



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

**PERFIL DO RESISTOMA BACTERIANO NO RESERVATÓRIO DA USINA
HIDRELÉTRICA TUCURUÍ**

ANDREZA PALOMA GÓES OLIVEIRA

Belém-Pará
Dezembro-2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

**PERFIL DO RESISTOMA BACTERIANO NO RESERVATÓRIO DA USINA
HIDRELÉTRICA TUCURUÍ**

ANDREZA PALOMA GÓES OLIVEIRA

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Genética Biologia Molecular. Orientador: Prof. Dr. Artur Luiz da Costa da Silva.

Belém-Pará
Dezembro-2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- O48p Oliveira, Andreza Paloma Góes.
 Perfil do resistoma bacteriano no reservatório da Usina
 Hidrelétrica Tucuruí / Andreza Paloma Góes Oliveira. — 2022.
 76 f. : il. color.
- Orientador(a): Prof. Dr. Artur Luiz da Costa da Silva
 Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de
 Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e
 Biologia Molecular, Belém, 2022.
1. genes de resistência a antimicrobianos. 2.
 metagenômica. 3. usina hidrelétrica. 4. Tucuruí. 5. Amazônia.
 I. Título.

CDD 576.5

ANDREZA PALOMA GÓES OLIVEIRA

PERFIL DO RESISTOMA BACTERIANO NO RESERVATÓRIO DA USINA HIDRELÉTRICA TUCURUÍ

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Genética Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Artur Luiz da Costa da Silva
Instituto de Ciências Biológicas - UFPA

Banca Examinadora: Prof^ª. Dr^a. Adriana Carneiro Folador (Avaliadora)
Instituto de Ciências Biológicas – UFPA
Prof. Dr. Rafael Azevedo Baraúna (Avaliador)
Instituto de Ciências Biológicas – UFPA
Prof. Dr. Rommel Thiago Jucá Ramos (Avaliador)
Instituto de Ciências Biológicas – UFPA
Prof. Dr. José Augusto Pires Bitencourt (Avaliador)
Instituto Tecnológico Vale – ITV

Belém, 01 de Dezembro de 2022.

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Universidade Federal do Pará – UFPA

Fundação Amparo e Desenvolvimento da Pesquisa – FADESP/UFPA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação – PROPESP/UFPA

Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular – PPGBM

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES

Centro de Genômica e Biologia de Sistemas – CGBS

Laboratório de Engenharia Biológica – ENGBIO, Parque de Ciência e Tecnologia – PCT

*“Enquanto houver vontade de lutar haverá
esperança de vencer.”*

Santo Agostinho

DEDICATÓRIA

A Deus e Nossa Senhora, pelo dom da vida e por permitir a realização desse sonho, a meus pais, Regina e Eliezer, a meu irmão, Leonardo, por todo incentivo, amor e cuidado, a meu esposo, Alexandre, por me fazer acreditar e jamais desistir, e a minha tia, Sônia, por seu amor e incentivo enquanto estive ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular – PPGBM e a todos os seus professores e funcionários, por todo o incentivo e colaboração ao futuro da ciência brasileira.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo incentivo à dedicação exclusiva mediante a concessão da bolsa.

À Fundação Amparo e Desenvolvimento da Pesquisa – FADESP/UFPA, à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação – PROPESP/UFPA e à Universidade Federal do Pará – UFPA, por todo o apoio e crença na ciência brasileira de qualidade, mesmo em tempos difíceis.

Ao meu orientador e professor Dr. Artur Luiz da Costa da Silva, por sua orientação e confiança à mim para execução deste trabalho, além do professor Dr. Diego Assis das Graças, por sua dedicação e empenho, que tornaram possível a conclusão do tão almejado título de doutora (que é muito mais do que um título).

Aos professores da banca examinadora por suas contribuições inigualáveis, especialmente aos professores Dr. Rafael Azevedo Baraúna e Dr. Rommel Thiago Jucá Ramos, por suas contribuições mesmo antes da finalização desta tese.

Aos colegas de trabalho e incentivadores, Glen, Kenny, Dener e Mabel, por todo conhecimento repassado a mim.

À Silvanira e Soraya por suas amizades, empenho e dedicação na execução das técnicas laboratoriais.

A todos os integrantes do Centro de Genômica e Biologia de Sistemas – CGBS e do Laboratório de Engenharia Biológica – ENGBIO, por todo o apoio direto ou indireto, tornando possível a realização desta tese.

A meus amigos e familiares que sempre me incentivaram e acreditaram junto comigo na realização desse sonho que hoje é realidade.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	8
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE QUADROS.....	11
LISTA DE TABELAS.....	12
RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	14
1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 ANTIMICROBIANOS.....	15
1.1.1 Histórico.....	15
1.1.2 Classificação.....	16
1.1.3 Resistência a antimicrobianos.....	20
1.1.3.1 Resistoma e Mobiloma.....	24
1.2 METAGENÔMICA.....	26
1.2.1 Metagenômica aplicada a identificação do resistoma.....	26
1.3 USINA HIDRELÉTRICA TUCURUÍ.....	27
1.4 IMPORTÂNCIA DA AVALIAÇÃO DO RESISTOMA EM LAGOS DE INTENSA AÇÃO ANTROPOLÓGICA GERADOS PELA CONSTRUÇÃO DE UHEs.....	31
2 OBJETIVOS.....	34
2.1 OBJETIVO GERAL.....	34
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
3 CAPÍTULO 1 – ARTIGO: HIGH ABUNDANCE AND DIVERSITY OF ANTIBIOTIC RESISTANCE GENES DURING RAINFALL IN TUCURUÍ HYDROELECTRIC POWER PLANT LAKE.....	35
INTRODUCTION.....	37
MATERIAL AND METHODS.....	38
RESULTS.....	39
DISCUSSION.....	42
REFERENCES.....	46
INTERNET RESOURCES SECTION.....	50
SUPPLEMENTARY MATERIAL.....	51
4 DISCUSSÃO.....	62
5 CONCLUSÃO.....	65
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Aphotic
ACC	ARG-carrying contigs
ARB	Bactéria resistente a antimicrobiano
ARG	Gene de resistência a antimicrobiano
C1	Caraipé 1
C2	Caraipé 2
CARD	Comprehensive Antibiotic Resistance Database
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EIA	Avaliação de impacto ambiental
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
GW/h	Gigawatt por hora
Hg	Mercúrio
HPP	Hydroelectric power plant
ICE	Elementos conjugativos e integrativos
IG	Ilha genômica
IS	Sequência de inserção
ISCR	Sequência de inserção com região conservada
M1	Montante 1
M3	Montante 3
MBB	Montante Breu Branco
MBL	Montante Belauto
MDR	Multidroga resistente
MeHg	Metilmercúrio
MGE	Elemento genético móvel
MIC	Concentração mínima inibitória
MIP	Montante Ipixuna
MJV	Montante Jacundá Velho
ML	Montante Lontra
MLS	Macrolide-Lincosamide-Streptogramin
MP	Montante Pucuruí
MR	Montante Novo Repartimento
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro

MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
OIE	Organização Mundial da Saúde Animal
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORFs	Open Reading Frames
ORSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à oxacilina
P	Photic
PABA	Ácido p-aminobenzoico
RAM	Resistência antimicrobiana
RGI	Resistance Gene Identifier
RNA	Ácido ribonucleico
S	Sediment
THG	Transferência horizontal de genes
tRNA	Ácido ribonucleico transportador
UHE	Usina hidrelétrica
WMS	Whole Metagenome Sequencing

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Da tolerância à resistência: Linhagens selvagens tratadas repetidamente por um antimicrobiano, desencadeiam o surgimento inicial de mutantes altamente tolerantes, seguido pela evolução dos mutantes que são tolerantes e resistentes ao antimicrobiano (Fonte: Adaptado de Lewis & Shan, 2017).....	20
Figura 2: Mecanismos de resistência bacteriana contra a ação de antimicrobianos (Fonte: Adaptado de Surette & Wright, 2017).....	21
Figura 3: Usina Hidrelétrica Tucuruí (Fonte: Bortoni et al., 2019).....	28
Figura 4: Localização da UHE Tucuruí, seu reservatório, bem como os municípios afetados por sua construção (Fonte: Montoya, 2018).....	29
Figura 5: Localização do reservatório da UHE Tucuruí e de suas estações (Fonte: Adaptado de Silva, 2018).....	30
Figura 6: Map of the sampling with the marking of the HPP and the studied stations.....	38
Figura 7: Composition and abundance of different ARG types in relation to the collections carried out in the Photic (P), Aphotic (A) and Sediment (S) layers of the M1 and MR stations in Tucuruí HPP, during the Amazon's summer (1) and winter (2). Abundance values were transformed using log of 2. MLS: macrolide-lincosamide-streptogramin.....	40
Figura 8: Comparison of the total ARG types abundances among different samples (outline = False) (Kruskal-Wallis rank sum test: $\chi^2 = 64.01$, $df = 11$, $p\text{-value} = 1.65e-09$).	41
Figura 9: Comparison of the total clinically important ARGs subtypes abundances (at least one dose per day), in relation to Beta-lactam and Multidrug ARG types distributed in the different samples (outline = False) (Kruskal-Wallis rank sum test: $\chi^2 = 55.57$, $df = 11$, $p\text{-value} = 6.09e-08$).....	42
Figura 10: Co-association between ColRNAI plasmid replicon and ARGs, originating clusters in the specific samples.....	43

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação dos antimicrobianos quanto ao mecanismo de ação.....	16
Quadro 2 - Estações do lago da UHE Tucuruí, suas localizações e profundidades máximas alcançadas.....	29

LISTA DE TABELAS

Tabel S1 - Metagenomic datasets.....	51
Tabel S2 - No. of ARG subtypes identified across samples.....	52
Tabel S3 - Abundance of ARG types. MLS: macrolide-lincosamide-streptogramin.....	53
Tabel S4 - Abundance of clinically important antibiotic resistance genes (ARGs).....	54
Tabel S5 - ARGs identified.....	56

RESUMO

Tucuruí é a segunda maior Usina Hidrelétrica (UHE) inteiramente brasileira, o lago artificial modificou o ecossistema da região. Muitos microrganismos patogênicos e de vida livre que abrigam Genes de Resistência a antimicrobianos (ARGs) estão adaptados para viver em habitats aquáticos, o que torna os rios possíveis fontes de ARGs. Este trabalho tem como objetivo descrever a ocorrência e a abundância de ARGs de acordo com a variabilidade espacial e sazonal no lago da UHE Tucuruí. As amostras foram coletadas das camadas Fótica, Afótica e Sedimentar das estações Montante 1 e Montante Novo Repartimento, durante o verão e o inverno da Amazônia. As amostras de DNA foram extraídas e sequenciadas na plataforma Ion Proton para análise metagenômica. Megahit foi utilizado para montagem *de novo* das *reads*, as *Open Reading Frames* (ORFs) foram previstas pelo Prodigal, e os ARGs foram obtidos a partir das bases de dados CARD e MEGARES. Os *contigs* que continham ARGs foram gerados para as análises posteriores. A análise estatística foi avaliada no R, utilizando o pacote ggplot2. A maior diversidade de subtipos de ARG foi observada em amostras da estação MR coletadas durante o inverno amazônico. Os tipos de ARGs mais abundantes foram Beta-lactâmicos, Macrolídeo-Lincosamida-Estreptogramina (MLS), Tetraciclina, Aminoglicosídeos e multidroga resistente. Foi verificada maior incidência de Beta-lactâmicos na camada fótica das estações M1 e MR durante o inverno amazônico, ORFs associadas ao gene de multidroga resistência foram prevalentes nas mesmas categorias, além da camada afótica apenas em relação para a estação MR. *bla*TEM-209, *bla*TEM-95 e *tetC* foram encontrados juntamente com o plasmídeo ColRNAI. O inverno amazônico e a superfície da água apresentaram abundâncias e diversidades significativas de ARGs no lago da UHE Tucuruí, enquanto que, as abundâncias de ARGs na camada sedimentar não diferiram entre si. Além disso, a associação desses genes a um plasmídeo mostra fortes indícios de sua transposição, indicando que a influência humana neste lago representa um dos motivos de preocupação com a disseminação de ARGs, principalmente durante o período chuvoso.

Palavras-chave: genes de resistência a antimicrobianos; metagenômica; usina hidrelétrica; Tucuruí; Amazônia.

ABSTRACT

Tucuruí is the second largest entirely Brazilian Hydroelectric Power Plant (HPP), the artificial lake modified the ecosystem of the region. Many pathogenic and free-living microorganisms harboring Antibiotic Resistance Genes (ARGs) are adapted to live in aquatic habitats, which makes rivers possible sources of ARGs. This work aims to describe the occurrence and abundance of ARGs according to spatial and seasonal variability in the lake of Tucuruí HPP. The samples were collected from the Photic, Aphotic and Sediment layers of the Montante 1 and Montante Novo Repartimento stations, during the Amazon's summer and Amazon's winter. The DNA samples were extracted and sequenced in the Ion Proton platform for the whole metagenomic analysis. Megahit performed de novo assembled in the reads, the Open Reading Frames (ORFs) were predicted by Prodigal, and the ARGs were obtained from CARD and MEGARES data bases. The ARG-carrying contigs were generated for downstream analysis. The statistical analysis was evaluated on the R and the package ggplot2 was used. The greatest diversity of ARG subtypes was observed in samples from the MR station collected during the Amazon's winter. The most abundant ARG types were Beta-lactam, Macrolide-Lincosamide-Streptogramin (MLS), Tetracycline, Aminoglycoside and Multidrug resistance genes. Was verified a higher incidence of Beta-lactam in the photic layer of M1 and MR stations during the the Amazon's winter, ORFs affiliated to the Multidrug resistance gene ARG type were more prevalent in the same categories, in addition of the aphotic layer only in relation to MR station. blaTEM-209, blaTEM-95, and tetC were found together with the ColRNAI plasmid. The Amazonian winter and the water surface presented significant abundances and diversity of ARGs in the lake of the Tucuruí HPP, whereas ARGs abundance in the sediment layer did not differ from each other. In addition, the association of these genes to a plasmid show strong evidence of transposition, indicating that the human influence on this lake represents one of the reasons for concern about the spread of these genes, mainly in the rainy season.

