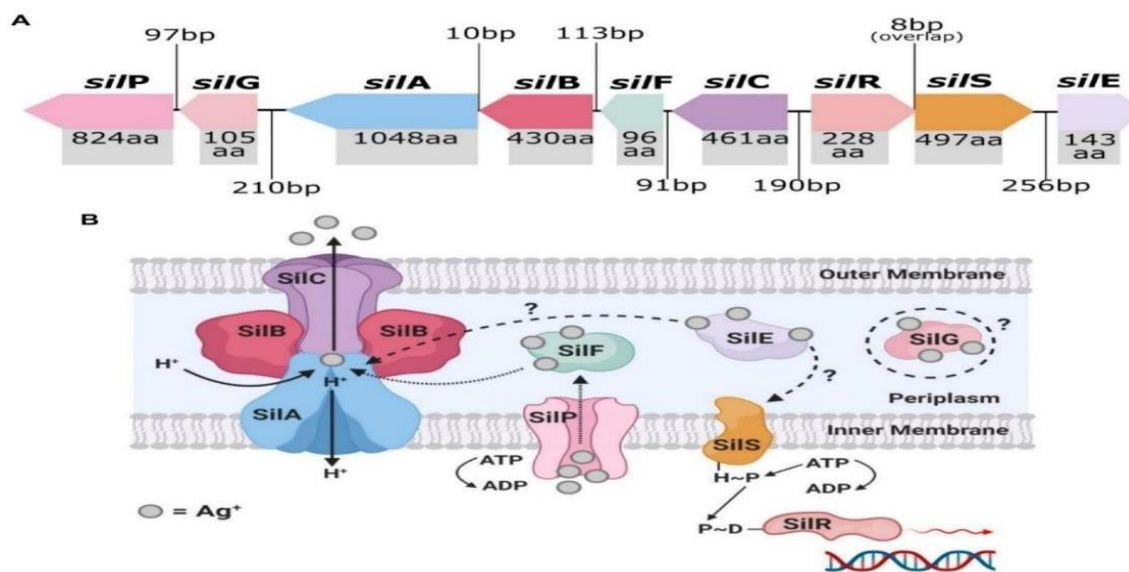
Em diversos ambientes contaminados, alguns metais podem selecionar algumas variantes genéticas resistentes a metais pesados e a alguns antimicrobianos, muitas bactérias possuem mecanismos genéticos específicos de resistência a metais tóxicos, há uma variedade de genes responsáveis pela resistência aos metais pesados, sendo: *ars* (para arsênio), *cadC* (cádmio), *nik* e *rcn* (níquel), *rcn* (cobalto), *teh* e *ter* (telúrio), *fet* (ferro), *mer* (mercúrio), *pco* (cobre), *sil* (prata) e *pbr* (chumbo) (HANCZVIKKEL *et al.*, 2018; LINCOPAN, 2018).



Os sistemas de resistência a metais e a outros antimicrobianos, são cromossômicos ou estão plasmídeos, estes podem se complementar, como exemplo uma mutação pode acarretar em um alto nível de tolerância a prata, em *Escherichia coli* a resistência à prata é relatado desde 1969. As bactérias resistentes à prata são frequentemente isoladas de ambientes clínicos, queimaduras, feridas e placas dentárias (devido ao uso crescente de prata para fins médicos) (HANCZVIKKEK *et al.*, 2018).

Compostos nocivos como metais pesados e agrotóxicos muitas vezes entram na célula através dos sistemas de transporte de nutrientes. Na **figura 1** se observa uma bomba de efluxo conhecida também como sistemas de transporte ativo, é o maior sistema de resistência a metais, os quais podem ser codificados por plasmídeos ou pelo cromossomo. Esse mecanismo evita danos aos componentes celulares. O operon *sil* é composto por nove ORFs, sete são genes estruturais (*silE*, *silC*, *silF*, *silB*, *silA*, ORF105 e *silP*) e dois (*silR* e *silS*) que de acordo com Bernardo *et al.*, (2019), codificam um circuito regulador putativo de dois componentes (**Figura 1 e 2**) (IMFELD, G. e VUILLEUMIER, 2012; NEETA; MAANSI; HARPREET, 2016).

**Figura 1:** Esquema ilustrativo do sistema de efluxo da resistência a prata em bactérias-transporte de íons.

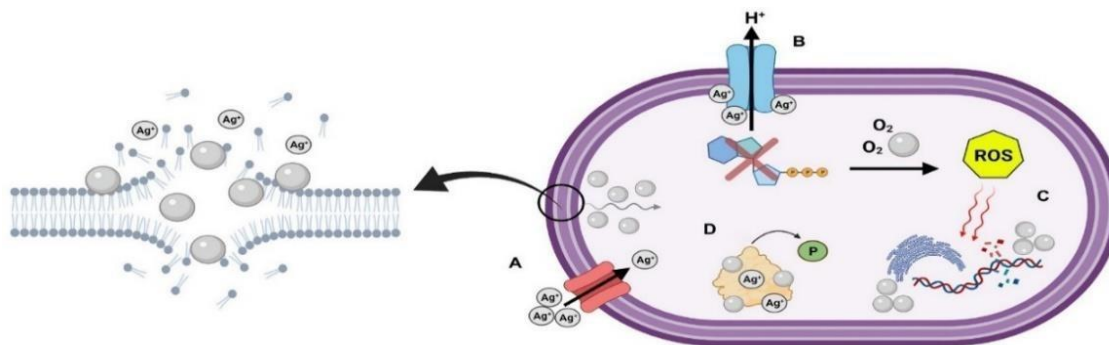


**Legenda:** (A) Ilustra a sequência genética do operon *sil* e inclui as lacunas/sobreposições do par de bases do DNA intergênico (bp) e o comprimento do aminoácido (aa). (B) Representação gráfica do arranjo de proteínas conhecido em funções do sistema de efluxo de Sil ligado à membrana. Criado em Inkscape (A) e BioRender (B).

Fonte: Randall *et al.*, 2015.

O sequestro intracelular e extracelular de compostos químicos inorgânicos é um mecanismo que geralmente ocorre em microrganismos, os quais acumulam elementos tóxicos dentro do citoplasma ou fora da célula, para evitar a exposição dos componentes celulares essenciais (NEETA, MAANSI e HARPREET, 2016).

**Figura 2:** Representação ilustrativa dos mecanismos antibacterianos multialvo de nanopartículas de prata (N<sub>Ag</sub>) na superfície celular e no citoplasma celular.



**Legenda Figura 2:** (A) Adesão e “pitting” da membrana celular, internalização do N<sub>Ag</sub>, e passagem do Ag<sup>+</sup> através dos canais de porina da membrana externa (OMP), (B) desacoplamento da cadeia respiratória pelo Ag<sup>+</sup>, (C) danos às biomoléculas por reação reativa. (D) interrupção da sinalização celular através da desfosforilação de proteínas. Criado em BioRender.

Fonte: Dakal *et al.*, 2016.

A resistência ou tolerância a prata envolve vários mecanismos, dentre eles estão presentes alguns genes que compõem o operon *sil* com nove ORFs (frames de leitura aberta) dispostos em três unidades de transcrição (*silCFBAGP*, *silRS* e *silE*), que são expressos a partir de um promotor diferente. A primeira unidade de transcrição é composta por *silCFBAGP*, esta que codifica um complexo de proteína da membrana interna formado por três subunidades (*silA*, *silB* e *silC*). Esses três componentes formam uma bomba de efluxo que é membro da família dos transportadores de resistência, nodulação e divisão celular (RND). *silP* é um membro da família ATPase de resistência a metais pesados, *silG* e *silF* são chaperonas responsáveis por sequestrar os íons de prata e transportá-los para *silP* e *silCBA* complexos (MARCO *et al.*, 2019).

A segunda unidade de transcrição é a *silE* e na sequência desta, há um par de genes *silRS*, que codifica uma proteína reguladora da resposta transcricional e uma cinase de detecção de membrana. Por fim a última unidade de transcrição é composta por *silE*, que codifica uma proteína periplasmática que também se liga a Ag<sup>+</sup>. Entre *silA* e *silP* e entre *silC* e *silB*, existem duas ORFs de 105 e 96aa, respectivamente, de função não identificada. As bombas de efluxo são sintetizadas a partir da expressão dos genes mencionados (*silCBA* e *silP*), que estão envolvidos no mecanismo de resistência às nanopartículas de prata, por meio da expulsão dos íons de prata, evitando que eles afetem os componentes internos da bactéria (MARCO *et al.*, 2019).

Os genes que codificam as proteínas de resistência ao mercúrio estão presentes nos plasmídeos e transposons, em diferentes posições, envolvendo os genes reguladores, transportadores e replicons, que estão dentro das células, que é o operon *mer* composto pelo os genes *merABCDERPT*. O gene *merR* é responsável por codificar uma proteína regulatória dos íons de mercúrio que tem a maior seletividade destes íons, o *merT* codifica um sistema de captação de íons H<sup>+</sup>, o *merE* não tem função conhecida, porém

alguns estudos citam que este gene pode ter função de transporte de íons (CHIOU, 2015; AZAN, 2018).

Os genes envolvidos na resistência ao telúrio são o *terABCDEFWXY* e os genes *tehA*, *tehB*, um ambiente redutor de elétrons é necessário para *tehA**tehB* mediar altos níveis de resistência ao telurito de potássio. Há também o mecanismo de resistência endógena ao telurito que envolve os processos de tiol redox, nitrato redutase e superóxido dismutase (TAKAHASHI e OKAMURA, 2019).

Os genes envolvidos na codificação dos sistemas de desintoxicação do metal arsênio são encontrados tanto nos plasmídeos quanto nos cromossomos; normalmente, os genes *ars* são organizados como operons, como *arsRBC* (é o mais comum encontrado em *E. coli*), *arsRABC* e *arsRDABC*, mas alguns genes *ars* existem individualmente (EDMUNDSON e HORSFALL, 2015; SÜTTERLIN *et al.*, 2018).

Em relação a tolerância ao herbicida glifosato, alguns estudos identificaram a via bioquímica responsável pela transformação do fósforo do glifosato, que é uma fonte de fósforo para alguns microrganismos, os genes *phnC-P* codificam as enzimas para essa via, estes genes estão amplamente difundidos entre espécies bacterianas. Também existe o gene *aroA*, a atividade da *5-enolpiruvilchiquimato 3-fosfato sintase* da via do glifosato (codificada por *aroA*) de muitas espécies bacterianas é insensível ao glifosato. De acordo com novos estudos há outros genes envolvidos na tolerância ao glifosato que ainda estão sendo estudados e identificados (SUN *et al.*, 2005; JENSEN, ZECHEL e JOCHIMSEN, 2014).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Identificar fenótipos e genótipos de tolerância a metais pesados e agrotóxicos em patógenos bacterianos de alto risco em saúde única, isolados de amostras clínicas (animais e seres humanos), alimentos e ambientes aquáticos poluídos.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Avaliar a tolerância bacteriana aos metais pesados e agrotóxicos utilizando o método de microdiluição em caldo.
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de metais pesados e do herbicida glifosato;
- Identificar e anotar os genes envolvidos na resistência/tolerância aos metais pesados e do herbicida glifosato a partir de genomas sequenciados.
- Correlacionar fenótipo e genótipo de tolerância aos metais pesados e agrotóxicos testados.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Seleção de cepas bacterianas

Neste estudo foram investigados 102 isolados de uma coleção bacteriana obtida de estudos de monitoramento de bactérias Gram-negativas clinicamente significantes circulando na interface humana-ambiente-animal (projeto OneBR, <http://www.onehealthbr.com/>). Os isolados correspondem a cepas de importância clínica. Os resultados contêm informações obtidas a partir de 102 cepas: *Klebsiella pneumoniae* (n= 33), *Escherichia coli* (n= 50) e *Salmonella* (n= 19). Como controles foram incluídas as cepas ATCC de *Klebsiella pneumoniae* (n= 2), *Escherichia coli* (n= 2) e *Salmonella* spp.(n= 4) (**Tabela 2**).

Os genomas dos isolados estudados foram obtidos por sequenciamento completo utilizando as plataformas Illumina MiSeq e/ou NextSeq. As informações e identificação dos isolados selecionados para este estudo são apresentadas na **Tabela 1**.

**Tabela 1.** Características epidemiológicas e genótipos de resistência das cepas selecionadas

Número de cepas	Origem	Espécie	País	Ano de isolamento
24	Humano	<i>K. pneumoniae</i>	BR	2003- 2019
13	Ambiente aquático	<i>K. pneumoniae</i>	BR	2011
1	Animal de produção	<i>K. pneumoniae</i>	BR	2011
2	Animal de companhia	<i>K. pneumoniae</i>	BR	2015
4	Animal silvestre	<i>K. pneumoniae</i>	BR	2017
1	Ambiente doméstico	<i>K. pneumoniae</i>	BR	2017
1	Alface	<i>K. pneumoniae</i>	BR	2018
1	Rúcula	<i>K. pneumoniae</i>	BR	2018
11	Humano	<i>E. coli</i>	BR/BO	2012- 2017
8	Animal de companhia	<i>E. coli</i>	BR	2013
3	Ambiente aquático	<i>E. coli</i>	BR	2016
3	Animal de produção	<i>E. coli</i>	BR	2014
1	Alimento	<i>E. coli</i>	BR	2013
2	Animal silvestre	<i>E. coli</i>	BR	2017-2018
2	Animal silvestre	<i>E. coli</i>	CH	2018
1	Espinafre	<i>E. coli</i>	BR	2018
2	Repolho	<i>E. coli</i>	BR	2018
3	Alface	<i>E. coli</i>	BR	2018
1	Alimento frango salgado	<i>S. Enteritidis</i>	BR	2012
4	Alimento frango de corte	<i>S. Heidelberg</i>	BR	2016
1	Animal	<i>S. Infantis</i>	BO	2018
1	Alimento carne de frango	<i>S. Infantis</i>	BR	2015
1	Infecção humana	<i>S. Muenchen</i>	BR	2013
1	Alimento carne de frango	<i>S. Minnesota</i>	BR	2010
4	Alimento frango de corte	<i>S. Typhimurium</i>	BR	2015
1	Alimento fígado de suíno	<i>S. Typhimurium</i>	BR	2000
1	Humano	<i>S. Typhimurium</i>	ARG	2014
1	Alimento carne de suíno	<i>S. Typhimurium</i>	BR	2000
1	Alimento carne de frango	<i>S. Typhimurium</i>	BR	2010

**Legenda:** BR: Brasil, CH: Chile, ARG: Argentina, BO: Bolívia

Foram utilizadas cepas ATCC como controle para a padronização dos métodos de microdiluição em caldo para determinação das CIMs aos metais. Dados do sequenciamento de algumas cepas ATCC foram obtidas da base de dados GenBank (**Tabela 2**).

**Tabela 2.** Cepas ATCC selecionadas para o presente estudo

<b>Identificação</b>	<b>Espécie</b>	<b>Número de acesso</b>
ATCC 25922	<i>E. coli</i>	CP009072
ATCC 8739	<i>E. coli</i>	NC_010468.1
ATCC13883	<i>K. pneumoniae</i>	JOOW00000000
ATCC700603	<i>K. pneumoniae</i>	CP014696
ATCC14028	<i>S. Typhimurium</i>	MTFW00000000.1
ATCC 10708	<i>S. Choleraesuis</i>	NZ_CP012344.2
ATCC 6537	<i>S. Typhi</i>	-
ATCC 13076	<i>S. Enteritidis</i>	LSHA00000000.1

### 3.2 Recuperação dos isolados

Os isolados previamente armazenados em glicerol, no freezer  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , foram reativados inoculando  $30\text{ }\mu\text{L}$  em tubos contendo  $3\text{ mL}$  de caldo BHI e, posteriormente incubadas em estufa a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante um período de 18-24 h.

### 3.3 Determinação da CIM (concentração inibitória mínima)

Não há padrões para testar CIMs de herbicidas e metais pesados, contudo foi realizado o protocolo de teste de suscetibilidade de acordo com Wiegand *et al.*, (2008), que está em conformidade com os padrões CLSI. A concentração inibitória mínima (MIC) das cepas foi determinada pelo método de microdiluição em caldo Mueller-Hinton cation ajustado, o qual foi disposto em placas de polietileno com 96 poços, cada qual com  $100\text{ }\mu\text{l}$  de caldo líquido, as cepas foram semeadas com um auxílio de uma alça de metal nas devidas concentrações estabelecidas- e em outra placa para controle foram semeadas as cepas ATCC. Estas foram incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 16-24h. A concentração mínima de cada metal pesado que inibiu o crescimento do isolado foi definida como sua CIM. Os sais de metais pesados utilizados foram o  $\text{TeCl}_4$  (tetracloro de telúrio),  $\text{AgCl}$  (cloreto de prata),  $\text{AsCl}_3$  (cloreto de arsênio) e  $\text{HgCl}_2$  (cloreto de mercúrio), estes metais foram utilizados na formulação cloreto pois são solúveis em água e são considerados biodisponíveis em diversos ambientes, estes metais foram testados nas concentrações ( $512\text{ }\mu\text{g/mL}$  na concentração inicial mais alta á  $1\text{ }\mu\text{g/mL}$  na concentração final). (AZAM *et al.*, 2018). Para o teste com o herbicida glifosato também foi determinada CIM, utilizando os produtos glifosato (SIGMA, PESTANAL, Produto n°: 45521); Peso  $250\text{ mg}$  na concentração Inicial (CI):  $15\text{ mg/mL}$  e Final (CF):  $0,012\text{ mg/mL}$  e o produto BioCarB(1%) sal de Glifosato na CI:  $5\text{ mg/mL}$  e CF:  $0,009\text{ mg/mL}$ . Usando como

referência estudos de Bote *et al.*, (2019).

### 3.4 Extração de DNA e Sequenciamento

Os DNAs genômicos de todos os isolados foram extraídos usando um PureLink™ Quick Gel Extraction Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), seguindo o protocolo do fabricante. Todo o genoma foi sequenciado na plataforma Illumina NextSeq PE (Illumina Inc., San Diego, CA). Usando A ferramenta **De Novo**. A montagem dos genomas foram realizados utilizando o CLC Genomics Workbench 12.0.3 ou Unicycler v0.4.8. (<https://github.com/rrwick/Unicycler>).

### 3.5 Identificação de genes de resistência a metais pesados *in silico*

As sequencias de DNA obtidas foram montadas utilizando o programa Unicycler e/ou CLC (WYCK *et al.*, 2018); após a montagem, os contigs foram anotados automaticamente utilizando o programa PROKKA (MARTINS *et al.*, 2018). O conteúdo anotado foi a base para a seleção de genes e proteínas que podem estar relacionados com a resistência aos metais pesados, estes que já estão descritos nos bancos de dados público com o GenBank (NCBI).

A análise dos genes de interesse foi realizada pelo programa BLASTn, através da plataforma do NCBI e através de um comando de linha realizado a partir do programa Abricate que abriga um banco curado com os genes de interesse. Os genes que obtiveram na curadoria 98% de identidade e cobertura ao nível de nucleotídeo foram anotados na **tabela 3**.

### 3.6 Análise de genes de resistência a metais pesados

Para identificar genes de resistência a metais pesados nos genomas, foi utilizado ABRicate v1.0.1 (<https://github.com/tseemann/abricate>) juntamente com bancos de dados construídos in house com genes de resistência a metais pesados. Além disso, para genomas de *K. pneumoniae* foi utilizado um banco de dados baseado em genes de resistência a metais pesados contidos no banco de dados *Klebsiella* locus/sequence do Institut Pasteur (<https://bigsd.bpasteur.fr/klebsiella>). Os limites de cobertura e identidade foram definidos em 98% para ambos.

### 3.7 Filogenômica

CSI Phylogeny v1.4 (GARCIA et al., 2020) foi utilizado com configurações padrão para gerar uma árvore filogenética baseada em polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) com os 18 genomas de *K. pneumoniae*, juntamente com outros 20 genomas de isolados *K. pneumoniae* ST258 oriundos da Austrália, Estados Unidos e Uruguai. A sequência cromossômica do isolado de *K. pneumoniae* HS11286 (RefSeq:NC\_016845.1) foi utilizada como genoma de referência.

Genes de resistência a metais pesados dos genomas contidos na árvore filogenética foram identificados utilizando ABRicate conforme descrito acima.

A árvore foi enraizada no ponto médio utilizando iTOL v6, que também foi utilizado para anotar a árvore com os metadados dos isolados e com um heatmap com presença/ausência de genes de resistência a prata, mercúrio, arsênio e telúrio.

### 3.8 Extração de DNA para PCR

Os DNAs genômicos de todos os isolados foram extraídos usando o Kit DNA GenomicPureLink Extraction da Thermo Fisher, seguindo o protocolo do fabricante. A concentração do DNA foi aferida no NanoDrop.

### 3.9 PCR

Foi realizada a técnica de PCR convencional, utilizando *primers* específicos descritos na literatura e alguns desenhados neste estudo. Os primers desenhados neste estudo foram determinados através da ferramenta PrimerBlast do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) e os descritos por Woods et. al. 2009 foram desenhados utilizando o programa Primer3 como descreve os autores.

A amplificação dos genes-alvo foi realizada em reações de 25 µL contendo 100 ng de DNA; tampão de PCR 1X [Tris-HCl (pH 8,4)] (Sinapse), 1,6 mM de MgCl<sub>2</sub> (Sinapse); 0,2 mM de cada dNTP (Sinapse); 0,2 µM de cada *primer* e 1-2,5 U de Taq DNA polimerase (Sinapse). As condições de amplificação foram: 1 ciclo de 94 °C por 2 min, 30 ciclos de 94°C por 30 seg, anelamento com temperatura e tempo específicos como segue a tabela 4, extensão a 72°C por 1 min; e extensão final com 1 ciclo de 72°C por 5 min. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%.

Foi utilizado o marcador de massa molecular de DNA *1kb Plus* (Thermo Fisher Scientific).

Em relação aos primers de Woods *et al.*, foram testados os parâmetros descritos na literatura de referência, porém a temperatura de anelamento foi adaptada.



### 3.9.1 Sequências de *primers* dos genes envolvidos na resistência e tolerância a prata

Para desenhar os primers deste estudo, foram utilizados como base os genes descritos na literatura que estão envolvidos na resistência e tolerância a prata, estes que estão depositados no banco do NCBI, seguindo aa tabela abaixo:

**Tabela 3: Genes do banco de NCBI utilizados como base para o desenho dos Primers.**

GENE	Id (NCBI)	Descrição	Acesso (NCBI)	ESPÉCIE	Tamanho pb	PUBMED link
<i>silA</i>	15486577	Cu(+)/Ag(+) efflux RND transporter permease subunit SilA (WP_004098958.1)	NC_021198.1	<i>K. pneumoniae</i> CG43 (strain: CG43)	3147	<a href="https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23658651/">https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23658651/</a>
<i>silC</i>	39628060	Cu(+)/Ag(+) efflux RND transporter outer membrane channel SilC	NZ_CP035776.1	<i>K. pneumoniae</i> CG43 (strain: CG43)	1543	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25341126">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25341126</a>
<i>silE</i>	2657493	protein coding	NC_005249.1	<i>K. pneumoniae</i> CG43 (strain: CG43)	549	<a href="https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15276215/">https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15276215/</a>
<i>silF</i>	15486578	Cu(+)/Ag(+) efflux RND transporter periplasmic adaptor subunit SilB (WP_004213579.1)	NC_021198.1	<i>K. pneumoniae</i> CG43 (strain: CG43)	363	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25341126">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25341126</a>
<i>silS</i>	40046687	copper/silver sensor histidine kinase SilS	NZ_CP025516.1	<i>K. pneumoniae</i> CG43 (strain: CG43)	1478	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25341126">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25341126</a>

Os oligonucleotídeos que foram utilizados para a confirmação da presença de genes Silver *in vitro* estão apresentados na **Tabela 4**.

**Tabela 4.** Sequência dos *primers* utilizados neste estudo, temperatura de anelamento e tamanho dos primers.

<i>Genes</i>	<i>Sequência (5'-3')</i>	<i>T° de anelamento</i>	<i>Tamanho do primer(pb)</i>	<i>Tamanho do produto (pb)</i>	<i>Referência</i>
<i>silAF</i> (Foward)	GATGCCAATCCTGACCCCAA	59,4°C (30s)	20		Este estudo
<i>silAR</i> (Reverse)	TTACGGGACAATTCCGGGTG	59,4°C (30s)	20	528	Este estudo
<i>silCF</i> (Foward)	CGCCGAAATAGCCAAACGAG	59,4°C (30s)	20		Este estudo
<i>silCR</i> (Reverse)	AGCGTGTTCGGAAACATCCTT	59,4°C (30s)	20	468	Este estudo
<i>silEF</i> (Foward)	AACACCGGTTGTACTIONCCCC	59,4°C (30s)	20		Este estudo
<i>silER</i> (Reverse)	CGGTCATACGAGGAGCAGTC	59,4°C (30s)	20	224	Este estudo
<i>silSF</i> (Foward)	CACCTGCCCTTCGTAATGT	59,4°C (30s)	20		Este estudo
<i>silSR</i> (Reverse)	CCTGCACTCTCCGTGATGT	59,4°C (30s)	20	766	Este estudo
<i>silBF</i> (Foward)	CAAAGAACAGCGCGTGATTA	56,3°C (30s)	20		Woods <i>et al.</i> , 2009
<i>silBR</i> (Reverse)	GSTCAGACATTGCTGGCATA	56,3°C (30s)	20	233	Woods <i>et al.</i> , 2009
<i>silFF</i> (Foward)	CGATATGAATGCTGCCAGTG	55,2°C (30s)	20	224	Woods <i>et al.</i> , 2009
<i>silFR</i> (Reverse)	ATTGCCCTGCTGAATAAACG	55,2°C (30s)	20		Woods <i>et al.</i> , 2009

### 3.9. 2 Árvore Filogenética

Uma árvore filogenética foi gerada para as espécies de *K. pneumoniae*, através do método de verossimilhança máxima com os dados genômicos dos isolados de *K. pneumoniae* que obtiveram um MIC de 256-512 µg/mL (foi encontrado *in silico* os genes envolvidos na tolerância e resistência bacteriana) utilizando as configurações padrão do CSI Phylogeny v1.4. A sequência de cromossomo da cepa de *K. pneumoniae* HS11286 (número de acesso NCBI RefSeq: NC\_016845.1) foi usada como genoma de referência. A árvore foi enraizada no ponto médio utilizando iTOL v6, que também foi usado para anotar a árvore com origem das amostras, ST (sequencia tipo), CC (clonal complex) e genes de resistência a metais pesados.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da determinação da CIM aos metais pesados estudados, e seus genótipos de resistência são apresentados na tabela 3.

**Tabela 5.** Genótipo e fenótipo de resistência aos metais pesados em *K. pneumoniae* estudadas

ID DA CEPA <sup>1</sup>	ORIGEM	Estado	Ano de coleta	ST	GENE DE RESISTÊNCIA AOS METAIS PASADOS	MICs para metais pesados (µg/mL)			
						HgCl <sub>2</sub>	Tecl <sub>4</sub>	AgCl	AsCl <sub>3</sub>
Ec ATCC 25922	Humano	-	2013	73	<i>tehA, tehB, cusA, cusB, cusC, cusR, cusS</i>	2	8	64	2
Ec ATCC 8739	Humano	-	-	3021	<i>arsC, arsB, arsC, arsR, tehA, tehB, silP, silF, silC, silE, cusA, cusB, cusC, cusR, cusS</i>	2	4	512	≤1
Kp ATCC 13883	Humano	-	-	NT	<i>silA, tehA, tehB</i>	≤1	16	512	≤1
Sa ATCC 14028	Humano	-	-	NT	-	≤1	8	32	≤1
Sa 10708	Humano	-	-	NT	-	≤1	8	16	≤1
Sa 6537	Humano	-	-	NT	-	≤1	16	128	≤1
Sa 13076	Humano	-	-	11	<i>tehA, tehB,</i>	2	4	32	≤1
Kp ATCC 700603	Humano	-	-	489	<i>silA tehB, cusF, cusR</i>	16	8	8	512
Kp KP488	Humano	SP/BR	2011	258	<i>silA, silB, silC, silE, silF, silP, silR, silS, arsA, arsB, arsC, arsD, arsR, merC, merR, merT, merP, merA, merD, silG, tehA, tehB</i>	4	≤1	512	≤1
Kp KPHU468	Humano	SP/BR	2015	29	<i>silA, silC, silE, silF, silB, arsB, arsR, arsD, arsH silP cusF</i>	≤1	≤1	128	≤1
Kp 1194	Humano	SP/BR	2011	258	<i>merA, merC, merE, merR, terA, terB, terC, terE, silA, silB, silC, silE, silF, silR, silS</i>	2	64	64	≤1
Kp KPN535	Humano	SP/BR	2011	258	<i>silA, silB, silC, silG silE, silF, silP, silR, silS, merC, merR, merD merT, arsB, arsR, arsD, arsH, tehB, tehA, cusF</i>	2	2	512	4
Kp BL-I-05(3)	Humano	AM/BR	2013	258	<i>merR, silE silR, silS, silP, tehA</i>	2	2	≥512	4
KPC45	Humano	MG/BR	2015	198	<i>merR, merC, arsR, arsC, tehA, tehB</i>	≤1	≤1	64	2
KPBr1	Humano	SP/BR	2003	258	<i>arsA, arsC, merR, arsB, arsD, tehA, tehB</i>	≤1	2	≥512	8

KpHu421	Humano	SP/BR	2012	29	<i>silA, silB, silC, silE, silF, silR, silS, tehA, tehB, cusF</i>	≤1	8	256	≤1
Kp 1ECKPC	Humano	LI/PE	2017	258	<i>silA, silB, silC, silE, silF, silR, silS, silP, tehA, tehB, cusF, arsA, arsB, arsC, arsD, arsR</i>	≤1	≤1	≥512	≤1
Kp KpHu585	Humano	SP/BR	2015	29	<i>silA, silB, silC, silE, silF, silR, silS, silG, arsA, arsB, arsC, arsD, arsR, tehA, tehB, cusF</i>	≤1	≤1	≥512	≤1
Kp KPBL-III-02(1)	Humano	AM/BR	2013	307	<i>silA, silB, silC, silE, silF, silR, silS, silP, silG, arsA, arsB, arsC, arsD, arsR, tehA, tehB, cusF, merA, merC, merD, merE</i>	≤1	≤1	512	≤1
Kp KPBL-III-03(1)	Humano	AM/BR	2013	198	<i>merR, silA, silB, silC, silE, silF, silR, silS, silP, silG, arsA, arsB, arsD, arsH, arsR, tehA, tehB, cusF, merA, merC, merD, merE</i>	≤1	≤1	512	≤1
Kp Kp148	Ambiente aquático	SP/BR	2011	258	<i>silA, silB, silC, silE, silF, silR, silS, silG, silP, arsA, arsB, arsC, arsD, arsR, tehA, tehB, cusF</i>	≤1	≤1	512	≤1
Kp IBL2.4	Ambiente aquático	SP/BR	2013	258	<i>silA, silB, silC, silE, silF, silR, silS, silP, silG, arsA, arsB, arsC, arsD, arsR, tehA, tehB, cusF</i>	≤1	≤1	≥512	≤1
Kp Kp171	Ambiente aquático	SP/BR	2011	258	<i>silA, silB, silC, silE, silF, silR, silS, silP, merR, merC, arsH, tehA, tehB, silP, merT, arsB, arsC, arsD, arsR, cusF</i>	≤1	≤1	≥512	≤1
Kp 606B	Animal de produção	MG/BR	2011	258	<i>silA, silB, silC, silE, silF, silR, silS, merR, merC, tehA, tehB, silP, merT, merP, silG, arsA, arsB, arsC, arsD, arsH, arsR, cusF</i>	≤1	≤1	≥512	≤1
Kp KP76	Animal de companhia	PB/BR	2015	231	<i>merA, merD, merC, merE, tehA</i>	≤1	4	128	≤1
Kp SIC4	Animal de companhia	SP/BR	2017	340	<i>silA, silB, silC, silE, silF, silR, silS, silP, merT, merC, merR, merP, silG, arsA, arsB, arsD, arsR, tehA, tehB, cusF</i>	≤1	≤1	≥512	≤1
Kp S8.3	Animal silvestre	SP/BR	2017	NT	<i>silB, silC, silE, silP, silR, silS, cusS, ausR, cusC, cusF, cusA</i>	≤1	≤1	≥512	≤1
Kp S10	Animal silvestre	SP/BR	2017	11	<i>merA, merC, merD, silA, silB, silC, silE, silF, silR, silS, silP, silG, arsA, arsB, arsC, arsD, arsR, tehA, tehB, cusF</i>	2	16	512	≤1
Kp S7	Animal silvestre	SP/BR	2017	258	<i>silA, silB, silC, silE, silF, silR, silS, tehA, tehB</i>	≤1	2	64	≤1