Keywords: antibiotic resistance genes; metagenomics; hydroelectric power plant; Tucuruí; Amazônia.

1 INTRODUÇÃO

1.1 ANTIMICROBIANOS

1.1.1 Histórico

O conhecimento da inibição do crescimento bacteriano é datado do século 19, quando John Scott Burden-Sanderson reportou a ausência de bactérias a partir de um cultivo líquido coberto por mofo, seguido por Joseph Lister, que em 1871 curou a si próprio com extrato do fungo *Penicillium glaucum*. Em 1877, Louis Pasteur e Jules François Joubert estudaram a inibição do *Bacillus anthracis* cultivado mutuamente com bactérias aeróbicas, já em 1889, Jean Paul Vuillemin designou a palavra “antibiosis” para a relação de antagonismo entre microrganismos (Durand, Raoult & Dubourg, 2019).

O século 20 foi marcado por intensas pesquisas e descobertas, iniciadas por Paul Ehrlich em 1909, que purificou o primeiro composto químico antimicrobiano, a arsfenamina, contra o agente causador da sífilis, *Treponema pallidum*, mais tarde, em 1928, Alexander Fleming descobriu acidentalmente, quando esqueceu o cultivo de colônias de *Staphylococcus aureus*, que o crescimento do fungo *Penicillium* inibiu a bactéria, anos depois a molécula purificada foi chamada de penicilina. As pesquisas se intensificaram no período de 1940 a 1970, conhecida com “período ouro”, onde muitos antimicrobianos foram descobertos advindos principalmente de bactérias e fungos (Durand, Raoult & Dubourg, 2019), e foi neste período, em 1941 que Selman Waksman definiu pela primeira vez a palavra “antimicrobiano”, como uma pequena molécula produzida por um microrganismo capaz de antagonizar o crescimento de outros microrganismos (Clardy, Fischbach & Currie, 2009).

O uso dos antimicrobianos na prática clínica modificou significativamente o controle de infecções microbianas, reduzindo as taxas de morbidade e mortalidade (Travis *et al.*, 2018), além disso, a partir da década de 1940, os antimicrobianos são usados com diferentes finalidades na agricultura, aplicados no cultivo de frutos, mas principalmente, na produção animal, para o controle, prevenção e tratamento de doenças, e como promotor de crescimento (Cramer, Paudel & Schmitz 2019).

Apesar do sucesso geral dos antimicrobianos, sua eficácia e confiabilidade têm sido gravemente comprometidas nos últimos anos, devido ao surgimento e disseminação da resistência antimicrobiana (RAM) entre os patógenos (Travis *et al.*, 2018).

A resistência a antimicrobianos é considerada um desafio para a saúde mundial, visto que, causa a rápida disseminação de microrganismo resistentes entre humanos, animais e

meio ambiente (Rousham, Unicomb & Islam 2018), ocasionando uma evolução contínua de bactérias multidroga resistentes (MDR), e contraditoriamente, aumentando a morbidade e mortalidade, bem como, os custos nos cuidados com a saúde. Como forma de tentar contornar esta situação emergente, a solução é encontrar novos alvos bacterianos e/ou novos antimicrobianos de propriedades mais eficazes (Banin, Hughes & Kuipers 2017).

1.1.2 Classificação

Alguns antimicrobianos são usados no combate ao câncer, como actinomicina D (inibe a síntese do ácido desoxirribonucleico (DNA)), antraciclinas (inibe a síntese de DNA e do ácido ribonucleico (RNA)) e epotilona (inibe a divisão celular), ou como pesticidas, como a oxitetraciclina e a estreptomicina. Os antimicrobianos podem ser naturais, quando derivados de microrganismo, semi-sintéticos, onde substâncias naturais são alteradas a fim de que se tornem mais estáveis, e sintéticos (Grenni, Ancona & Barra Caracciolo 2018).

Existem várias formas de classificar os antimicrobianos, as mais comuns são por suas estruturas moleculares, mecanismo e espectro de ação, estes compostos podem ser bactericidas, quando são capazes de matar a bactéria, ou bacteriostáticos, quando somente inibem o crescimento destes organismos (Etebu, E. & Arikekpar 2016) (Quadro 1).

Quadro 1 - Classificação dos antimicrobianos quanto ao mecanismo de ação.

Inibidores da síntese da parede celular		
β-Lactâmicos		
Penicilinas (Bactericida: bloqueia a ligação cruzada via inibição competitiva da enzima transpeptidase)		
Classes	Drogas	Indicações
Penicilina	Penicilina G	<i>Streptococcus pyogenes</i> ; <i>Streptococcus agalactiae</i> ; <i>Clostridium perfringens</i> .
	Penicilina G aquosa	
	Penicilina G procaína	
	Penicilina G Benzatina	
	Penicilina V	
Aminopenicilina	Ampicilina ³	<i>Streptococcus pyogenes</i> ; <i>Streptococcus agalactiae</i> ; <i>Clostridium perfringens</i> ; <i>Escherichia faecalis</i> ; <i>Escherichia coli</i> .
	Amoxicilina	
Penicilinas resistentes a Penicilinas	Meticilina	<i>Streptococcus pyogenes</i> ; <i>Streptococcus agalactiae</i> ; <i>Clostridium perfringens</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i> produtor de Penicilinase.
	Nafcilina	
	Oxacilina ²	
	Cloxacilina	
	Dicloxacilina	
Penicilinas Anti- <i>Pseudomonas</i>	Carbenicilina	<i>Streptococcus pyogenes</i> ; <i>Streptococcus agalactiae</i> ; <i>Clostridium perfringens</i> ; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .
	Ticarcilina	
	Piperacilina	
Cefalosporinas (Bactericida: inibe a síntese de parede celular bacteriana via inibição competitiva da		

enzima transpeptidase)		
1ª geração	Cefazolina ²	<i>Staphylococcus aureus</i> ;
	Cefalexina	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ; <i>Escherichia coli</i> ; <i>Klebsiella</i> .
2ª geração	Cefoxitina ²	<i>Staphylococcus aureus</i> ;
	Cefaclor	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ;
	Cefuroxima	<i>Escherichia coli</i> ; <i>Klebsiella</i> .
3ª geração	Ceftriaxona ³	<i>Staphylococcus aureus</i> ; <i>Staphylococcus epidermidis</i> ;
	Cefotaxima	<i>Escherichia coli</i> ; <i>Klebsiella</i> ;
	Ceftazidima	<i>Pseudomonas</i> .
	Uso Veterinário: Ceftiofur	<i>Pasteurella multocida</i> ; <i>Escherichia coli</i> .
4ª geração	Cefepima ³	<i>Staphylococcus aureus</i> ; <i>Staphylococcus epidermidis</i> ; <i>Escherichia coli</i> ; <i>Klebsiella</i> ; <i>Pseudomonas</i> .
	Uso Veterinário: Cefquinoma	<i>Infecções do úbere (mastite) causadas por</i> : <i>Streptococcus uberis</i> ; <i>Streptococcus dysgalactiae</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i> ; <i>Escherichia coli</i> e outras <i>Enterobacteriaceae</i> .
5ª geração	Ceftobiprole	Microrganismos gram-positivos e gram-negativos; <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina (MRSA); <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à oxacilina (ORSA);
	Ceftaroline ³	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ; <i>Enterococcus faecalis</i> .
Carbapenem (Bactericida: inibe a formação do peptidoglicano)		
	Imipenem (+ cilastina)	Atividade Ampla (Exceto para (MRSA) e <i>Mycoplasma</i>)
	Meropenem ³	
	Doripenem	
	Ertapenem	
Monobactam (Bactericida: inibe a formação do peptidoglicano)		
	Aztreonam ³	Bactérias gram-negativas
Amidinopenicilinas (Bactericida)		
	Mecilnam ²	Bactérias gram-negativas
Glicopeptídeos (Bactericida: altera a permeabilidade da membrana citoplasmática)		
	Vancomicina ³	MRSA;
	Teicoplanina	<i>Staphylococcus aureus</i> ; <i>Staphylococcus epidermidis</i> .
Inibidores de β-lactamases (Bactericida: inativa grande variedade de enzimas betalactamases)		
	Ácido Clavulânico	<i>Staphylococcus aureus</i> ;
	Sulbactam	<i>Staphylococcus epidermis</i> ;
	Tazobactam	<i>Escherichia Coli</i> ; <i>Klebsiella</i> .
Polipeptídeos (Bactericida: interfere a propriedade de permeabilidade seletiva da membrana)		
Polimixinas	Polimixina B	Bactérias gram-negativas
	Polimixina E (colistina) ³	
Polipeptídeo cíclico	Bacitracina ¹	
Lipopeptídeo (Bactericida: despolariza o potencial de membrana)		
	Daptomicina ³	<i>Staphylococcus</i> e <i>Enterococcus</i> resistentes à

		oxacilina; Bactérias resistentes à vancomicina e linezolid.
Ácidos Fosfônicos (Bactericida: inibe a síntese de peptídeoglicano)		
	Fosfomicina ³	Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, ainda que resistentes a outros antibacterianos; Cepas produtoras de penicilinase.
Ácidos pseudomônicos (Bacteriostático e Bactericida: impede a junção de isoleucina nas cadeias protéicas da parede celular bacteriana)		
	Mupirocina ²	Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas; Staphylococcus aureus (inclusive cepas MRSA); Streptococcus pneumoniae; Haemophilus influenzae; Escherichia coli; Proteus mirabilis. Z;
Riminoftenazinas (Bactericida: interfere na cadeia respiratória bacteriana e no transportadores de íons)		
	Clofazimina ²	Mycobacterium leprae
Inibidores da Síntese Protéica		
Antagonista da subunidade ribossomal 30 S		
Aminoglicosídeos (Bactericida: impedem a leitura do RNA mensageiro (mRNA))		
	Gentamicina ³	Bactérias aeróbicas gram-negativas; Enterobacteriaceae; Pseudomonas.
	Neomicina	
	Amikacina	
	Tobramicina	
	Estreptomicina	
	Uso veterinário: Apramicina	
Tetraciclínas (Bacteriostático: bloqueia o RNA transportador (tRNA))		
	Tetraciclina	Rickettsia; Mycoplasma; Spirochetes (doença de Lyme).
	Doxiciclina	
	Minociclina	
	Demeclociclina	
	Clortetraciclina ²	
Gliciliclinas (Bacteriostático: bloqueia a entrada de moléculas aminoacil tRNA no sítio do ribossomo)		
	Tigeciclina ³	Staphylococcus resistentes à oxacilina; Enterococcus resistentes à vancomicina; Streptococcus resistentes às penicilinas ou cefalosporinas; Klebsiella pneumoniae produtora de betalactamase de espectro estendido; Bacteroides fragilis; Clostridium difficile.
Ácidos Esteroides (Bactericida e Bacteriostático: impede o alongação da cadeia polipeptídica)		
	Ácido Fusídico ²	Staphylococcus (incluindo MRSA); Neisseia spp.; Bordetella pertussis; Corynebacterium minutissimum.; Streptococcus; Enterococcus; Bactérias anaeróbias gram-negativas
Aminociclitóis (Bacteriostático)		
	Espectinomicina ¹	Neisseria gonorrhoeae
Antagonista da subunidade ribossomal 50 S		
Macrolídeos (Bacteriostático: liga-se reversivelmente a 50S)		
	Eritromicina ³	Streptococcus; Haemophilus influenzae; Mycoplasma pneumoniae.
	Azitromicina	
	Claritromicina	
Anfenicóis (Bateriostático/Bactericida: inibe a transpeptidação)		
	Cloranfenicol ²	Haemophilus influenzae (meningite bacteriana)
Licosamidas (Bacteriostático: inibe a peptidil transferase com o complexo aminoacil-tRNA)		

	Clindamicina ²	<i>Bacteroides fragilis</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i> ; <i>Staphylococcus e Streptococcus</i> (Coagulase-negativa).
Oxazolidonas (Bacteriostático/Bactericida: impede a formação do complexo de iniciação 70S)		
	Linezolida ³	Bactérias gram-positivas
Streptograminas (Bacteriostático: inibe a formação de pontes peptídicas)		
	Quinupristina ²	<i>Staphylococcus</i> resistentes à oxacilina e com sensibilidade diminuída ou resistentes à vancomicina; <i>Staphylococcus aureus</i> .
	Dalfopristina ²	
Cetolídeos (Bacteriostático/Bactericida: mutações estruturais no local de união do cetolídeo ao ribossomo)		
	Telitromicina ³	<i>Staphylococcus e Streptococcus</i> ; <i>Streptococcus pneumoniae</i> multidroga resistente.
Pleuromutilinas (Bacteriostático/Bactericida: inibem a transferência de peptidil, bloqueiam parcialmente as interações no sítio P e impedem a formação normal das subunidades ativas do ribossomo 50S)		
	Retapamulina ¹	<i>Staphylococcus aureus</i> ; <i>Streptococcus pyogenes</i> .
Inibidores da Síntese de DNA		
Fluoroquinolonas (Bactericida: inibe a enzima DNA-girase)		
1ª geração	Ácido Nalidíxico	<i>Streptococcus</i> ; <i>Mycoplasma</i> ; Bactérias gram-positivas aeróbicas.
2ª geração	Ciprofloxacino ³	<i>Streptococcus</i> ; <i>Mycoplasma</i> ; Bactérias gram-positivas aeróbicas; <i>Pseudomonas</i> .
	Norfloxacino	
	Enoxacino	
	Ofloxacino	
	Levofloxacino	
3ª geração	Gatifloxacino	<i>Streptococcus</i> ; <i>Mycoplasma</i> ; Bactérias gram-positivas aeróbicas.
4ª geração	Moxifloxacino	<i>Streptococcus</i> ; <i>Mycoplasma</i> ; Bactérias gram-positivas aeróbicas e anaeróbicas.
	Gemifloxacino	
Nitrofurantoína (Bacteriostático e Bactericida)		
	Nitrofurantoína ¹	Bactérias gram-positivas e gram-negativas; É ativa nas infecções do trato urinário causada por <i>Klebsiella</i> spp., <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterococos</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterobacter</i> spp. e <i>Proteus</i> spp.
Fluoroquinolona sintética do grupo 7-pirrolidino-fluoroquinolonas (Bactericida: inibição simultânea da DNA-girase e da topoisomerase IV)		
	Gemifloxacina	Bactérias gram-positivas; <i>Haemophilus influenzae</i> ; <i>C. pneumoniae</i> , <i>Mycoplasma pneumoniae</i> e <i>Legionella pneumophila</i> (pneumonia atípica).
Nitroimidazólicos (Bactericida: subprodutos metabólicos interrompem o DNA)		
	Metronidazol ¹	Bactérias gram-negativas anaeróbicas
Inibidores da Síntese de RNA		
Ansamicina (Bactericida: se une a RNA polimerase, bloqueando assim, a síntese de mRNA)		
	Rifampicina ³	<i>Staphylococcus</i> ; <i>Mycobacterium</i> .
Inibidores da Síntese de Ácido Micólico		
Isoniazida (Bactericida: inibe enzimas que sintetizam o ácido micólico)		
	Isoniazida ³	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Inibidores da Síntese de Ácido Fólico		
Sulfonamidas (Bacteriostático: inibição com o ácido p-aminobenzoico - PABA)		
	Trimetoprim/ Sulfametoxazol (SMX) ²	<i>Proteus</i> ; <i>Enterobacter</i> .