Kp S3.2	Animal silvestre	SP/BR	2017	11	<i>merA, merC, merD, merE, silA, silB, silC, silE, silF, silR, silS, silP, silG, arsA, arsB, arsD, arsR, tehA, tehB, cusF</i>	≤1	8	256	≤1
Kp AKP	Ambiente doméstico	SP/BR	2017	307	<i>silA, silB, silC, silE, silF, silR, silS, silP, silG, arsA, arsB, arsC, arsD, arsR</i>	≤1	≤1	256	≤1
Kp ALF301	Alimento: Alface	SP/BR	2016	198	<i>tehA, tehB, merC, merA, merD, merE</i>	≤1	16	2	16
Kp RUC232	Alimento: Rúcula	SP/BR	2016	2739	<i>silA, silB, silC, silE, silF, silR, silS, silP, arsA, arsB, arsC, arsD, arsR, tehA, tehB, cusF</i>	≤1	16	4	512
Kp B29	Humano	RN/BR	2010	340	<i>silA, silB, silC, silE, silF, silR, silS, merA, merC, merD, merE, merT, merP, silG, arsA, arsB, arsC, arsD, arsR, cusF, tehA, tehB</i>	4	16	512	1
Kp B35	Humano	MG/BR	2016	11	<i>silA, silB, silC, silE, silF, silR, silS, silP, silG, arsA, arsB, arsC, arsD, arsR, tehA, tehB, cusF</i>	≤1	16	512	≤1
Kp B03	Humano	RS/MG	2013	437	-	≤1	16	512	≤1
Kp B17	Humano	GO/BR	2010	443	<i>arsR, silA, silB, silF, silR, silS, silP, tehA, tehB, cusF</i>	≤1	16	512	≤1
Kp B11	Humano	DF/BR	2016	11	-	4	16	512	≤1
Kp B15	Humano	PR/BR	2016	11	<i>silA, silB, silC, silE, silF, silR, silS, silP, merOperon</i>	≤1	16	512	≤1
Kp B16	Humano	MG/BR	2009	437	<i>silA, silB, silC, silE, silF, silR, silS, silP, silG, arsA, arsB, arsC, arsD, arsR, tehA, tehB, cusF</i>	≤1	8	512	≤1
Kp B30	Humano	PB/BR	2016	437	<i>tehA, tehB</i>	≤1	8	512	≤1

**Legenda-Tabela:** Kp: *Klebsiella pneumoniae*. ST: Sequência tipo, MIC: Concentração inibitória mínima. HgCl<sub>2</sub>: Cloreto de mercúrio, Tecl<sub>4</sub>: Tetracloreto de telúrio, AgCl: Cloreto de prata. AsCl<sub>3</sub>: Cloreto de arsênio.

BR; Brasil, DF: Distrito Federal, GO: Goiás, LI: Lima, MG; Minas Gerais, PB; Paraíba, PR: Paraná, RN; Rio Grande do Norte, RS: Rio Grande do Sul; PB: Paraíba, PR; Paraná, PE; Perú, SP; São Paulo,

**Tabela 6.** Genótipo e fenótipo de resistência aos metais pesados em *E. coli* estudadas

ID DA CEPA <sup>1</sup>	ORIGEM	Estado/ País	Ano de coleta	ST	GENE DE RESISTÊNCIA AOS METAIS PASADOS	MICs para metais pesados (µg/mL)			
						HgCl <sub>2</sub>	Tecl <sub>4</sub>	AgCl	AsCl <sub>3</sub>
Ec HEC01	Humano	SP/BR	2017	117	<i>tehA, tehB, merE, merD, merA, merC, merR, arsB, cusA, cusB, cusF, cusC, cusR, cusS</i>	≤1	2	256	≤1
Ec ICBE79H	Humano	RN/BR	2016	224	<i>tehA, tehB, arsB, arsR, arsC, arsB, cusS, cusA, cusB, cusF, cusC, cusR, cusS</i>	≤1	0	256	≤1
Ec ICBE72H	Humano	RN/BR	2016	101	<i>tehA, tehB, arsC, arsB, arsR, cusS, cusA, cusB, cusC, cusR</i>	≤1	<-1	256	≤1
Ec 278H	Humano	SP/BR	2017	624	<i>silA, silB, silC, silE, silF, silR, sillS, silP, tehA, tehB, merA, merC, merD, merE, merR, cusA, cusB, cusC, cusF, terB, terC, terD, terZ, terW</i>	≤1	8	256	≤1
2Ec 277H	Humano	SP/BR	2017	NT	<i>arsA, arsB, arsR, silR, silS, silB, silP, tehA, tehB, cusB, cusC, cusF, cusA, cusR, cusS</i>	2	8	8	≤1
Ec 14071	Humano	PR/BR	2017	224	<i>tehA, tehB, arsR, arsB, silB, silC, silE, silR, silP, sillS, cusA, cusB, cusC, cusR, cusS</i>	≤1	0	4	≤1
Ec 14462	Humano	PR/BR	2017	NT	<i>silP, silB, silR, silS, arsC, arsB, arsR, merC, merD, merR, cusS, cusR, cusC, cusF, cusA</i>	≤1	2	16	≤1
Ec05	Animal de companhia	AM/BR	2013	6993	<i>cusF, cusA, cusB, cusC</i>	≤1	2	2	≤1
Ec 44924	Animal de companhia	SP/BR	2012	2844	-	≤1	2	2	≤1
Ec ICBE2G2	Animal de companhia	SP/BR	2017	648	<i>tehA, tehB, cusA, cusB, cusC</i>	≤1	2	4	≤1
Ec ICBE2G4	Animal de companhia	SP/BR	2017	648	<i>tehA, tehB, cusA, cusB, cusC</i>	≤1	2	2	≤1
Ec SIC2	Animal de companhia	SP/BR	2017	648	<i>tehA, tehB, cusA, cusB, cusC</i>	≤1	4	4	≥512
Ec SIC1	Animal de companhia	SP/BR	2017	648	<i>tehA, tehB, merE, merR, merD, merA, merC, cusA, cusB, cusC</i>	8	4	4	≥512
Ec 44921	Animal de companhia	SP/BR	2012	457	-	4	4	4	≥512

Ec ICBE2AM	Ambiente aquático	SP/BR	2016	10	<i>tehA, tehB, arsC, arsB, arsR, cusA, cusF, cusC, cusR, cusS</i>	≤1	16	4	≥512
Ec ICBE3AM	Ambiente aquático	SP/BR	2016	46	<i>arsR, arsB, arsC, cusS, cusR, cusC, cusB, cusA, merA, merC, merD, merE</i>	≤1	4	4	16
Ec 34VL	Animal de produção	SP/BR	2014	23	<i>tehA, tehB, arsB, arsR, cusA, cusB, cusC, cusF, cusR, cusS</i>	≤1	16	4	512
Ec 13B	Animal de produção	SP/BR	2014	23	<i>arsB, arsR, merA, merC, merD, merE, merR, cusB, cusC, cusF, cusS, cusR</i>	8	<-1	4	>512
Ec 16VS	Animal de produção	SP/BR	2014	23	-	≤1	8	4	≤1
Ec ECCF1	Alimento	SP/BR	2013	93/-	<i>tehA, tehB, arsR, arsB, arsC, silA, silB, silC, silE, silR, silS, silP, merR, cusA, cusB, cusC, cusF, cusS, cusR</i>	≤1	8	4	512
Ec ICBECPX6	Peixe marinho	SP/BR	2017	10	<i>arsC, arsB, arsR, terB, terC, terD, terZ, terW, tehA, tehB, merA, merC, merD, merE, merR, cusA, cusF, cusC, cusR, cusS</i>	4	16	2	≥512
Ec ECTALHA	Animal silvestre	SP/BR	2017	NT	<i>merA, merD, merE, merR, tehA, tehB, terB, terC, terD, terZ, terW, arsB, arsC, arsR, cusA, cusB, cusC, cusF, cusR, cusS</i>	≤1	32	4	512
Ec 63	Animal silvestre	ÑB/CH	2018	106	<i>tehA, tehB, arsA, cusB, cusC, cusF, cusR,</i>	0	8	4	512
Ec MLT	Humano	CB/BO	2017	1508	<i>tehB, cusC, cusR</i>	0	16	4	16
Ec IB36	Humano	CB/BO	2016	457	<i>tehA, tehB, cusF, cusA, cusB, cusC, cusR</i>	0	8	4	≥512
Ec R-3	Humano	CB/BO	2017	457	<i>tehA, tehB, cusF, cusA, cusB, cusC, cusR</i>	0	32	4	≥512
Ec N1	Humano	ARG	2012	8125	<i>tehA, tehB, arsC, arsB, arsC, arsR, cusA, cusF, cusC, cusS, cusR, merC, merD, merE</i>	8	8	4	512
Ec ESP110	Alimento: Espinafre	SP/BR	2016	4012	<i>arsR, arsB, arsC, tehA, tehB, cusA, cusB, cusF, cusC, cusR, cusS</i>	≤1	16	4	512
Ec REP237	Alimento: Repolho	SP/BR	2016	38	<i>terC, terD, tehA, tehB, cusA, cusB, cusC, cusF</i>	≤1	32	512	16
Ec EM1CRO	Ambiente aquático	SP/BR	2016	457	<i>tehA, tehB, cusA, cusF, cusB, cusC, cusR</i>	≤1	4	8	≤1
Ec ICBE7AM	Ambiente aquático	SP/BR	2016	10	<i>tehA, tehB, arsR, arsB, arsC, silR, silS, silB, silP, cusA, cusB, cusF, cusC, cusR</i>	≤1	8	8	512

Ec ICBE8AM	Ambiente aquático	SP/BR	2016	155	<i>tehA,tehB,silB,silR,silS,silP,arsR,arsB,cusA,cusB, cusF, cusC</i>	≤1	<-1	8	512
Ec ICBE12AM	Ambiente aquático	SP/BR	2016	1284	<i>tehB, tehA,arsR, arsB, arC, cusA,cusB cusF, cusC,cusR,cusS</i>	≤1	4	8	512
Ec ICBEPX8	Peixe marinho	SP/BR	2016	746	<i>tehA, tehB, arsR, arsB, arsC</i>	≤1	32	4	512
Ec 5MCRO	Peixe marinho	SP/BR	2016	38	<i>tehA, tehB, cusA</i>	≤1	4	4	256
Ec MOCRO	Peixe marinho	PB/BR	2016	131	<i>tehA,tehB,</i>	≤1	8	8	32
Ec SIC19	Peixe marinho	PB/BR	2016	NT	-	≤1	<-1	4	128
Ec PBLE39 (5.3mcr)	Peixe marinho	PB/BR	2012	NT	<i>tehA,tehB,arsR,arsB,arsC, merR</i>	8	4	4	128
Ec 40H	Humano	SP/BR	2017	210	<i>tehA,tehB,arsR,arsB, silA, silB, silC, silE, silP, silR, silS</i>	≤1	8	8	512
Ec 50H	Humano	SP/BR	2017	354	-	4	2	2	64
Ec 200H	Humano	SP/BR		3024	<i>silP,silB,silR,silS,tehA,tehB,arsR,arsB,arsC</i>	2	16	8	512
Ec ECPET3	Humano	SP/BR	2017	212	<i>silP,silB,silR,silS,tehA,tehB,arsR,arsB,cusA,cusB,, cusF, cusC,cusR, cusF</i>	4	64	16	512
Ec ECPET11	Humano	SP/BR	2017	744	<i>tehA, tehB, arsR, arsB, arsC, merR, cusA,cusB, cusC cusF, cusR, cusS, merA, merC, merD, merE</i>	16	4	8	512
Ec ECPET13	Humano	SP/BR	2017	212	<i>tehA,tehB,silP,silB,silR,silS,arsR,arsB,arsC,cusA, cusB, cusR cusF, cusC, cusS</i>	2	64	16	512

**Legenda-Tabela:** <sup>1</sup>Ec, *Escherichia coli*. ST: Sequência tipo. CIM: Concentração inibitória mínima. HgCl<sub>2</sub>: Cloreto de mercúrio, Tecl<sub>4</sub>: Tetracloreto de telúrio, AgCl: Cloreto de prata. AsCl<sub>3</sub>: Cloreto de arsênio. BR; Brasil, PB; Paraíba, RN; Rio Grande do Norte, PR; Paraná, AM; Amazonas, SP; São Paulo, ÑB; Ñuble, ARG; Argentina, BO; Bolívia, CB; Cochabamba.



**Tabela 7:** Genótipo e fenótipo de resistência aos metais pesados em *Salmonella spp.* estudadas

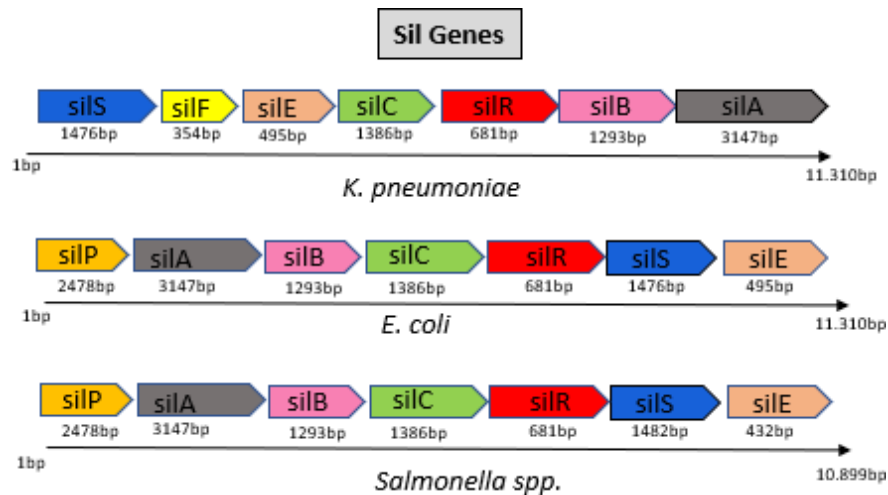
ID DA CEPA <sup>1</sup>	ORIGEM	Estado/ País	Ano de coleta	ST	GENE DE RESISTÊNCIA AOS METAIS PASADOS	CIMs para metais pesados (µg/mL)			
						HgCl <sub>2</sub>	Tecl <sub>4</sub>	AgCl	AsCl <sub>3</sub>
Sa ST018	Alimento Frango de corte	SP/BR	2016	15	<i>tehA, tehB</i>	≤1	4	8	32
Sa ST019	Alimento Frango de corte	SP/BR	2016	NT	<i>tehA, tehB</i>	≤1	4	8	32
Sa ST013	Alimento Frango de corte	PR/BR	2015	19	<i>tehA, tehB, terA, terB, terC, terD, terE, terF, terW, terZ, merA, merC, merD, merE, merR, silR, silB, silS, silP</i>	8	128	8	32
Sa ST014	Alimento Frango de corte	SP/BR	2015	4556	<i>silA, silB, silC, silE, silF, silP, silR, sillS, merA, merC, merD, merR, tehA, tehB</i>	8	4	≥512	32
Sa ST06	Alimento Frango de corte	PR/BR	2015	NT	<i>silR, silS, silB, merR, tehA, tehB, terA, terB, terC, terD, terE, terF</i>	16	64	8	32
Sa ST015	Alimento Estomago de suíno	SP/BR	2015	19	<i>tehA, silS, silR, silB, silP</i>	2	8	8	32
Sa SI05	Alimento carne de frango	SC/BR	2015	32	<i>silP, silE, silB, silC, silR, sillS, tehA, tehB</i>	≤1	4	8	32
Sa SF10	Alimento peito de frango	SP/BR	2016	15	<i>tehA, tehB</i>	16	4	4	4
Sa SF12	Alimento peito de frango	SP/BR	2016	15	<i>tehA, tehB</i>	8	4	8	8
Sa ST2	Alimento Fígado de suíno	PR/BR	2000	11	<i>merC, merD, merE, merR, terA, terB, terC, terD, terE, terF, terW, terZ silS, silR, silB, silP, tehA, tehB</i>	16	16	16	16

Sa STY13	Alimento carne de suíno	PR/BR	2000	19	<i>silB, silR, silS, silP, tehA, tehB, merA, merC, merD, merE, merR, terA, terB, terC, terD, terZ, terW</i>	16	32	8	16
Sa SAL14	Infecção humano	SP/BR	2013	112	<i>merE, tehB, terA, terB, terC, terD, terE, terF, terW, terZ, merR, merT</i>	8	32	8	16
Sa SAL65505	Alimento Carne de frango	MS/BR	2010	3088	<i>tehA</i>	≤1	4	4	16
Sa 67A	Animal: Coruja	MS/BR	2018	32	<i>arsH, merR, tehA, tehB</i>	≤1	4	4	8
Sa 97	Humano	ARG	2014	19	<i>tehA, tehB</i>	≤1	4	4	16

**Legenda- Tabela7:** Sa: *Salmonella spp.* ST: Sequência tipo. CIM: Concentração inibitória mínima. HgCl<sub>2</sub>: Cloreto de mercúrio, TeCl<sub>4</sub>: Tetracloreto de telúrio, AgCl: Cloreto de prata. AsCl<sub>3</sub>: Cloreto de arsênio. BR; Brasil, PR; Paraná, SC; Santa Catarina, MS; Mato Grosso do Sul, SP; São Paulo, ARG; Argentina.