	Sulfisoxazol	
	Sulfadiazina	
Sulfonas (Bacteriostático: inibição com o ácido p-aminobenzóico - PABA)		
	Dapsona ²	<i>Mycobacterium leprae</i> ; Pneumonia por <i>Pneumocystis carinii</i> .

¹antimicrobianos Importantes; ²antimicrobianos de alta importância; ³antimicrobianos de importância crítica.

Fonte: Adaptado de Orthobullets (Orthobullets, 2019), Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa, 2019) e World Health Organization (WHO, 2017) (Acessados em: 17/08/2019).

1.1.3 Resistência a antimicrobianos

Existem duas estratégias de defesa usadas pelas bactérias na presença de antimicrobianos, a tolerância, responsável por inativar os alvos destes compostos, e a resistência, que destrói a droga ou modifica seus alvos. Apesar destas estratégias não estarem relacionadas, a tolerância desencadeia o processo de resistência aos antimicrobianos, que é adquirida por mutações ou por meio de DNA exógeno (Lewis & Shan, 2017).

O processo de tolerância precede a resistência, por que linhagens tolerantes são capazes de sobreviver a alta concentração inicial do antimicrobiano administrado, o que se repete por vários ciclos (Figura 1), a partir do princípio que vários genes conferem tolerância, se faz necessário compostos que possam eliminar células tolerantes antes que adquiram resistência (Lewis & Shan, 2017).

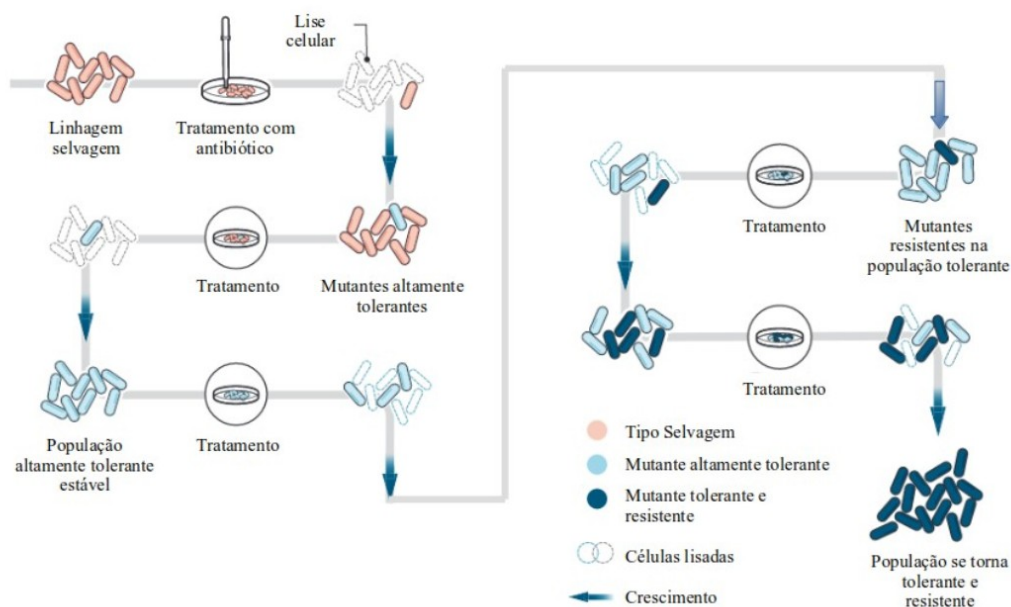


Figura 1: Da tolerância à resistência: Linhagens selvagens tratadas repetidamente por um antimicrobiano, desencadeiam o surgimento inicial de mutantes altamente tolerantes, seguido pela evolução dos mutantes que são tolerantes e resistentes ao antimicrobiano (Fonte: Adaptado de Lewis & Shan, 2017).

Desde 1930 a resistência a antimicrobianos é documentada, porém com a chegada do “período ouro”, onde novos antimicrobianos foram descritos, esse assunto não era uma preocupação do período, uma vez que as novas descobertas conseguiam contornar este problema, contudo, nos dias atuais esta visão otimista está defasada. A resistência a todas as classes de antimicrobianos continua a emergir pelo mundo, ocorrendo em todos os nichos ecológicos, como o solo, a água, a atmosfera e o ambiente urbano (Surette & Wright, 2017).

Existem dois mecanismos de resistência nas bactérias, o intrínseco e o adquirido. No mecanismo intrínseco estão as respostas gerais a moléculas tóxicas, como a resposta “SOS” que reduz a fidelidade de replicação do DNA, ativação da bomba de efluxo, codificação de enzimas de inativação, como as β -lactamases do tipo ampC, e a presença de barreiras físicas, como poros e a membrana externa das bactérias gram-negativas. A resistência adquirida compreende mecanismos que evoluem, muitas vezes através da transferência horizontal de genes (THG) (Figura 2) (Surette & Wright, 2017).

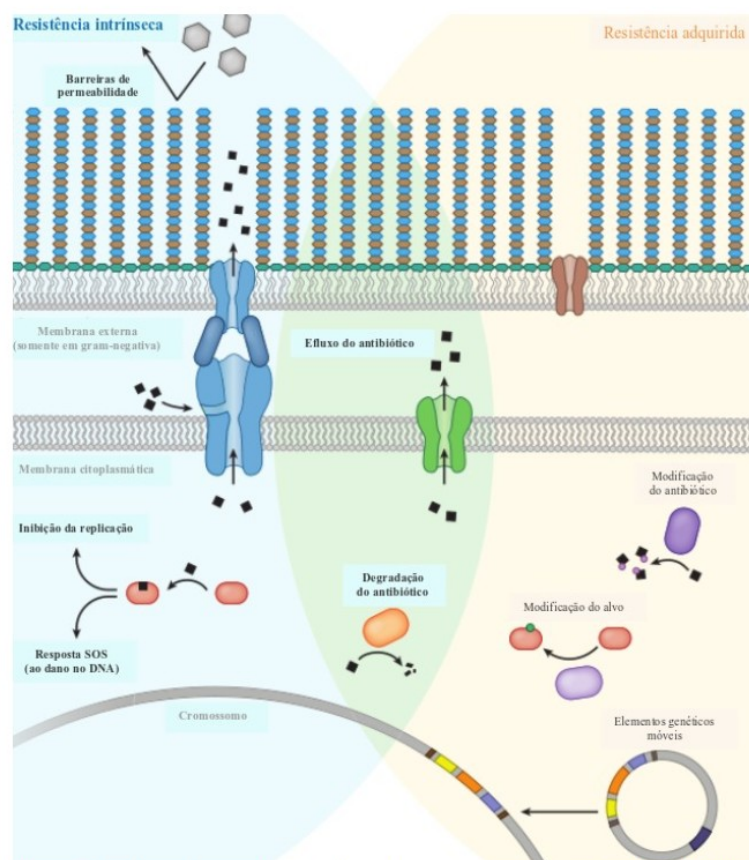


Figura 2: Mecanismos de resistência bacteriana contra a ação de antimicrobianos (Fonte: Adaptado de Surette & Wright, 2017).

A grande quantidade de mecanismos que atuam para bloquear a ação de antimicrobianos e o surpreendente número de espécies bacterianas no planeta, estimada em 10^{12} espécies de 96 filos, conspira para tornar este um obstáculo à descoberta de antimicrobianos (Surette & Wright, 2017).

Como um importante mecanismo de patogenicidade das bactérias, está o biofilme, representando comunidades bacterianas estruturadas por matrizes biológicas, considerado um desafio frente ao controle da resistência a antimicrobianos (Frieri, Kumar & Boutin, 2017). Biofilmes representam uma comunidade de microrganismos que aderem a superfícies bióticas ou abióticas, através da formação de uma matriz (Hall & Mah, 2017). Combater esta organização de células requer o uso de altas doses de antimicrobianos, que pode falhar e contribuir para a persistência da infecção (Frieri, Kumar & Boutin, 2017).

A Organização Mundial da Saúde (OMS), a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) e a Organização Mundial da Saúde Animal (OIE) desenvolveram recomendações a respeito do nível de importância dos antimicrobianos para a saúde humana, para isto, categorizaram os antimicrobianos em áreas específicas, como os importantes, os de alta importância e os de importância crítica (Quadro 1), a fim de priorizar os riscos e gerenciar estratégias para conter a RAM (WHO, 2017).

Diversas bactérias estão envolvidas com a ocorrência de infecções em humanos, principalmente, *Enterococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp, que são coletivamente nomeadas “ESKAPE”, que recentemente ganharam atenção mundial, uma vez que foram reconhecidas como prioridade na atenção à resistência a antimicrobianos, por desenvolverem altos níveis de multidroga resistência, limitando opções terapêuticas e aumentando a morbidade e mortalidade (Founou, Founou & Essack, 2017).

A população mundial está em torno de 7,6 bilhões de pessoas, e se estima que em 2050 este número cresça para 9,7 bilhões de habitantes (Jayarao, Almeida & Oliver, 2019), e segundo o Antimicrobials Working Group (2019) a falha na resolução do grave problema de RAM acarretará em 10 milhões de mortes por ano em 2050, e um custo de 100 trilhões de dólares nos cuidados com a saúde.

A infraestrutura da produção de alimentos de origem animal aumentou consideravelmente o uso de antimicrobianos durante o século 20 (Scott *et al.*, 2019), objetivando o combate de doenças e a melhora da performance animal, como exemplo, na criação de gado, onde os antimicrobianos são usados extensivamente no combate a mastite, caracterizada por uma infecção nos úberes, que reduz a morbidade e mortalidade dos animais

e a incidência de doenças, produzindo nutrientes de alta qualidade e consequentemente reduzindo os custos do alimento para o consumo humano (Jayarao, Almeida & Oliver, 2019).

A ocorrência de RAM a partir do uso exarcebado de antimicrobianos na produção de alimentos gera impacto no tratamento de doenças, afetando também a saúde humana, a fim de contornar esta situação, vários países tem implementado programas que visam a completa ou parcial proibição de antimicrobianos, a redução da quantidade administrada, além da desapropriação de antimicrobianos considerados críticos para a saúde humana, contribuindo assim, para prevenção e controle da RAM (Jayarao, Almeida & Oliver, 2019).

Os antimicrobianos podem atuar como um fator ecológico de mudança no meio ambiente, desencadeando alterações na estrutura das comunidades bacterianas, que podem desaparecer ou sofrer inibição (Grenni, Ancona & Barra Caracciolo, 2018).

A proliferação de bactérias resistentes a antimicrobianos (ARBs) aumenta a migração, transformação e difusão da RAM entre bactérias ambientais, que podem se tornar reservatórios naturais para genes de resistência a antimicrobianos (ARGs), e combinado às características físico-químicas do ambiente podem resultar em um dano ecológico pior que aquele causado por poluentes químicos, já que são fáceis de se disseminar e mais difíceis de eliminar ou controlar. ARGs e ARBs tem sido isolados de águas residuais, solo, sedimento, aquacultura, rios, oceanos e do gelo (Gao *et al.*, 2018).

As águas residuais, especialmente oriundas de hospitais, que de modo geral contém excretas, bactérias patogênicas e comensais, alta taxa de nutrientes, antimicrobianos e metais pesados são importantes reservatórios de ARBs e ARGs, estimulando investigações sobre o risco de disseminação de ARGs a partir da reutilização de efluentes de águas residuais na irrigação (Ng *et al.*, 2017).

Estrume utilizado como adubo no solo representa uma das principais rotas de disseminação de ARBs e ARGs no meio ambiente, bactérias presentes no solo podem transferir estes genes para patógenos humanos, os fatores que contribuem para esta disseminação e persistência ainda não estão esclarecidos, já que este é um ambiente de interações bióticas e abióticas complexas (Pérez-Valera *et al.*, 2019).

O escoamento de resíduos da agricultura, do esgoto e a lixiviação do solo para os rios, tornam estes ambientes suscetíveis a contaminação por antimicrobianos, causando impactos aos microrganismos prístinos, e consequentemente, aumentando o risco da proliferação de ARBs e ARGs, uma vez que, as bactérias podem ser inativadas pela luz do sol, porém os genes persistem e podem ser transferidos para cepas não resistentes. A persistência de RAM

nos rios é preocupante, principalmente, para pessoas que dependem deste ambiente como fonte de consumo, de alimento e irrigação (Nnadozie & Odume, 2019).

Águas residuais contendo antimicrobianos e microplástico podem contribuir para a seleção de ARBs nos rios, já que, os rejeitos plásticos auxiliam a maior transferência de ARGs entre as bactérias, uma vez que abrigam ARBs por meio da formação de biofilmes (Parthasarathy *et al.*, 2019).