Neste trabalho foi possível identificar nos isolados bacterianos genes de resistências a metais pesados, aparentemente para algumas cepas pode existir uma correlação com CIMs altas que poderia ser interpretado como tolerância. A prata foi o metal para a qual as cepas testadas apresentaram uma maior tolerância. Com relação a isto, o contexto genético do mecanismo de resistência a prata identificado, é apresentado na **Figura 3**.

**Figura 3:** Esquema ilustrativo do contexto genético de genes conferindo resistência à prata.



**Legenda Figura 3:** A disposição dos genes foi predito utilizando análises de nucleotídeos com a ferramenta BlastN e *Map to Reference* usando o software Geneious.

**Fonte:** Este estudo.

O metal prata é altamente tóxico para os microrganismos, porém pode existir uma seleção e adaptação para este composto, decorrente de uma exposição constante ao metal. Estes genes de resistência podem estar presentes no cromossomo, mas é mais comum em plasmídeos (POOLE, 2017; ZHANG *et al.*, 2018).

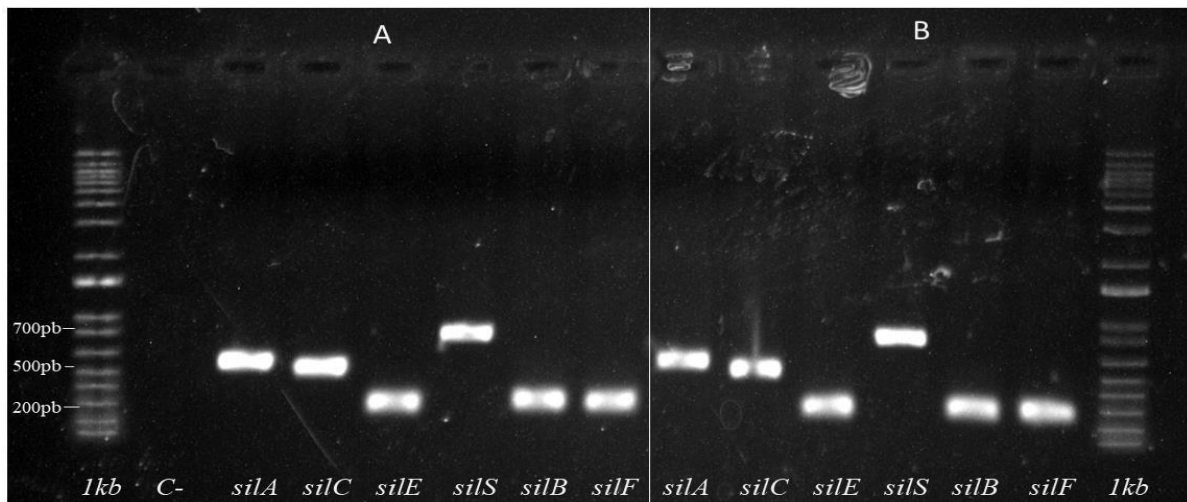
De acordo com os resultados deste estudo as cepas que continham os genes do operon *sil* apresentaram uma CIM de 256-512  $\mu\text{g/mL}$ , o que corrobora os estudos de Randall (2015), no qual as cepas de *E. coli* estudadas que continham o operon *sil* completo apresentaram uma CIM a  $\text{AgNO}_3$  de 256  $\mu\text{g/mL}$ .

Foi possível observar que a *Klebsiella pneumoniae* possui uma maior tolerância ao metal prata com uma concentração CIM em média de 512  $\mu\text{g/mL}$ . Este valor da CIM corrobora os estudos de Bernardo *et al* (2019), onde cepas de *K. pneumoniae* apresentaram CIMs  $\geq 600$   $\mu\text{g/mL}$ . Esta espécie foi predominante em termos de carregar o operon *sil* (*silABCERSF*).

*K. pneumoniae* é um patógeno de importância clínica presente em queimaduras e infecções nosocomiais, é uma Enterobacteria cosmopolita, gram-negativa, ela é responsável por

infecções comunitárias associadas a pneumonia e infecções do trato urinário, está presente em vários ambientes ecológicos, em humanos/animais e até em ambientes naturais como rios poluídos (WOODFORD; TURTON; LIVERMORE, 2011; CERDEIRA, 2019; BEN *et al.*, 2021).

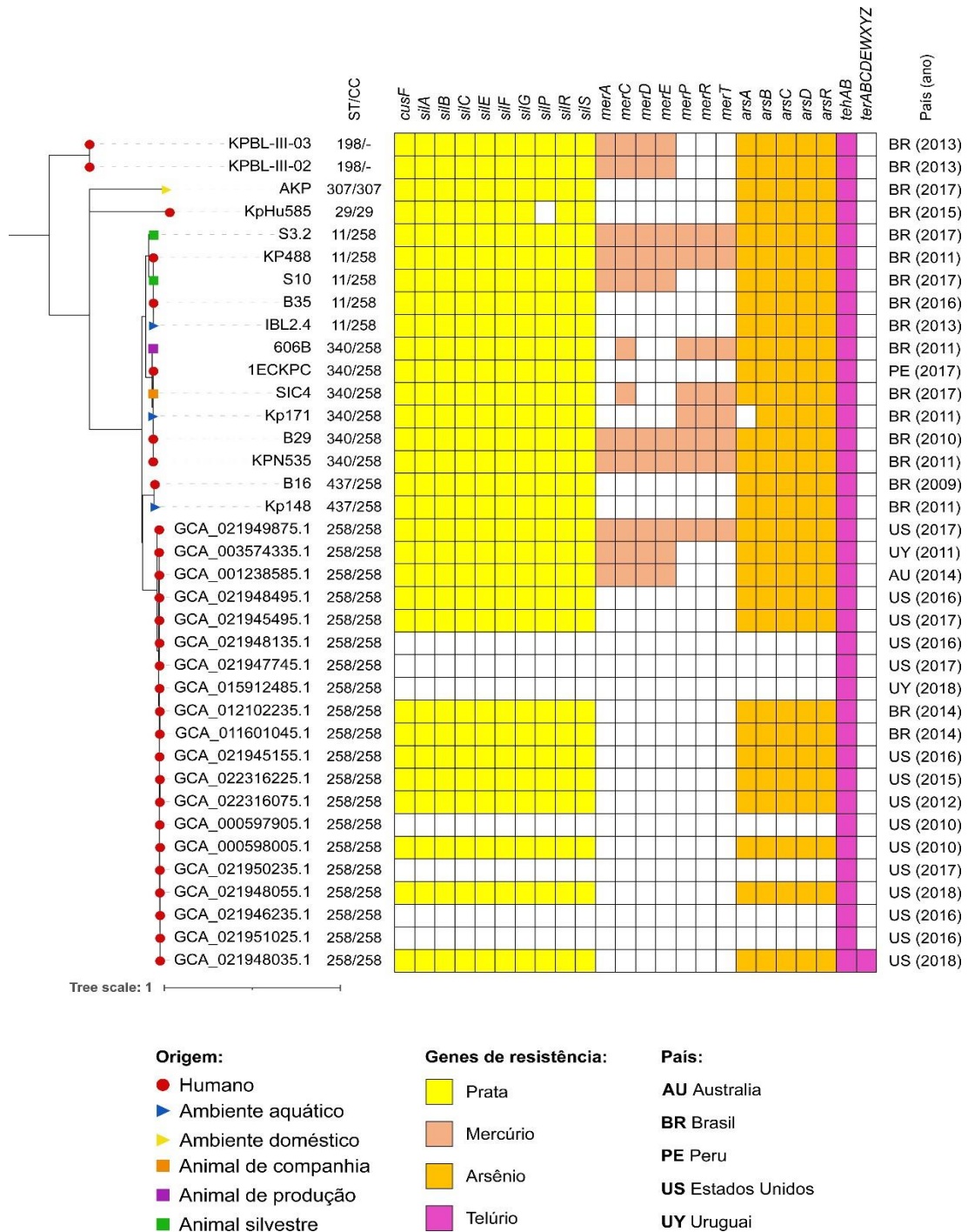
**Figura 4.** PCR com os genes de interesse de Prata. Isolado



**Legenda Figura 4:** **A:** Isolado KPHU568 (ST29) *K. pneumoniae*, **B:** Isolado KPBLIII02 (ST 307)- *K. pneumoniae*. 1kb: Marcador molecular 1kb. C-: Controle negativo.

Fonte: Este estudo.

**Figura 5.** Árvore filogenética com isolados de *Klebsiella pneumoniae*



**Legenda- Figura 5:** Origem das amostras, MLST (tipagem de seqüências multiloco) em colorido representa a presença do gene, em branco a ausência de genes de resistência a metais pesados. 1ST: tipo de seqüência. 2CC: complexo clonal. BR: Brasil, AU: Austrália US: Estados Unidos, UY: Uruguai.

**Fonte:** Este estudo.

Na análise filogenômica como é possível observar na **Figura 5**, 76,07% do genoma de referência foi coberto por todos os genomas analisados, correspondendo a 4.057.511 posições. A contagem de SNP entre os genomas variou entre 6 e 17.748.

Foi construída uma árvore filogenética de 37 isolados de *K. pneumoniae*, 17 utilizadas neste estudo e 20 isolados selecionados do NCBI de *K. pneumoniae* ST258, uma análise *in silico* para comparar uma possível disseminação de genes envolvidos na resistência/tolerância ao metal prata. É possível observar que 81% destes isolados possuem os genes *silABCEFGPRS* que estão envolvidos na resistência/tolerância a prata e *arsABCDR* que estão envolvidos na resistência/tolerância ao arsênio.

A prata é utilizada há anos como um agente antimicrobiano; bactérias resistentes a este metal têm sido isoladas em ambientes clínicos e não clínicos, ela também é utilizada em filtros de água, em tratamentos para água potável e até como algicida para piscinas. Queimaduras e feridas têm sido comumente tratadas com compostos de prata, que também são usados em uma grande variedade de produtos (não) médicos, em infecções de feridas como em curativos contendo prata e em filtros de água, o que interfere na saúde pública pois como observado neste estudo essas cepas que possuem uma maior tolerância a prata, são de amostras humanas (BERNARDO *et al.*, 2019; BEN *et al.*, 2021).

A prata é utilizada com frequência em hospitais e ambulatórios, este metal é classificado como um agente desinfetante eficiente, que pode ser utilizado em vários revestimentos de produtos e aparelhos médicos. A resistência à prata foi recentemente relatada em diversos estudos no qual foi classificado como um problema emergente no gênero Enterobacteriaceae (HANCZVIKKEL *et al.*, 2018).

Neste estudo foi possível observar que as cepas de *K. pneumoniae* com o ST258 tiveram uma maior predominância e alta tolerância a prata com CIM de 64-512 µg/mL em isolados de amostras de humanos, esta cepa é considerada um clone de alto risco, multirresistente que pode causar infecções hospitalares graves associadas à assistência à saúde em todo o mundo, representando uma séria ameaça aos pacientes.

A resistência de alto nível à prata pode evoluir rapidamente como consequência de uma mutação de ponto único no gene *cusS* do sistema de efluxo *cusCFBARS* codificado cromossomicamente ou no gene *silS* do plasmídeo. (, neste estudo foram identificados em alguns isolados os genes *cusABC* e uma maior predominância do *cusF*, no qual foi identificado em 54% dos isolados de *K. pneumoniae* e *E. coli*. O *cusF* é uma proteína periplásmica envolvida no transporte de íons de prata (GARCÍA *et al.*, 2012; RANDALL *et al.*, 2015; HANCZVIKKEL *et al.*, 2018).

De acordo com Hanczvikkel *et al.*, (2018), cepas de *K. pneumoniae* ST258 em recentes estudos mostraram a alta resistência a medicamentos, produzindo a carbapenemase KPC; ela é considerada um patógeno nosocomial em todo o mundo, causando epidemias de proporções nacionais e internacionais, e estes isolados também apresentam uma alta tolerância a metais (cobre, prata e arsênio). Os clones que são multirresistentes e de alto risco de como a *K. pneumoniae* ST258 são capazes de evoluir e transmitir resistência de alto nível à prata.

As nanopartículas de prata (NAg) possuem propriedades físico-químicas únicas e atividade antibacteriana de amplo espectro, esta formulação da prata está presente em muitos produtos da área da saúde. Muitos estudos relatam bactérias resistentes à prata. Como citado anteriormente a resistência à prata catiônica ( $\text{Ag}^+$ ) foi identificada há muitos anos, mas recentemente descobriu-se que a resistência bacteriana ao NAg, a exposição de bactérias a metais pesados tóxicos como a prata pode induzir o surgimento de resistência ou tolerância a antibióticos através do processo de co-seleção (OLIVER *et al.*, 2021).

Em um ambiente aquoso, o NAg pode interagir com o oxigênio molecular ( $\text{O}_2$ ), o que leva à dissolução oxidativa, levando a lixiviação de íons de prata ( $\text{Ag}^+$ ) da nanopartícula, que são cruciais para a atividade antibacteriana do NAg (OLIVER *et al.*, 2021).

As nanopartículas de metal, como as de prata (AgNPs) sintetizadas usando métodos físicos, químicos ou biológicos, possuem atividade antibacteriana promissora, como exemplos nas aplicações em curativos compostos ou hidrogéis para o tratamento de infecções de feridas tópicas. Ao longo de vários anos, um número crescente de estudos foi publicado descrevendo o fenômeno da resistência em espécies bacterianas em resposta a diferentes formas de agentes de prata, incluindo NAg (MULANI *et al.*, 2019; OLIVER *et al.*, 2021).

Para o metal telúrio, uma cepa de *K. pneumoniae* carregando os genes *terABCDEWXY* de resistência, apresentou uma CIM de 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ao telúrio. Duas bactérias que possuem uma CIM de 64-128  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de *Salmonella enterica* foram encontrados os genes *tehA*, *tehB*, *terABCDEF*. Essas bactérias possuem uma variedade de mecanismos de resistência a antimicrobianos como metais pesados que as tornam capazes de tolerar elevadas concentrações destes elementos tóxicos, para a sua sobrevivência elas possuem mecanismos de absorção e adsorção de metais (MALTMAN, 2017; MUNAR; TAKAHASHI e OKAMURA, 2019).

De todas as cepas de *E. coli* estudadas (46), 61% destas cepas possuem o operon *tehAtehB* presente em cromossomo, os CIMs variaram de 4-128  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , este operon medeia a resistência ao telurito de potássio ( $\text{K}_2\text{TeO}_3$ ). Um ambiente redutor de elétrons é necessário para *tehAtehB* mediar altos níveis de resistência ao telurito de potássio. Também pode existir o mecanismo de resistência endógena ao telurito que envolve os processos de tiol

redox, nitrato redutase e superóxido dismutase. Os resultados desse trabalho corrobora com os estudos de Turner, Weiner e Taylor (1995) que também obtiveram CIM em *E. coli* de 128 µg/mL, esta cepa também possuía o operon *tehAB* (CHASTEEN *et al.*, 2009).

Durante os últimos anos, as aplicações de Te nas indústrias eletrônicas, ótica, baterias e de mineração se expandiram, aumentando a contaminação ambiental por este metal, permitindo o isolamento de várias bactérias resistentes ao telúrio de ocorrência natural e da clínica. A resistência ao telúrio está relacionada com a presença de genes e proteínas responsáveis na exclusão ou desintoxicação desse metal, são genes de manutenção como flavoproteínas ligadas à membrana celular e oxidoredutases citosólicas importantes na resistência ao telúrio, susceptibilidade, transporte, ligação, acumulação, influxo/efluxo e redução de íons deste metal (MALTMAN, 2017; MUNAR; TAKAHASHI e OKAMURA, 2019).

Foi possível observar que 24 cepas de *E. coli* tiveram um CIM alto para o metal arsênio de 256-512 µg/mL, destas apenas 18 cepas carregam os genes *arsRB* ou *arsRBC*; a maioria destas amostras são isolados de animais de produção e de peixe marinho. O pescado tem sido reconhecido como a maior fonte de arsênio que possui forma orgânica e inorgânica, sendo a orgânica a mais frequente, a arsenobetaína é a forma orgânica mais abundante em peixes (SILVA, 2016).

O arsênio (As) ocorre de forma natural nos ambientes terrestres e aquáticos, é um produto do intemperismo das rochas e erosão de solos, em fontes antropogênicas estão presentes nas atividades de mineração, no uso de pesticidas e está presente nos alimentos em várias formas químicas, sendo a inorgânica a mais tóxica. Como observado nos resultados houve uma CIM alta nos isolados de animais silvestres e de produção, ressaltando que na área da medicina veterinária o arsênico ainda é utilizado como um agente antiparasitário e como aditivo em ração animal, pois auxilia o crescimento do animal de forma acelerada (SILVA, 2016).

A contaminação por arsênio é um grande problema globalmente, tanto de fontes humanas quanto geológicas, níveis altos de arsênio são encontrados no solo de muitas áreas, a contaminação geológica de terras agrícolas por arsênio é exacerbada pelo uso de água contaminada por este metal na irrigação, o que corrobora com os resultados já que os isolados de animais selvagens e de produção obtiveram um CIM mais alta para o metal As. Fontes de água potável geralmente contêm alguns microgramas de arsênio por litro ou menos, grandes quantidades de arsênio podem ser encontradas em fundições de indústrias, frutos do mar, herbicidas, produtos agrícolas, em munição, ligas e placas de chumbo de baterias elétricas; o arsenito é utilizado na composição de alguns herbicidas e o arsenato é usado em alguns



inseticidas. O arsênio é considerado a toxina ambiental mais prevalente (KLAASEN e WATKINS, 2003).

As bactérias são capazes de absorver contaminantes de arsênio e de convertê-lo em outras formas menos nocivas. Como observado nos resultados foi possível identificar 16 isolados de *Escherichia coli* com os genes que conferem resistência ao arsênico que são *arsBCR* e dessas 7 obtiveram um CIM para arsênico de  $\geq 512$   $\mu\text{g/mL}$ . Os genes envolvidos no processo de desintoxicação do arsênio são encontrados tanto nos plasmídeos quanto nos cromossomos, os genes *ars* são organizados como operons, como *arsRBC* (o mais comum encontrado em *E. coli*), *arsRABC* e *arsRDABC* (EDMUNDSON e HORSFALL, 2015; SÜTTERLIN *et al.*, 2018).

Os resultados da CIM deste trabalho do arsênio corrobora com os estudos de Sütterlin *et al.*, (2018), no qual todas as cepas com CIMs de arsenito de sódio foi de 128  $\mu\text{g/mL}$ , carregando o operon cromossômico *arsRBC* ou *arsRDABC*; *arsB* é a proteína repressora do operon, o mecanismo de resistência ao arsênio nativo de *E. coli* é codificado em um operon que contém os genes *arsRDABC* (SÜTTERLIN *et al.*, 2018).

É possível observar nos resultados que 23 cepas possuem uma CIM de 64-512  $\mu\text{g/mL}$  ao cloreto de arsênio, porém não foi encontrado o operon *ars in silico*, é possível que haja outros genes envolvidos nessa resistência, a mesma situação ocorreu para a resistência a prata em alguns isolados de *E. coli* e *Salmonella*.

Em relação ao mercúrio nas bactérias Gram-negativas, a resistência a este metal necessita da presença do operon *merRTPADE*. 19 isolados deste estudo tiveram uma CIM de 4-16  $\mu\text{g/mL}$ , dessas 10 isolados possuem o *merR*; em algumas cepas há a presença dos genes *merR*, *merC* e *merT*. O gene *merR* foi predominante nestas cepas estudadas, este gene é responsável por codificar uma proteína regulatória dos íons de mercúrio que tem a maior seletividade destes íons, a maior prevalência deste foi em amostras de humano. Foi encontrado em um isolado de *Salmonella spp.* os genes *merRET*, esta cepa teve um CIM de mercúrio de 8  $\mu\text{g/mL}$ , o *merT* codifica um sistema de captação de íons  $\text{H}^+$ , o *merE* não tem função conhecida, porém alguns estudos citam que este gene pode ter função de transporte de íons. Estudos de Azam *et al.*, (2018) teve uma CIM de 7,8  $\mu\text{g/mL}$  ao cloreto de mercúrio em isolados de *E. coli*, corroborando com os resultados deste estudo (CHIOU, 2015; AZAN, 2018).

Nos microrganismos, a resistência à maioria dos metais normalmente ocorre por efluxo, a fim de remover metais do citoplasma e sequestro extracelular do contaminante. O metal mercúrio é usado na produção de cloro e soda cáustica, amálgamas dentárias, fungicidas (na preservação de plásticos, madeira e papel), em aparelhos de hospitais (termômetros,

barômetros, esfigmomanômetros), em tintas em preparações farmacêuticas e óleos lubrificantes (KRASTANOV *et al.*, 2013; POOLE, 2017; ZHANG *et al.*, 2018).

Espécies bacterianas resistentes podem sobreviver em ambientes contaminados com metais pesados e outros compostos, como a *K. pneumoniae* e *E. coli* que são Enterobacterales ou seja são bacilos Gram-negativos, da família Enterobacteriaceae, estas cepas são patogênicas e podem causar infecções oportunistas em pacientes internados em hospitais ou imunocomprometidos, elas se localizam em tratos respiratórios e em vias urinárias (GAYLARDE *et al.*, 2005; CERDEIRA, 2019).

A resistência a metais está relacionada a mecanismos especializados, como a internalização do metal, alguns microrganismos exibem uma ou mais combinações de mecanismos de resistência, mas o principal mecanismo que regula as concentrações intracelulares de metal está relacionado ao transporte de membrana, que podem estar envolvidos com bombas de efluxo (DOPSON e HOLMES, 2014).

A bomba de efluxo, conhecida também como sistemas de transporte ativo, é o maior sistema de resistência a metais, podem estar em plasmídeos ou cromossomos. Por meio de sistemas de transporte de nutrientes e alguns metais não essenciais que podem entrar na célula, eles são rapidamente exportados do citoplasma através dessas bombas de efluxo e ajudam a evitar danos aos componentes celulares (IMFELD, G. e VUILLEUMIER, 2012; NEETA; MAANSI; HARPREET, 2016).

Os metais pesados são elementos químicos altamente reativos e bio-acumulativos, ou seja, acumulam-se com o tempo no organismo que é incapaz de eliminá-los; neste projeto foi estudado experimentalmente cloretos dos metais prata, arsênico, telúrio e mercúrio, estes que têm sido utilizados como agentes antibacterianos desde os primórdios, a prata (Ag) têm sido utilizados para manter a qualidade em água potável armazenada, vários sais metálicos, como mercúrio (Hg), telúrio (Te) e arsênico (As) eram utilizados no tratamento de doenças infecciosas como hanseníase, tuberculose, gonorreia e sífilis. Mais recentemente, metais como a prata tornaram-se amplamente utilizados em vários produtos e desinfetantes, que são usados regularmente em hospitais, indústrias e outros locais para higienização (DOPSON e HOLMES, 2014).

Em relação ao herbicida glifosato foi possível fazer a análise fenotípica de 54 isolados e genotípica de 90 cepas (dados na **tabela 8** suplementar em anexo). Neste estudo não foi possível fazer a relação entre o experimento de bancada com os dados *in silico* com este herbicida, já que os isolados tiveram uma média de CIM de 437-935 µg/mL com estudos de Gly puro (SIGMA) e um CIM de 1875-7500 µg/mL com o Glifosato da BioCarb (1%), diferente

dos estudos de Bote *et al.*, (2019) que observaram valores de CIM para *E.coli* que variaram de 1250 á 20.000  $\mu\text{g/mL}$  para GLY e 20.000 a 80.000  $\mu\text{g/mL}$  para glifosato com a formulação de sal.

O glifosato é o herbicida mais utilizado em todo o mundo, tem alta toxicidade, é utilizado para matar ervas daninhas em produções agrícolas; porém não há padrões estipulados no estudo de resistência a esse composto em microrganismos que infere a importância de novos estudos neste tema tão importante que engloba a saúde única. Em relação ao genes encontrados *in silico*, 31 cepas apresentam pelo menos 1 gene do operon *phnC-P* (composto por 14 genes), destas apenas 7 possuem 10 á 14 genes do operon estas que obtiveram uma CIM de 312,5  $\mu\text{g/mL}$  (Gly puro-SIGMA) e 3750  $\mu\text{g/mL}$  (Glifosato 1%-BioCarb).

Estudos identificaram a via bioquímica responsável pela transformação do fósforo do glifosato, que é uma fonte de fósforo útil para microrganismos, os genes *phnC-P* codificam as enzimas para essa via, estão amplamente difundidos entre as espécies bacterianas. Também foi identificado o gene *aroA* em 21 cepas de *E. coli* e 16 cepas de *Salmonella spp.* e em nenhum isolado de *K. pneumoniae*, a atividade da 5-enolpiruvilchiquimato 3-fosfato sintase da via do glifosato (codificada por *aroA*) de muitas espécies bacterianas é insensível ao glifosato. De acordo com novos estudos há outros genes envolvidos na tolerância ao glifosato que ainda estão sendo estudados e identificados. (SUN *et al.*, 2005; JENSEN, ZECHEL e JOCHIMSEN, 2014).

## 5. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi possível identificar e avaliar cepas bacterianas com uma tolerância aos metais, estas que carregam genes de resistência/tolerância a metais pesados altamente tóxicos, com uma maior predominância de genes de resistência ao metal prata, que corroborou com os testes fenotípicos. Uma limitação do estudo tem sido a dificuldade para definir uma cepa como resistente ao metal, uma vez que não existem critérios definidos e padronizados internacionalmente. Essa área de resistência a metais pesados e agrotóxicos necessita de mais estudos e protocolos padronizados para o auxílio de novas pesquisas, é de extrema importância esse tema na abordagem de Saúde Única no qual proporciona um melhor entendimento das comunidades microbianas em diversos ambientes, inclusive na área de bioindicadores e biorremediação, é algo promissor e inovador para o nosso futuro.

Foi possível padronizar a técnica de PCR com os genes de interesse envolvidos na tolerância a prata e foi montado um banco de dados curado manualmente para o desenvolvimento deste projeto.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AZAM, Mudsser *et al.*, Estudo da resistência a pandrogas e metais pesados entre *E. coli* do trecho do rio Yamuna em Delhi, com influência antropogênica. **Braz. J. Microbiol.** , São Paulo, v. 49, n. 3, pág. 471-480, setembro de 2018. Disponível em <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S15173822018000300471&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S15173822018000300471&lng=en&nrm=iso)>. acesso em 04 de março de 2021. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.11.001>.
- BEN *et al.* Report of cross resistance to silver and antibiotics in *Klebsiella pneumoniae* isolated from patients and polluted water in Tunisia. **Water and Environment Journal**. <https://doi.org/10.1111/wej.12665>.2021.
- BERNARDO, E. Mazariegos *et al.* Silver nanoparticles from *Justicia spicigera* and their antimicrobial potentialities in the biocontrol of foodborne bacteria and phytopathogenic fungi. **Rev Argent Microbiol**. 2019. doi: 10.1016/j.ram.2018.05.002
- BOTE, K. *et al.* Concentração inibitória mínima de glifosato e de uma formulação de herbicida contendo glifosato para isolados de *Escherichia coli* - diferenças entre isolados patogênicos e não patogênicos e entre espécies hospedeiras. **Front Microbiol** . 2019; 10: 932. 2019. doi: 10.3389 / fmicb.2019.00932.
- CHASTEEN G. Thomas; FUENTES E. Derie; TANTALEÁN C. Juan; VÁSQUEZ C. Claudio. Tellurite: história, estresse oxidativo e mecanismos moleculares de resistência, **FEMS Microbiology Reviews** , Volume 33. Pages 820-832. 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00177.x>
- CERDEIRA, Louise Teixeira. Comparative analysis of *Klebsiella pneumoniae* belonging to the endemic high-risk clonal group CG258. 2019. **Tese** (Doutorado em Análises Clínicas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019. doi:10.11606/T.9.2019.tde-26082019-103040. Acesso em: 2020-04-27.
- CHIOU, C. *et al.* Chromosome-mediated multidrug resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhi. **Antimicrob Agents Chemother**.2015.. doi: 10.1128/AAC.04081-14
- CHITAMBAR, C. R. Medical applications and toxicities of gallium compounds. **Environ Res Public Health**. ed7, 2337–2361. 2010. doi: 10.3390/ijerph7052337
- COLIN, V. L. *et al.* Production of bioemulsifiers by *Amycolatopsis tucumanensis* DSM 45259 and their potential application in remediation technologies for soils contaminated with hexavalent chromium. **Journal of Hazardous Materials**. Amsterdam, v. 261, p. 577– 583. 2013. doi: 10.1016/j.jhazmat.2013.08.005
- CONGEEVARAM, S. *et al.* Biosorption of chromium and nickel by heavy metal resistant fungal and bacterial isolates. **Journal of Hazardous Materials**. Amsterdam, v. 146, p. 270-277. 2007. doi: 10.1016/j.jhazmat.2006.12.017
- DOPSON M. and HOLMES D. S. Metal resistance in acidophilic microorganisms and its significance for biotechnologies. **Appl. Microbiol. Biotechnol**. v.98, p.8133–8144. 2014. doi: 10.1007/s00253-014-5982-2