Embora a RAM tenha sido relacionada a atividade antropológica, vários tipos de ARBs e ARGs foram detectados em ambientes geograficamente isolados, como núcleos de neve, gelo na superfície da geleira, cavernas isoladas, profundezas do mar, águas marinhas antárticas e em pinguins, portanto, a resistência a antimicrobianos e os genes associados são onipresentes e antigos, provavelmente porque a maioria dos antimicrobianos são derivados de microrganismos ambientais (Tan *et al.*, 2018).

1.1.3.1 Resistoma e Mobiloma

O resistoma é caracterizado por um conjunto de ARGs em diferentes ecossistemas microbianos (Lanza *et al.*, 2018), incluindo ambientes que abrigam microrganismos não-infecciosos. O solo é o ambiente que representa o maior reservatório de ARGs e é a fonte de sua diversidade, animais selvagens e domésticos também são fonte de ARGs que podem ser compartilhados entre humanos e causar doença, resultando no fluxo gênico de organismos comensais a patógenos (Surette & Wright, 2017).

Os riscos associados à resistomas ambientais devem levar em consideração três perspectivas, a primeira a nível da comunidade microbiana, que representa a evolução da resistência a antimicrobianos que pode ser oriunda de fatores exógenos, como contaminantes químicos e condições físicoquímicas, a segunda a nível do genoma, que foca nos genes que podem conferir RAM e em seu potencial de transferência horizontal, e a terceira a nível da transmissão do resistoma, que se refere a transmissão de ARBs e ARGs do ambiente aos humanos (Manaia, 2017).

Genes de transferência horizontal são a principal causa da rápida disseminação de ARGs entre células bacterianas, esta transferência pode ocorrer por três mecanismos, a conjugação onde elementos genéticos móveis (MGEs) são transmitidos a outras células bacterianas através do contato entre suas paredes celulares, a transformação, quando as bactérias incorporam ao seu material genético DNA exógeno, e a transdução, quando as

células bacterianas são infectadas por vírus, os bacteriófagos, que carregam DNA exógeno (Lekunberri, Balcázar & Borrego, 2018).

A transferência de ARGs é mediada por uma variedade de MGEs, como os integrons, transposons, plasmídeos, sequência de inserção com região conservada (ISCR), elementos conjugativos e integrativos (ICE) e bacteriófagos (Lekunberri, Balcázar & Borrego, 2018), o conjunto destes elementos é classificado como mobiloma (Martínez *et al.*, 2017).

O desenvolvimento de ARGs em microrganismos não patogênicos e/ou ambientais, não significaria um risco iminente à saúde humana, porém, quando estes genes estão associados a MGEs, este grupo de organismos se tornam relevantes aos humanos, uma vez que, estes genes poderão ser transferidos para microrganismos patogênicos (Martínez *et al.*, 2017).

Evidências apontam a presença de genes de resistência em amostras de sedimento antes do “período ouro”, conferindo resistência a β -lactâmicos, a tetraciclina e antimicrobianos glicopeptídeos, ou ainda multidroga resistente, isto indica que os ARGs já eram encontrados no meio ambiente pristino, porém eram raros em bactérias patogênicas (Wright, 2019).

Excrementos de gado e efluentes hospitalares contém ARGs contra antimicrobianos de último recurso que podem ser transmitidos aos humanos, como exemplo do alto risco de transmissão destes genes, o gene de resistência a colistina *mcr-1* foi primeiro encontrado em *Escherichia coli* (*E. coli*), de um isolado de porco em 2015 na China, este elemento é encontrado em diversos tipos de plasmídeos (IncI2, IncHI2 e IncX4) e pode ser disseminado no ambiente hospitalar, atualmente existem outras variáveis deste gene, *mcr-2* a *mcr-8*. A China e o Brasil eliminaram o uso da colistina na agricultura, porém, a resistência a esse fármaco se mantém presente, devido sua ampla disseminação (Zeng *et al.*, 2019).

Yadav & Kapley (2019) identificaram ARGs conferindo resistência a aminoglicosídeos, β -lactâmicos, Eritromicina, Meticilina, Fluoroquinolonas, Rifampicina, Trimetoprim, em efluentes de usinas de tratamento de esgoto, além de, bombas de efluxo multidroga resistente em *Campylobacter jejuni* e resistência a Meticilina em *Staphylococcus* spp. MGEs também foram detectados, como o plasmídeo IncP-1 e transposons, que resultam em um ilimitado rearranjo genético possibilitando o surgimento de novas resistências, configurando este ambiente de ampla influência antropológica, propício a disseminação de ARBs, ARGs e MGEs ao meio ambiente (Yadav & Kapley, 2019).

Em um estudo de metanálise se observou grande diversidade de ARGs em lagos, com altas proporções de ARGs associados a plasmídeo no sedimento, grande abundância de

integron (intI1) e ISCR, ressaltando que estes ambientes sofreram a ação de efluentes do tratamento de rejeitos (Yang *et al.*, 2018).

A abundância total de RAM depende dos parâmetros locais para que os ARGs sejam disseminados pelo mundo, isto sugere que, melhorar o saneamento, os cuidados com a saúde e a educação são estratégias efetivas para limitar este problema global (Hendriksen *et al.*, 2019).

1.2 METAGENÔMICA

1.2.1 Metagenômica aplicada a identificação do resistoma

Recentemente, cresceu o interesse em utilizar a metagenômica para avaliar a resistência a antimicrobianos, tanto na microbiota humana como em diferentes ambientes (Ng *et al.*, 2017), onde anteriormente, era avaliada somente por meio da análise da concentração inibitória mínima (MIC) do microrganismo em cultivo (Hall & Mah, 2017).

A metagenômica têm como benefício permitir avaliar milhares de genes de resistência em uma única amostra, bem como, a quais espécies bacterianas eles estão envolvidos, possibilitando ainda, a determinação de novos genes de interesse, assim, este método é reconhecido como superior aos métodos convencionais (Hendriksen *et al.*, 2019).

Um importante problema dos métodos convencionais é a baixa sensibilidade e/ou especificidade, tanto na detecção do resistoma como de possíveis variantes alélicas, em vista disso, o uso de tecnologias de sequenciamento baseadas na captura ou na determinação do alvo, representam estratégias metodológicas de efetivo custo-benefício e alto rendimento (Lanza *et al.*, 2018).

É de grande importância o estudo de metagnômica do resitoma ambiental, visto que, cerca de 25-75% dos antimicrobianos administrados nos animais são excretados no meio ambiente, resultando no aumento da quantidade de ARGs, a OMS indica que novos mecanismos de resistência estão surgindo, ameaçando o tratamento de doenças infecciosas comuns (Zhou *et al.*, 2019).

Os antimicrobianos liberados no meio ambiente pressionam seletivamente as bactérias do meio, favorecendo o aumento da resistência a antimicrobianos, e a metagenômica é utilizada como método para correlacioar os patógenos e os ARGs (Zhou *et al.*, 2019), bem como, para determinar novos resistomas do meio ambiente (Willms *et al.* 2019).

É reconhecido que os antimicrobianos não podem ser completamente metabolizados por humanos e animais, e alguns são excretados em seu estado original, o que proporciona a ocorrência acelerada de ARGs e ARBs em diversos ambientes, como a água, sedimento, esgoto, solo e ar (Hu *et al.*, 2018).