- DAKAL, T. C. *et al.* Mechanistic basis of antimicrobial actions of silver nanoparticles. *Front. Microbiol.* 7:1831. 2016. doi: 10.3389/fmicb.2016.01831
- EDMUNDSON Matthew Charles, HORSFALL Louise. Construction of a Modular Arsenic-Resistance Operon in *E. coli* and the Production of Arsenic Nanoparticles. **JOURNAL Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**. Vol.3. 2015. doi:10.3389/fbioe.2015.00160. 2015.
- FERNANDES *et al.* Identification and genomic features of halotolerant extended-spectrum- $\beta$ -lactamase (CTX-M)-producing *Escherichia coli* in urban-impacted coastal waters, Southeast Brazil, Marine Pollution Bulletin, Vol.150. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.110689>.
- GARCÍA, Fernández A. *et al.* *Klebsiella pneumoniae* ST258 producing KPC-3 identified in Italy carries novel plasmids and OmpK36/OmpK35 porin variants. **Antimicrob Agents Chemother.** 2012. doi: 10.1128/AAC.05308-11. Epub 2012 Jan 17. PMID: 22252815; PMCID: PMC3318348.
- Garcia *et al.* *In Vivo* High Plasticity of Multi-Drug Resistant ST258 *Klebsiella pneumoniae*. *Microb Drug Resist.* 2021 Aug;27(8):1126-1130. doi: 10.1089/mdr.2020.0310. Epub 2020 Dec 4. PMID: 33275861.
- GAYLARD, C. C.; BELLINASSO, M. L.; MANFIO, G. P. Biorremediação. Aspectos biológicos e técnicas da biorremediação de xenobióticos. **Biociência**. Brasília, n. 3, p. 36-43, 2005.
- HANCZVIKKEI *et al.* Transmissible silver resistance readily evolves in high-risk clone isolates of *Klebsiella pneumoniae*, *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica AMicr*, 65(3), 387-403. 2018. <https://akjournals.com/view/journals/030/65/3/article-p387.xml>
- IMFELD, Gwenaël; VUILLEUMIER, Stéphane. Measuring the effects of pesticides on bacterial communities in soil: A critical review, **European Journal of Soil Biology**. Volume 49. Pages 22-30, ISSN 1164-5563. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2011.11.010>.
- JENSEN, B. Hove; ZECHEL D.L.; JOCHIMSEN B. Utilization of glyphosate as phosphate source: biochemistry and genetics of bacterial carbon-phosphorus lyase. **Microbiol Mol Biol Rev.** 2014;78(1):176-197. doi:10.1128/MMBR.00040-13
- KĘDZIORA, A. *et al.* Consequences of Long-Term Bacteria's Exposure To Silver Nanoformulations With Different PhysicoChemical Properties. *Int J Nanomedicine*. 2020. <https://doi.org/10.2147/IJN.S208838>
- KOMÁREK, M., VANEK, A. e ETTLER, V. Chemical stabilization of metals and arsenic in contaminated soils using oxides – review. **Environmental Pollution**, 172, p.9-22. 2013. doi: 10.1016/j.envpol.2012.07.045
- KRASTANOV, A.; ALEXIEVA, Z.; YEMENDZHIEV, H. Microbial degradation of phenol and phenolic derivatives. **Engineering in Life Sciences**, Weinheim, v. 13, n.1, p. 76-87, 2013. doi: 10.1002/elsc.201100227

MALTMAN, Chris *et al.* Tellurite and Tellurate Reduction by the Aerobic Anoxygenic Phototroph *Erythromonas* *ur* *sincola*, Strain KR99 Is Carried out by a Novel Membrane Associated Enzyme. **Microorganisms** vol.5,2 20. 19 Apr. 2017, doi:10.3390/microorganisms5020020

MARCO, S. O. Felipe *et al.* Detecção de genes relacionados à resistência a nanopartículas de prata em bactérias de infecções endodônticas secundárias ", **Journal of Nanomaterials**. ID 8742975. 2019 . <https://doi.org/10.1155/2019/8742975>

MARTINS, A. *et al.* First detection of *Pseudomonas aeruginosa* ST2963 from hospital effluent: A draft genome analysis. **J Glob Antimicrob Resist.** v14:275-276. 2018. doi: 10.1016/j.jgar.2018.07.007

MULANI M. S. *et al.* Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. *Front Microbiol.* 2019;10:539. 2019. doi:10.3389/fmicb.2019.00539

MUNAR, MP, TAKAHASHI, H.; OKAMURA, Y. Discovery of a Novel Gene Conferring Tellurite Tolerance Through Tellurite Reduction to *Escherichia coli* Transformant in Marine Sediment Metagenomic Library. **Mar Biotechnol** 21, 762–772 <https://doi.org/10.1007/s10126-019-09922-w>. 2019.

NEETA, B.; MAANSI, V.; HARPREET, S. B. Characterization of heavy metal (cadmium and nickel) tolerant Gram-negative enteric bacteria from polluted Yamuna River, Delhi. **African Journal of Microbiology Research**, v. 10, n. 5, p. 127–137, 2016. <https://doi.org/10.5897/AJMR2015.7769>

OLIVER *et al.* Emerging Concern for Silver Nanoparticle Resistance in *Acinetobacter baumannii* and Other Bacteria. *Frontiers in Microbiology*. v12. Escola de Engenharia Química, University of New South Wales, Sydney, NSW, Austrália. 2021. 10.3389/fmicb.2021.652863.

OROZCO, S. *et al.* Mechanisms of Resistance to Silver Nanoparticles in Endodontic Bacteria: A Literature Review. Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Facultad de Estomatología, San Luis Potosí, SLP, Mexico. **Journal of Nanomaterials**. Vol 1. 2019. doi: 10.1155/2019/7630316

PIGNATI, *et al.* **Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil:** uma ferramenta para a Vigilância em Saúde. Programa de Pós Graduação em Saúde Coletiva, Instituto de Saúde Coletiva. Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT). Cuiabá MT Brasil. Núcleo de Estudos Ambientais e Saúde do Trabalhador, Instituto de Saúde Coletiva, UFMT. 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/1413-812320172210.17742017>

POOLE, K. At the nexus of antibiotics and metals: the impact of Cu and Zn on antibiotic activity and resistance. **Trends in Microbiology**, vol. 25, no. 10, pp. 820–832, 2017. doi: 10.1016/j.tim.2017.04.010

RANDALL C.P. *et al.* Silver resistance in Gram-negative bacteria: a dissection of endogenous and exogenous mechanisms. **J Antimicrob Chemother.** 2015;70(4):1037-1046. doi:10.1093/jac/dku523.

SILVA A. Carlos. Teores de arsênio, cádmio e chumbo em peixes marinhos comercializados em Maceió, AL, Aracaju, SE, Salvador, BA, Brasi. 26 p. II. **Boletim de Pesquisa**. Embrapa Tabuleiros Costeiros, ISSN 1678-1961, 118.2016.

SUN, Yi-Cheng *et al.* Novel *aroA* with High Tolerance to Glyphosate, Encoded by a Gene of *Pseudomonas putida* 4G-1 Isolated from an Extremely Polluted Environment in China Applied and Environmental Microbiology. **American Society for Microbiology**. 2005. doi: 10.1128/AEM.71.8.4771-4776.200.

SÜTTERLIN, Susanne *et al.* Heavy Metal Susceptibility of *Escherichia coli* Isolated from Urine Samples from Sweden, Germany, and Spain. **Agentes antimicrobianos e quimioterapia**. vol. 62,5 e00209-18. 26 de abril de 2018. doi: 10.1128 / AAC.00209-18.

TALAPKO, J. *et al.* (Antibacterial 586 activity of silver and its application in dentistry, cardiology and dermatology. *Microorganisms* 587 8(9). doi: 10.3390/microorganisms8091400. 2020.

TURNER R. J.; WEINER J. H.; TAYLOR D. E. The tellurite-resistance determinants *tehA* and *klaA* have different biochemical requirements. **Microbiology** (Reading). 141 ( Pt 12):3133-40. 1995. doi: 10.1099/13500872-141-12-3133

WANG Y. *et al.* Influence of soil heavy metals pollution on soil microbial biomass, enzyme activity, and community composition near a copper smelter. **Ecotoxicol Environ Saf**. 67(1):75-81. 2007. doi: 10.1016/j.ecoenv.2006.03.007.

WIEGAND I.; HILPERT K.; HANCOCK R. E. Métodos de diluição em ágar e caldo para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de substâncias antimicrobianas. 2008. *Nat. Protocolo*. 3 163–175. 10.1038 / nprot.2007.521

WOODFORD, N.; TURTON. J.F Livermore, D.M. Multiresistant gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. **FEMS. Microbiol. Rev**. 35, 736-755.2011. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00268.x

WYCK, S. *et al.* Oxidative stress in sperm affects the epigenetic reprogramming in early embryonic development. **Epigenetics Chromatin**. p60. 2018. doi: 10.1186/s13072-018-0224-y

ZHANG, Z. *et al.* Anammox granules show strong resistance to engineered silver nanoparticles during long-term exposure, **Bioresource Technology**, vol. 259, pp. 10–17. 2018. doi: 10.1016/j.biortech.2018.03.024

## ANEXOS

**Tabela 8.** Genótipo e fenótipo de resistência ao herbicida Glifosato nas Enterobacterales estudadas

ID	Origem	GENES de Resistência ao Glifosato	CIM Glifosato SIGMA (15 mg/mL)	CIM Glifosato Biocarb 10 mg/mL
Ec ATCC 25922	Humano	-	312	1875
Ec ATCC 8739	Humano	<i>aroA, phnFGHJKLMN</i>	312	1875
Kp ATCC 13883	Humano	-	312	1875
Sa ATCC 14028	Humano	-	312	1875
Sa 10708	Humano	-	312	1875
Sa 6537	Humano	-	312	1875
Sa 13076	Humano	<i>aroA</i>	312	1875
Kp ATCC 700603	Humano	-	312	1875
Kp KP488	Humano	-	312	1875
Kp KPHU468	Humano	-	625	3750
Kp 1194	Humano	-	312	1875
Kp KPN535	Humano	-	312	3750
Kp KPC45	Humano	-	312	1875
Kp KPBr1	Humano	-	312	1875
Kp KpHu421	Humano	-	312	3750
Kp 1ECKPC	Humano	-	312	3750
Kp KpHu585	Humano	-	625	7500
Kp KPBL-III-02(1)	Humano	-	312	7500
Kp KPBL-III-03(1)	Humano	-	312	7500
Kp Kp148	Ambiente aquático	-	-	-
Kp IBL2.4	Ambiente aquático	-	-	7500
Kp Kp171	Ambiente aquático	-	625	7500
Kp 606B	Animal de produção	-	625	7500
Kp KP76	Animal de companhia	-	625	7500
Kp SIC4	Animal de companhia	-	625	7500
Kp S8.3	Animal silvestre	<i>phnCDFGHIJKLMNOP</i>	1250	7500
Kp S10	Animal silvestre	-	1250	7500
Kp S7	Animal silvestre	-	1250	7500
Kp S3.2	Animal silvestre	-	1250	7500



Kp AKP	Ambiente doméstico	-	1250	7500
Ec HEC01	Humano	-	1250	7500
Ec ICBEC79H	Humano	<i>aroA, phnK</i>	625	7500
Ec ICBEC72H	Humano	<i>aroA, phnDk</i>	625	3750
Ec 278H	Humano	<i>phnE</i>	312,5	3750
Ec 277H	Humano	<i>aroA, phnJ</i>	312,5	3750
Ec 14071	Humano	<i>aroA, phnK</i>	312,5	3750
Ec 14462	Humano	<i>aroA, phnCDFGHIJKLMNOP</i>	312,5	3750
Ec Ec05	Animal de companhia	<i>aroA, phnCDFGHIJKL</i>	312,5	3750
Ec 44924	Animal de companhia	-	312,5	3750
Ec ICBECG2	Animal de companhia	<i>aroA, phnE</i>	312,5	3750
Ec ICBECG4	Animal de companhia	<i>aroA, phnE</i>	312,5	3750
Ec SIC2	Animal de companhia	<i>aroA, phnE</i>	-	3750
Ec SIC1	Animal de companhia	<i>aroA, phnE</i>	625	3750
Ec 44921	Animal de companhia	-	312,5	3750
Ec ICBEC2AM	Ambiente aquático	-	625	58
Ec ICBEC3AM	Ambiente aquático	<i>aroA</i>	1250	7500
Ec 34VL	Animal de produção	<i>aroA, phnL</i>	312,5	7500
Ec 13B	Animal de produção	<i>aroA, phnDL</i>	78	7500
Ec 16VS	Animal de produção	-	312,5	7500
Ec ECCF1	Alimento	<i>aroA, phnFGHIJKLMNOP</i>	312,5	7500
Ec ICBECPX6	Peixe marinho	<i>aroA, phnCDFGHIJKLMNOP</i>	312,5	3750
Ec ECTALHA	Animal silvestre	<i>aroA</i>	312,5	3750
Ec 67B	Animal silvestre	<i>aroA</i>	312,5	3750
Ec 63	Animal silvestre	-	312,5	7500

Ec MLT	Humano	-	-	-
Ec IB36	Humano	-	-	-
Ec R-3	Humano	-	-	-
Ec N1	Humano	<i>aroA</i> , <i>phnCDFGHIJKLMN</i> <i>OP</i>	-	-
Sa ST018	Alimento Frango de corte	<i>aroA</i>	-	-
Sa ST019	Alimento Frango de corte	<i>aroA</i>	-	-
Sa ST013	Alimento Frango de corte	<i>aroA</i>	-	-
Sa ST014	Alimento Frango de corte	<i>aroA</i>	-	-
Sa ST06	Alimento Frango de corte	<i>aroA</i>	-	-
Sa ST015	Alimento Estomago de suíno	<i>aroA</i>	-	-
Sa SI05	Alimento carne de frango	<i>aroA</i>	-	-
Sa SF10	Alimento peito de frango	<i>aroA</i>	-	-
Sa SF12	Alimento peito de frango	<i>aroA</i>	-	-
Sa ST2	Alimento Fígado de suíno	<i>aroA</i>	-	-
Sa STY13	Alimento carne de suíno	<i>aroA</i>	-	-
Sa SAL14	Infecção humano	<i>aroA</i>	-	-
Sa SAL65505	Alimento Carne de frango	<i>aroA</i>	-	-
Sa 67A	Animal: Coruja	<i>aroA</i>	-	-
Sa 97	Humano	<i>aroA</i>	-	-
Kp ALF301	Alimento: Alface	-	-	-

Kp RUC232	Alimento: Rúcula	-	-	-
Ec ESP110	Alimento: Espinafre	<i>aroA,</i> <i>phnDFGHIJKLMN</i> <i>OP</i>	-	-
Ec REP237	Alimento: Repolho	<i>aroA, phnE</i>	-	-
Kp B29	Humano	-	-	-
Kp B35	Humano	-	-	-
Kp B03	Humano	-	-	-
Kp B17	Humano	-	-	-
Kp B11	Humano	-	-	-
Kp B15	Humano	-	-	-
Kp B16	Humano	-	-	-
Kp B30	Humano	-	-	-
Ec EM1CRO	Ambiente aquático	<i>phnE</i>	-	-
Ec ICBEC7AM	Ambiente aquático	<i>aroA,</i>	-	-
Ec ICBEC8AM	Ambiente aquático	<i>aroA</i>	-	-
Ec ICBEC12AM	Ambiente aquático	<i>aroA</i>	-	-

**Legenda-Tabela 4:** <sup>1</sup>Ec, *Escherichia coli*, Kp: *Klebsiella pneumoniae*, Sa: *Salmonella spp.*

**Tabela 9.** Genótipo e fenótipo de resistência aos metais pesados em *K. pneumoniae* estudadas

ID DA CEPA <sup>1</sup>	ORIGEM	ST	GENE DE RESISTÊNCIA AOS METAIS PASADOS	GENE DE RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS	Referência
Kp ATCC 700603	Humano	489	<i>silA tehB, cusF, cusR</i>	<i>fosA6, mph(A), aac(6')-Ib-cr, bla<sub>OXA-1</sub>, catB3, sul1, dfrA14, aph(3'')-Ia, bla<sub>CTX-M-15</sub>, bla<sub>KPC-2</sub>, bla<sub>SHV-182</sub>, aac(3)-IId, gyrA S83I, parC S80I, oqxB, oqxA, bla<sub>OKP-B-7</sub>, foaA, oqxA, oqxB</i>	Elliot <i>et al.</i> , 2016
Kp KP488	Humano	258	<i>silA, silB, silC, silE, silF, silP, silR, sillS, arsA, arsB, arsC, arsD, arsR, merC, merR, merT, merP, merA, merD, silG, tehA, tehB</i>	<i>aacA4, aac(3)-IIa, bla<sub>KPC-2</sub>, bla<sub>SHV-11</sub>, bla<sub>TEM-1B</sub>, bla<sub>OXA-2</sub>, fosA, oqxA, oqxB, catA1, dfrA30, sul1.</i>	Cerdeira <i>et al.</i> , 2018
Kp KPHU468	Humano	29	<i>silA, silC, silE, silF, silB, arsB, arsR, arsD, arsH silP cusF</i>	<i>aac(6')Ib-cr, aac(3)-IIa, aph(6)-Id, aph(3'')-Ib, bla<sub>SHV-83</sub>, bla<sub>TEM-1B</sub>, bla<sub>OXA-1</sub>, bla<sub>CTX-M-15</sub>, oqxB, oqxA, qnrB1, fosA, catB4, sul2, tet(A), dfrA14.</i>	Moura <i>et al.</i> , 2017
Kp 1194	Humano	258	<i>merA, merC, merE, merR, terA, terB, terC, terE, silA, silB, silC, silE, silF, silR, sillS</i>	<i>aph(3'')-Ib, aadA1, aac(6')-Ib3, aac(3)-IId, rmtG, aph(6)-ld, aadA2, bla<sub>TEM-1B</sub>, bla<sub>SHV-182</sub>, bla<sub>CTX-M-15</sub>, bla<sub>KPC-2</sub>, bla<sub>OXA-9</sub>, oqxB, oqxA, qnrB19, catA1, ARR-6, sul1, sul2, tet(B), dfrA8, dfrA14, dfrA15.</i>	Cerdeira <i>et al.</i> , 2018
Kp KPN535	Humano	258	<i>silA, silB, silC, silG silE, silF, silP, silR, sillS, merC, merR, merD merT, arsB, arsR, arsD, arsH, tehB, tehA, cusF</i>	<i>aadA1, aph(3')-Via, aph(3')-Ia, aac(3)- IId, aadA2, bla<sub>SHV-11</sub>, bla<sub>KPC-2</sub>, bla<sub>CTX-M-15</sub>, qnrB19, oqxA, fosA, cmLA1, sul3, sul1, dfrA14, dfrA12</i>	Cerdeira <i>et al.</i> , 2018
Kp BL-I-05(3)	Humano	258	<i>merR, silE silR, silS, silP, tehA</i>	<i>aac(6')-Ib-cr, aac(3)-IIa, aph(6)-ld, aph(3'')-Ib, bla<sub>TEM-1B</sub>, bla<sub>SHV-81</sub>, bla<sub>CTX-M163</sub>, bla<sub>OXA-1</sub>, aac(6')-Ib-cr, oqxB, oqxA, qnrB1, fosA, catB3, catA1, sul2, tet(A), dfrA14.</i>	Não publicado.
KPC45	Humano	198	<i>merR, merC, arsR, arsC, tehA, tehB</i>	<i>bla<sub>CTX-M-15</sub>, bla<sub>SHV-11</sub>, bla<sub>KPC-2</sub>, oqxB, oqxA, fosA, sul2.</i>	Cerdeira <i>et al.</i> , 2018

KPBr1	Humano	258	<i>arsA, arsC, merR, arsB, arsD, tehA, tehB</i>	<i>aph(3')-Via, aadA1, aac(6')-31, blaSHV-110, blaCTX-M-9, blaIMP-1, oqxB, oqxA, fosA, sul1</i>	Lincopan <i>et al.</i> , 2005
KpHu421	Humano (blood)	29	<i>silA, silB, silC, silE, silF, silR, silS, tehA, tehB, cusF</i>	<i>aac(3)-IIa, aac(6')Ib-cr, aph(6)-Id, aph(3'')-Ib, blaCTX-M-15, blaSHV-83, blaTEM-1B, blaOXA-1, oqxB, oqxA, qnrB66, aac(6')Ibcr, fosA, sul2, tet(A), dfrA14.</i>	Não publicado.
Kp 1ECKPC	Humano	258	<i>silA, silB, silC, silE, silF, silR, silS, silP, tehA, tehB, cusF, arsA, arsB, arsC, arsD, arsR</i>	<i>aadA16, aacA4, aadA2, blaTEM-1A, blaSHV11, blaOXA-2, blaKPC-2, aac(6')-Ib-cr, oqxB, oqxA, qnrB52, fosA, mph(A), arr-3, sul1, tet(D), dfrA27</i>	Cerdeira <i>et al.</i> , 2018
Kp KpHu585	Humano	29	<i>silA, silB, silC, silE, silF, silR, silS, silG, arsA, arsB, arsC, arsD, arsR, tehA, tehB, cusF</i>	<i>aac(3)-IIa, aph(6)-Id, aph(3'')-Ib, aac(6')Ib-cr, blaCTX-M-15, blaSHV-83, blaTEM1B, blaOXA-1, oqxB, oqxA, aac(6')Ib-cr, qnrB66, fosA, catB4, sul2, tet(A), dfrA14</i>	Não publicado.
Kp KPBL-III-02(1)	Humano	307	<i>silA, silB, silC, silE, silF, silR, silS, silP, silG, arsA, arsB, arsC, arsD, arsR, tehA, tehB, cusF, merA, merC, merD, merE</i>	<i>aac(6')-Ib-cr, aac(3)-IIa, aph(6)-ld, aph(3'')-Ib, blaTEM-1B, blaSHV-81, blaCTX-M-15, blaOXA-1, oqxB, aac(6')-Ib-cr, qnrB1, oqxA, fosA, catB3, catA1, sul2, tet(A), dfrA14.</i>	Não publicado.
Kp KPBL-III-03(1)	Humano	198	<i>merR, silA, silB, silC, silE, silF, silR, silS, silP, silG, arsA, arsB, arsD, arsH, arsR, tehA, tehB, cusF, merA, merC, merD, merE</i>	<i>aac(6')-Ib-cr, aac(3)-IIa, aph(6)-ld, aph(3'')-Ib, blaTEM-1B, blaSHV-81, blaCTX-M163, blaOXA-1., aac(6')-Ib-cr, oqxB, oqxA, qnrB1, fosA, catB3, catA1, sul2, tet(A), dfrA14.</i>	Não publicado.
Kp Kp148	Ambiente aquático	258	<i>silA, silB, silC, silE, silF, silR, silS, silG, silP, arsA, arsB, arsC, arsD, arsR, tehA, tehB, cusF</i>	<i>aac(6')Ib-cr, aph(3')-Ia, blaSHV-11, blaCTX-M15, blaOXA-1, blaKPC-2, oqxB, oqxA, fosA, mph(A), catB4, catA1, sul1, tet(A), dfrA30</i>	Cerdeira <i>et al.</i> , 2018.
Kp IBL2.4	Ambiente aquático	258	<i>silA, silB, silC, silE, silF, silR, silS, silP, silG, arsA, arsB, arsC, arsD, arsR, tehA, tehB, cusF</i>	<i>blaSHV-11, blaKPC-2, qxA, oqxB, fosA, tet(A), dfrA30.</i>	Não publicado.

Kp Kp171	Ambiente aquático	258	<i>silA, silB, silC, silE, silF, silR, silS, silP, merR, merC, arsH, tehA, tehB, silP, merT, arsB, arsC, arsD, arsR, cusF</i>	<i>aadA2, aac(3)-IId, blaSHV-11, blaTEM-1B, blaKPC-2, blaCTX-M-15, oqxA, oqxB, qnrB2, fosA, catA2, sul1, tet(D)</i>	Cerdeira <i>et al.</i> , 2018.
Kp 606B	Animal de produção	258	<i>silA, silB, silC, silE, silF, silR, silS, merR, merC, tehA, tehB, silP, merT, merP, silG, arsA, arsB, arsC, arsD, arsH, arsR, cusF</i>	<i>aadA2, aac(3)-IId, strA, aph(3')-Ia, aph(6)-Id, blaTEM-1A, blaSHV-11, blaCTX-M-15, qnrS1, oqxB, oqxA, mph(A), catA2, floR, sul1, sul2, tet(A), tet(D), dfrA14, dfrA12</i>	Cerdeira <i>et al.</i> , 2018.
Kp KP76	Animal de companhia	231	<i>merA, merD, merC, merE, tehA</i>	<i>ant(2'')-Ia, aph(3')-Ia, aac(6')Ib-cr, aac(3)-IIa, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, aadA2, aadA1, blaSHV-1, blaTEM-1B, blaOXA-1, blaCTXM-15, oqxB, oqxA, fosA, qnrB1, mph(A), sul2, sul1, catB4, tet(A), dfrA14, dfrA12, dfrA21</i>	Silva <i>et al.</i> , 2018
Kp SIC4	Animal de companhia	340	<i>silA, silB, silC, silE, silF, silR, silS, silP, merT, merC, merR, merP, silG, arsA, arsB, arsD, arsR, tehA, tehB, cusF</i>	<i>aph(3')-Ia, aac(3)-IId, aadA2, blaTEM-1B, blaCTX-M-15, blaSHV-11, qnrB19, oqxB, oqxA, fosA, mph(A), sul1, tet(D), tet(A), dfrA12, dfrA25.</i>	Não publicado.
Kp S8.3	Animal silvestre	617	<i>silB, silC, silE, silP, silR, silS, cusS, ausR, cusC, cusF, cusA</i>	<i>blaCTX-M15</i>	Não publicado.
Kp S10	Animal silvestre	11	<i>merA, merC, merD, silA, silB, silC, silE, silF, silR, silS, silP, silG, arsA, arsB, arsC, arsD, arsR, tehA, tehB, cusF</i>	<i>aacA4, aac(3)-IIa, blaSHV-11, blaTEM-1B, blaOXA-2, blaKPC-2, aac(6')Ib-cr, oqxB, oqxA, fosA, mph(A), catA, sul1.</i>	Não publicado.
Kp S7	Animal silvestre	258	<i>silA, silB, silC, silE, silF, silR, silS, tehA, tehB</i>	<i>aac(3)-IId, aadA2, rmtB, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, blaSHV-11, blaTEM-1B, blaKPC-2, blaCTXM-14, oqxA, oqxB, qnrB19, fosA, erm(42), sul1, sul2, tet(G), dfrA12.</i>	Não publicado.
Kp S3.2	Animal silvestre	11	<i>merA, merC, merD, merE, silA, silB, silC, silE, silF, silR, silS, silP, silG, arsA, arsB, arsD, arsR, tehA, tehB, cusF</i>	<i>aph(3')-Ia, aacA4, blaOXA-2, blaSHV-11, blaKPC-2, blaCTX-M-2, oqxB, oqxA, aac(6')Ibcr, fosA, mph(A), catA1, sul1</i>	Não publicado.
Kp AKP	Ambiente doméstico	307	<i>silA, silB, silC, silE, silF, silR, silS, silP, silG, arsA, arsB, arsC, arsD, arsR</i>	<i>aph(3'')-Ib, aac(6')Ib-cr, aph(6)-Id, blaTEM-1B, blaSHV-28, blaOXA-1, blaCTX-M-15, aac(6')Ib-cr, oqxA,</i>	Não publicado.

				<i>oqxB, qnrB66, fosA, sul2, tet(A), dfrA14.</i>	
Kp ALF301	Alimento: Alface	198	<i>tehA, tehB, merC, merA, merD, merE</i>	<i>bla<sub>CTX-M-15</sub>, bla<sub>OXA-1</sub>, bla<sub>SHV-11</sub>, aac(3)-IIa, aac(6')Ib-cr, oqxA, oqxB, drfA14, catA1, catB3, tet(A), fosA</i>	
Kp RUC232	Alimento: Rúcula	2739	<i>silA, silB, silC, silE, silF, silR, silS, silP, arsA, arsB, arsC, arsD, arsR, tehA, tehB, cusF</i>	<i>bla<sub>CTX-M-15</sub>, bla<sub>OXA-1</sub>, bla<sub>TEM-1B</sub>, bla<sub>SHV-28</sub>, strA, strB, aac(6')Ib-cr, qnrB66, oqxA, oqxB, sul2, catB3, tet(A), fosA</i>	Lopes <i>et al.</i> , 2017
Kp B29	Humano	340	<i>silA, silB, silC, silE, silF, silR, silS, merA, merC, merD, merE, merT, merP, silG, arsA, arsB, arsC, arsD, arsR, cusF, tehA, tehB</i>	Não disponível.	Fuga <i>et al.</i> , 2017
Kp B35	Humano	11	<i>silA, silB, silC, silE, silF, silR, silS, silP, silG, arsA, arsB, arsC, arsD, arsR, tehA, tehB, cusF</i>	Não disponível.	Fuga <i>et al.</i> , 2017
Kp B03	Humano	437	-	Não disponível.	Fuga <i>et al.</i> , 2017
Kp B17	Humano	443	<i>arsR, silA, silB, silF, silR, silS, silP, tehA, tehB, cusF</i>	Não disponível.	Fuga <i>et al.</i> , 2017
Kp B11	Humano	11	-	Não disponível.	Fuga <i>et al.</i> , 2017
Kp B15	Humano	11	<i>silA, silB, silC, silE, silF, silR, silS, silP, merOperon</i>	Não disponível.	Fuga <i>et al.</i> , 2017
Kp B16	Humano	437	<i>silA, silB, silC, silE, silF, silR, silS, silP, silG, arsA, arsB, arsC, arsD, arsR, tehA, tehB, cusF</i>	Não disponível.	Fuga <i>et al.</i> , 2017
Kp B30	Humano	437	<i>tehA, tehB</i>	Não disponível.	Fuga <i>et al.</i> , 2017

**Legenda-Tabela:** Kp: *Klebsiella pneumoniae*

**Tabela 10.** Genótipo e fenótipo de resistência aos metais pesados em *E. coli* estudadas

ID DA CEPA <sup>1</sup>	ORIGEM	ST	GENE DE RESISTÊNCIA AOS METAIS PASADOS	GENE DE RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS	Referência
Ec HEC01	Humano	117	<i>tehA, tehB, merE, merD, merA, merC, merR, arsB, cusA, cusB, cusF, cusC, cusR, cusS</i>	<i>aph(6)-Id, aph(3'')-Ib, blaCTX-M-8, blaTEM1B, blaCTX-M-55, fosA3, sul2, dfrA5.</i>	Fernandes <i>et al.</i> , 2018
Ec ICBE79H	Humano	224	<i>tehA, tehB, arsB, arsR, arsC, arsB, cusS, cusA, cusB, cusF, cusC, cusR, cusS</i>	<i>aph(3')-Ia, aadA1, aac(3)-Via, blaCTX-M-2, sul2, sul1, tet(A), mcr-1</i>	Não publicado
Ec ICBE72H	Humano	101	<i>tehA, tehB, arsC, arsB, arsR, cusS, cusA, cusB, cusC, cusR</i>	<i>mcr-1</i>	Fernandes <i>et al.</i> , 2016
Ec 278H	Humano	624	<i>silA, silB, silC, silE, silF, silR, silS, silP, tehA, tehB, merA, merC, merD, merE, merR, cusA, cusB, cusC, cusF, terB, terC, terD, terZ, terW</i>	<i>aph(6)-Id, aadA1, aph(3'')-Ib, aadA2, aph(4)-Ia, aac(3)-IV, blaTEM-1B, mcr-1.1, mdx(A), catA1, cmLA1, sul3, tet(A), dfrA1.</i>	Não publicado
Ec 277H	Humano	NT	<i>arsA, arsB, arsR, silR, silS, silB, silP, tehA, tehB, cusB, cusC, cusF, cusA, cusR, cusS</i>	<i>aac(3)-IId, blaTEM-1B, blaSHV-12, mcr-1.1</i>	Não publicado
Ec 14071	Humano	224	<i>tehA, tehB, arsR, arsB, silB, silC, silE, silR, silP, silS, cusA, cusB, cusC, cusR, cusS</i>	<i>aph(3')-Ia, aadA1, aadA2, blaCTX-M-8, blaTEM-1A, mcr-1.1, mdx(A), cmLA1, sul3, tet(A), dfrA12.</i>	Não publicado
Ec 14462	Humano	NT	<i>silP, silB, silR, silS, arsC, arsB, arsR, merC, merD, merR, cusS, cusR, cusC, cusF, cusA</i>	<i>aph(3')-Ia, aadA1, mcr-1.1, qnrB19, floR, sul2, tet(B).</i>	Não publicado
Ec05	Animal de companhia	6993	<i>cusF, cusA, cusB, cusC</i>	<i>blaCTX-M-14, blaTEM-1B, erm(B)</i>	Não publicado
Ec 44924	Animal de companhia	2844	-	<i>blaCTX-M-8, tetB.</i>	Melo L.C <i>et al.</i> , 2018
Ec ICBE2G2	Animal de companhia	648	<i>tehA, tehB, cusA, cusB, cusC</i>	<i>aac(3)-Via, aadA1, blaCTX-M-2, qnrB19, sul1, sul2, tet(B), blaCTX-M-2</i>	Fernandes <i>et al.</i> , 2018
Ec ICBE2G4	Animal de companhia	648	<i>tehA, tehB, cusA, cusB, cusC</i>	<i>aadA5, blaTEM-1B, blaCTX-M-15, erm(B), mph(A), sul1, tet(B), dfrA17.</i>	Fernandes <i>et al.</i> , 2018
Ec SIC2	Animal de companhia	648	<i>tehA, tehB, cusA, cusB, cusC</i>	<i>ac(3)-IIa, aac(6')Ib-cr, aadA5, blaCTX-M15, blaOXA-1, aac(6')Ib-cr, mph(A), sul1, tet(B), tet(A), dfrA17.</i>	Não publicado
Ec SIC1	Animal de companhia	648	<i>tehA, tehB, merE, merR, merD, merA, merC, cusA, cusB, cusC</i>	<i>aadA5, ant(2'')-Ia, aadA1, blaCTX-M-15, catA1, sul1, tet(B), dfrA17.</i>	Não publicado
Ec 44921	Animal de companhia	457	-	<i>blaCTXM-2, qnrA, qnrB</i>	Melo L.C <i>et al.</i> , 2018
Ec ICBE2AM	Ambiente aquático	10	<i>tehA, tehB, arsC, arsB, arsR, cusA, cusF, cusC, cusR, cusS</i>	<i>mcr-1.1</i>	Fernandes <i>et al.</i> , 2017



Ec ICBEC3AM	Ambiente aquático	46	<i>arsR, arsB, arsC, cusS, cusR, cusC, cusB, cusA, mera, merC, merD, merE</i>	<i>aadA1, aph(6)-Id, aph(3'')-Ib, blaTEM-1B, mcr-1, qnrB19, catA1, sul2, sul1, tet(A), dfrA1, dfrA8</i>	Fernandes <i>et al.</i> , 2017
Ec 34VL	Animal de produção	23	<i>tehA, tehB, arsB, arsR, cusA, cusB cusC, cusF, cusR, cusS</i>	<i>aph(3')-Ia, aadA5, aac(3)-IId, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, blaTEM-1B, blaCTX-M-15, qnrB19, mph(A), sul2, sul1, tet(B), dfrA17</i>	Não publicado
Ec 13B	Animal de produção	23	<i>arsB, arsR, merA, merC, merD merE, merR, cusB, cusC, cusF, cusS, cusR</i>	<i>aph(3')-Ia, aph(6)-Id, aac(3)-IId, aadA5, aph(3'')-Ib, blaTEM-1B, blaCTX-M-15, mph(A), sul2, sul1, tet(B), tet(A), dfrA8, dfrA17.</i>	Sartori <i>et al.</i> , 2017
Ec 16VS	Animal de produção	23	-	<i>aph(3')-Ia, aadA5, aac(3)-IId, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, blaCTX-M-15, blaTEM-1B, mph(A), sul2, sul1, tet(B), dfrA12</i>	Não publicado
Ec ECCF1	Alimento	93/-	<i>tehA, tehB, arsR, arsB, arsC, silA, silB, silC, silE, silR, sillS, silP, merR, cusA, cusB, cusC, cusF, cusS, cusR</i>	<i>aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, aac(3)-IId, blaTEM-1B, blaCTX-M-8</i>	Casella <i>et al.</i> , 2015
Ec ICBECPX6	Peixe marinho	10	<i>arsC, arsB, arsR, terB, terC, terD, terZ, terW, tehA, tehB, merA, merC, merD, merE merR, cusA, cusF, cusC, cusR, cusS</i>	<i>aadA5, aph(3'')-Ib, aph(4)-Ia, aph(6)-Id, aac(3)-IVa, blaCTX-M-2, blaTEM-1B, mph(A), mph(B), catA1, floR, sul1, sul2, tet(A), tet(B), dfrA17, dfrA7</i>	Sellera <i>et al.</i> , 2018
Ec ECTALHA	Animal silvestre	NT	<i>mera, merD, merE, merR, tehA, tehB, terB, terC, terD, terZ, terW, arsB, arsC, arsR, cusA, cusB cusC, cusF, cusR, cusS</i>	<i>aadA16, aadA1, aph(3')-Ia, aac(3)-VIa, blaTEM-1B, blaCTX-M-, mdf(A) sul1, tet(A), dfrA27.</i>	Não publicado
Ec 63	Animal silvestre	106	<i>tehA, tehB, arsA, cusB cusC, cusF, cusR,</i>	<i>blaCTX-M-8</i>	Não publicado
Ec MLT	Humano	1508	<i>tehB cusC, cusR</i>	<i>aph(3')-Ia, aph(6)-Id, aph(3'')-Ib, blaTEM1B, blaCTX-M-69, mcr-1.1, qnrB19, fosA3, floR, sul2, tet(A), dfrA1.</i>	Não publicado
Ec IB36	Humano	457	<i>tehA, tehB, cusF, cusA, cusB cusC, cusR</i>	<i>aadA1, aac(6')-Ib, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id aadA2, blaCTX-M-8, blaCTX-M-69, blaTEM</i> Não publicado 36 <i>1C, blaOXA-9, mcr-1.1, aac(6')-Ib-cr, fosA3, mdf(A), floR, cmlA1, sul3, sul2, tet(A), dfrA12.</i>	Não publicado

Ec R-3	Humano	457	<i>tehA, tehB, cusF, cusA, cusB, cusC, cusR</i>	<i>aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, blaTEM-1B, mdf(A), mph(A), sul2, tet(B), dfrA8</i>	Não publicado
Ec N1	Humano	8125	<i>tehA, tehB, arsC, arsB, arsC, arsR, cusA, cusF, cusC, cusS, cusR, merC, merD, merE</i>	<i>aac(3)-IIa, aac(6')Ib3, blaCTX-M-2, blaTEM1B, blaOXA-2, aac(6')Ib-cr, sul1, dfrA8</i>	Não publicado
Ec ESP110	Alimento: Espinafre	4012	<i>arsR, arB, arsC, tehA, tehB, cusA, cusB, cusF, cusC, cusR, cusS</i>	<i>blaCTX-M-15, blaTEM-1B, strA, strB, aacA4, aac(3)-IId, aac(6')Ib-cr, aadA5, sul2, dfrA17, cmlA1, floR, tet(A)</i>	Lopes <i>et al.</i> , 2017
Ec REP237	Alimento: Repolho	38	<i>terC, terD, tehA, tehB, cusA, cusB, cusC, cusF</i>	<i>blaCTX-M-15, blaOXA-1, aac(6')Ib-cr, aadA5, sul1, dfrA17, catB3, tet(A), mph(A)</i>	Lopes <i>et al.</i> , 2017
Ec EM1CRO	Ambiente aquático	457	<i>tehA, tehB, cusA, cusF, cusB, cusC, cusR</i>	-	Não publicado
Ec ICBEC7AM	Ambiente aquático	10	<i>tehA, tehB, arsR, arsB, arsC, silR, silS, silB, silP, cusA, cusB, cusF, cusC, cusR</i>	<i>blaCTX-M-8, qnrB5, qnrB19</i>	Fernandes <i>et al.</i> , 2020
Ec ICBEC8AM	Ambiente aquático	155	<i>tehA, tehB, silB, silR, silS, silP, arsR, arsB, cusA, cusB, cusF, cusC</i>	<i>mdf(A), blaCTX-M-8, blaCTX-M-55, blaTEM-1 gyrA S83L, gyrA D87Y, parC S80I, parE S458A</i>	Fernandes <i>et al.</i> , 2020
Ec ICBEC12AM	Ambiente aquático	1284	<i>tehB, tehA, arsR, arsB, arsC, cusA, cusB, cusF, cusC, cusR, cusS</i>	<i>mdf(A), sul1, aadA5, dfrA17, ant(3'')-Ia, mph(A), aac(3)-IIa, aac(6')Ib-cr, blaCTX-M-15, blaOXA-1, gyrA S83L, gyrA D87Y, parC S80I, parE S458A</i>	Fernandes <i>et al.</i> , 2020
Ec ICBEPX8	Peixe marinho	746	<i>tehA, tehB, arsR, arsB, arsC</i>	<i>blaTEM-1B, blaCTX-M-55, dfrA1</i>	Sellera <i>et al.</i> , 2018.
Ec 5MCRO	Peixe marinho	38	<i>tehA, tehB, cusA</i>	<i>blaCTX-M-14, aac(3)-IIa, strA, strB, sul2</i>	Fernandes <i>et al.</i> , 2020
Ec MOCRO	Peixe marinho	131	<i>tehA, tehB,</i>	-	Fernandes <i>et al.</i> , 2020
Ec SIC19	Peixe marinho	NT	-	<i>blaKPC-2, blaCTX-M-15, aadA5, qnrS1, mph(A), erm(B)], sul1, tet(B), dfrA17</i>	Sellera <i>et al.</i> , 2018.
Ec PB39 (5.3mcr)	Peixe marinho	NT	<i>tehA, tehB, arsR, arsB, arsC, merR</i>	-	Sellera <i>et al.</i> , 2018
Ec 40H	Humano	210	<i>tehA, tehB, arsR, arsB, silA, silB, silC, silE, silP, silR, silS</i>	<i>mdf(A), sul3, ant(3'')-Ia, cmlA1, aadA2, dfrA12, mcr-1.1, aph(6)-Id, aph(3'')-Ib, tet(A), blaCTX-M-8, aph(3')-Ia, gyrA S83L, gyrA D87N, parC S80I</i>	Oliveira <i>et al.</i> , 2018
Ec 50H	Humano	354	-	<i>mdf(A), aph(6)-Id, aph(3'')-Ib, sul2, blaTEM-1A, sul3, aac(3)-</i>	Oliveira <i>et al.</i> , 2018

				<i>Ild, tet(A), aph(3')-Ia, sul1, floR, dfrA14, bla<sub>CTX-M-2</sub>, mcr-1.1, bla<sub>CTX-M-14</sub>, gyrA S83L, gyrA D87N, parC S80I, parC E84G, parE I355T</i>	
Ec 200H	Humano	3024	<i>silP, silB, silR, silS, tehA, tehB, arsR, arsB, arsC</i>	<i>mdf(A), sul3, aph(3')-Ia, cmLA1, aadA2, dfrA12, mcr-1.1, aph(6)-Id, aph(3'')-Ib, tet(A), gyrA S83L, gyrA D87N, parC S80R, parE L416F</i>	Oliveira et., al 2018
Ec ECPET3	Humano	212	<i>silP, silB, silR, silS, tehA, tehB, arsR, arsB, cusA, cusB,, cusF, cusC, cusR, cusF</i>	<i>bla<sub>CTX-M-55</sub>, mdf(A), gyrA S83L</i>	Carvalho et al., 2020
Ec ECPET11	Humano	744	<i>tehA, tehB, arsR, arsB, arsC, merR, cusA, cusB, cusC, cusF, cusR, cusS, mera, merC, merD, merE</i>	<i>mdf(A), cata1, ant(3'')-Ia, dfrA17, aadA5, sul1, aac(3)-IId, tet(B), ant(3'')-Ia, cmlA1, aadA2, aph(6)-Id, aph(3'')-Ib, sul2, fosA3, bla<sub>CTX-M-55</sub>, bla<sub>TEM-104</sub>, aph(3')-Ia, gyrA S83L, gyrA D87N, parC S80I, parC A56T</i>	Carvalho et al., 2020
Ec ECPET13	Humano	212	<i>tehA, tehB, silP, silB, silR, silS, arsR, arsB, arsC, cusA, cusB, cusR, cusF, cusC, cusS</i>	<i>tet(A), aadA1, aa(3)-Iva, aph(4)-Ia, aph(6)-Id, aph(3'')-Ib, aph(3')-Ia, dfrA7, mdf(A), bla<sub>CTX-M-2</sub>, sul1, sul2, gyrA S83L</i>	Carvalho et al., 2020

**Legenda-Tabela:** <sup>1</sup>Ec, *Escherichia coli*,

**Tabela 11:** Genótipo e fenótipo de resistência aos metais pesados em *Salmonella spp.* estudadas

ID DA CEPA <sup>1</sup>	ORIGEM	ST	GENE DE RESISTÊNCIA AOS METAIS PASADOS	GENE DE RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS	Referência
Sa ST018	Alimento Frango de corte	15	<i>tehA, tehB</i>	<i>aac(6') -Iaa, bla<sub>CMY-2</sub>, fosA7, sul2, tet(A)</i>	Não publicado
Sa ST019	Alimento Frango de corte	NT	<i>tehA, tehB</i>	<i>aac(6') -Iaa, bla<sub>CMY-2</sub>, fosA7, sul2, tet(A)</i>	Não publicado
Sa ST013	Alimento Frango de corte	19	<i>tehA, tehB, terA, terB, terC, terD, terE, terF, terW, terZ, merA, merC, merD, merE, merR, silR, silB, silS, silP</i>	<i>aac(6') -Iaa, aac(3) -Ila, aadA1, bla<sub>TEM-1A</sub>, qnrE1, sul1, tet(A).</i>	Não publicado
Sa ST014	Alimento Frango de corte	4556	<i>silA, silB, silC, silE, silF, silP, silR, silS, merA, merC, merD, merR, tehA, tehB</i>	<i>adA2b, aac(6') -Iaa, bla<sub>TEM-1B</sub>, tet(M), tet(A), dfrA12.</i>	Não publicado

Sa ST06	Alimento Frango de corte	NT	<i>silR, silS, silB, merR, tehA, tehB, terA, terB, terC, terD, terE, terF</i>	<i>aph(3')-Ib, aph(6')-Id, aac(3)-IIa, aadA1, aac(6')-Iaa, blaTEM-1B, qnrE1, floR, sul1, tet(A), drfA.</i>	Não publicado
Sa ST015	Alimento Estomago de suíno	19	<i>tehA, silS, silR, silB, silP</i>	<i>aph(3'')-Ib, aph(6')-Id, aac(6')-Iaa, blaTEM-1A, oqxA, oqxB, floR, sul2, tet(B)</i>	Não publicado
Sa SI05	Alimento carne de frango	32	<i>silP, silE, silB, silC, silR, silS, tehA, tehB</i>	<i>aac(6')-Iaa, blaCTX-M-8, blaTEM-1B, floR, tet(A), dfrA8.</i>	Não publicado
Sa SF10	Alimento peito de frango	15	<i>tehA, tehB</i>	<i>aac(6')-Iaa, blaCMY-2, fosA7, sul2, tet(A).</i>	Não publicado
Sa SF12	Alimento peito de frango	15	<i>tehA, tehB</i>	<i>aac(6')-Iaa, blaCMY-2, fosA7, sul2, tet(A)</i>	Não publicado
Sa ST2	Alimento Fígado de suíno	11	<i>merC, merD, merE, merR, terA, terB, terC, terD, terE, terF, terW, terZ, silS, silR, silB, silP, tehA, tehB</i>	<i>aac(6')-Iaa, aadA1, aac(3)-IIa, blaTEM-1B, qnrE1, floR, sul1, tet(A), drfA1.</i>	Não publicado
Sa STY13	Alimento carne de suíno	19	<i>silB, silR, silS, silP, tehA, tehB, merA, merC, merD, merE, merR, terA, terB, terC, terD, terZ, terW</i>	<i>aac(3)-IIa, aac(6')-Iaa, aadA1, blaTEM-1B, qnrE1, floR, sul1, tet(A), drfA1.</i>	Não publicado
Sa SAL14	Infecção humano	112	<i>merE, tehB, terA, terB, terC, terD, terE, terF, terW, terZ, merR, merT</i>	<i>aph(3')-Ia, aac(6')-Iaa, aadA1, blaCTX-M-2, sul1, tet(A).</i>	Moura <i>et al.</i> , 2018.
Sa SAL65505	Alimento Carne de frango	3088	<i>tehA</i>	<i>aac(6')-Iaa, blaCMY-2, tet(A).</i>	Moura <i>et al.</i> , 2018.
Sa 67A	Animal: Coruja	32	<i>arsH, merR, tehA, tehB</i>	<i>aph(3')-Ia, aph(4)-Ia, aadA1, aac(6)-Iaa, aac(3)-IV, blaCTX-M-65., floR, sul1, tet(A), dfrA14.</i>	Não publicado
Sa 97	Humano	19	<i>tehA, tehB</i>	<i>blaCTXM-14, qnrB19.</i>	Não publicado

**Legenda-Tabela:** Sa: *Salmonella* spp.