A disseminação de ARGs no ambiente aquático se tornou um tema amplamente debatido, devido sua associação com a ineficiência do tratamento antimicrobiano contra algumas infecções, esta disseminação ocorre não exclusivamente através da poluição química, mas também devido a rápida dispersão destes genes, mediada pela presença de MGEs em bactérias (Jiang *et al.*, 2018).

ARGs já foram isolados em diversos ambientes aquáticos, como em reservatórios, rios e lagos, incluindo aqueles fonte de uso humano, e oceanos, as diferentes condições hidrogeoquímicas e biológicas encontradas nestes ambientes estão relacionadas a presença de distintos ARGs, influenciando o transporte, manutenção, amplificação e atenuação destes genes neste ecossistema (Jiang *et al.*, 2018).

1.3 USINA HIDRELÉTRICA TUCURUÍ

O projeto de construção da usina hidrelétrica (UHE) Tucuruí (Figura 3) iniciou no ano de 1973, durante a ditadura militar, e sua primeira fase foi concluída e inaugurada em 1984 com metade de sua potência, e em meados de 2010 a segunda fase foi entregue, com 23 turbinas e potência máxima (Bortoni *et al.*, 2019), sua extensão total é de 3.007 km, correspondendo a 304 campos de futebol, sua construção foi iniciada antes da lei que exige a realização do avaliação de impacto ambiental (EIA), criada em 1988, assim, o alcance do lago foi imprevisível, atingindo cerca de 32 mil pessoas que foram deslocadas de seus locais de origem (Pompeu *et al.*, 2019).

A UHE Tucuruí é a segunda maior hidrelétrica plenamente brasileira, perdendo apenas para Belo Monte, no município de Altamira-PA, e a quinta maior do mundo, produzindo cerca de 8 Gigawatt-hora (GW/h) de energia (Pena, 2019), está situada na bacia do rio Tocantins, no município de Tucuruí-PA, a 310 km de Belém (Campos, 2019). Após sua conclusão, esta barragem causou a inundação de 2.430 km², o que gerou o deslocamento da população local, a proliferação de insetos e a incidência de doenças endêmicas, como a malária, em contrapartida, esta UHE passou a fornecer eletricidade para grande parte do país (Arrifano *et al.*, 2018).



Figura 3: Usina Hidrelétrica Tucuruí (Fonte: Bortoni et al., 2019).

O lago artificial de Tucuruí, segundo maior reservatório do país, abaixo apenas de Sobradinho, na Bahia, com 4.214 km², modificou o ecossistema da região, ocupando grande parte da floresta tropical nativa (Silva *et al.*, 2017), submergindo cerca de 14 povoados ribeirinhos (Montoya, 2018), com 100 km de extensão e 18 km de largura (Almeida, 2019). O reservatório da UHE Tucuruí abrange sete municípios do estado do Pará: Breu Branco, Goianésia do Pará, Itupiranga, Jacundá, Nova Ipixuna, Novo Repartimento e Tucuruí (Figura 4) (Yoshino, 2017).

O reservatório de Tucuruí é dividido por pelo menos 11 estações dispostas no quadro 2 e na figura 5, que representam as diferenças de morfometria do sistema, o qual influencia diretamente a circulação e o fluxo de água na região (Silva, 2018).

A população no entorno do reservatório têm estreita relação com o lago, que lhes fornece alimento, água para consumo, deslocamento e recreação (Yoshino, 2017). Mesmo após o início das atividades da UHE Tucuruí a pesca continuou a ser praticada, com grande importância econômica e social, principalmente à população local (Flexa, Silva & Cintra, 2016).

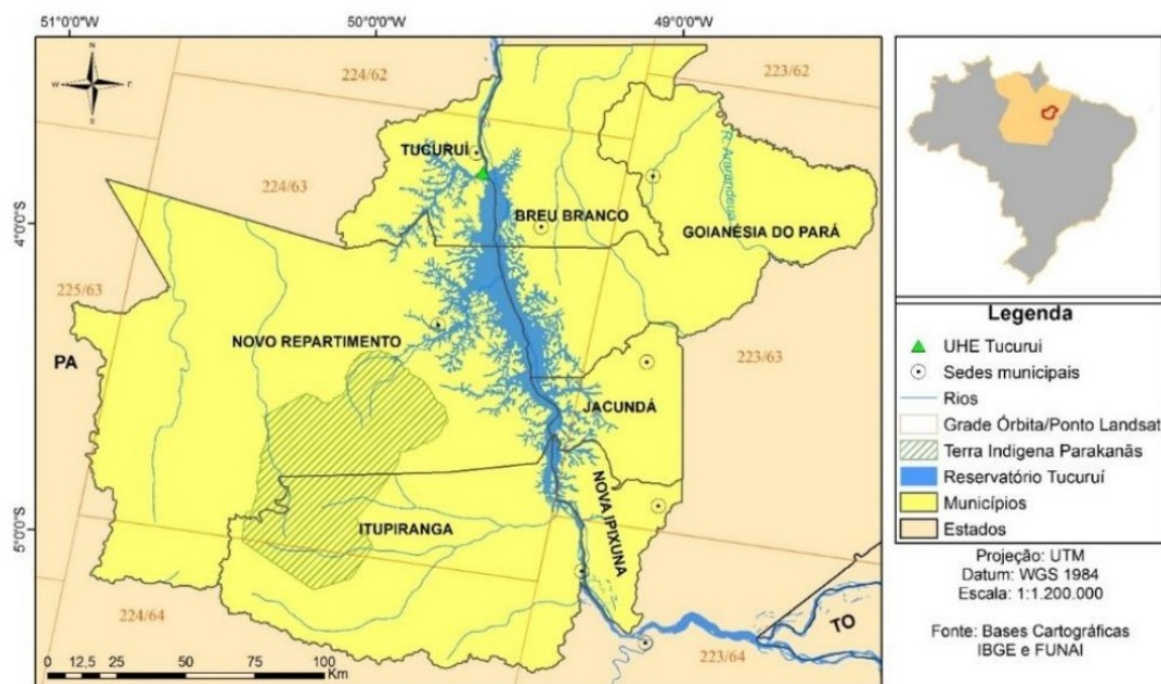


Figura 4: Localização da UHE Tucuruí, seu reservatório, bem como os municípios afetados por sua construção (Fonte: Montoya, 2018).

Quadro 2 - Estações do lago da UHE Tucuruí, suas localizações e profundidades máximas alcançadas.

Estação	Nome	Região	Profundidade Máxima (metros)
C1	Caraipé 1	Ilha	28
C2	Caraipé 2	Ilha	22
M1	Montante 1	Próxima da barragem	70
M3	Montante 3	Lago – Canal central	52
MR	Montante Novo Repartimento	Lago – Esquerda do banco da barragem	20
MBB	Montante Breu Branco	Próxima da barragem	32
ML	Montante Lontra	Lago – Canal central	22
MBL	Montante Belauro	Lago – Direita do banco da barragem	26
MP	Montante Pucuruí	Lago – Esquerda do banco da barragem	20
MJV	Montante Jacundá Velho	Lago	22
MIP	Montante Ipixuna	Distante da barragem	42

Fonte: Adaptado de Silva, 2018.

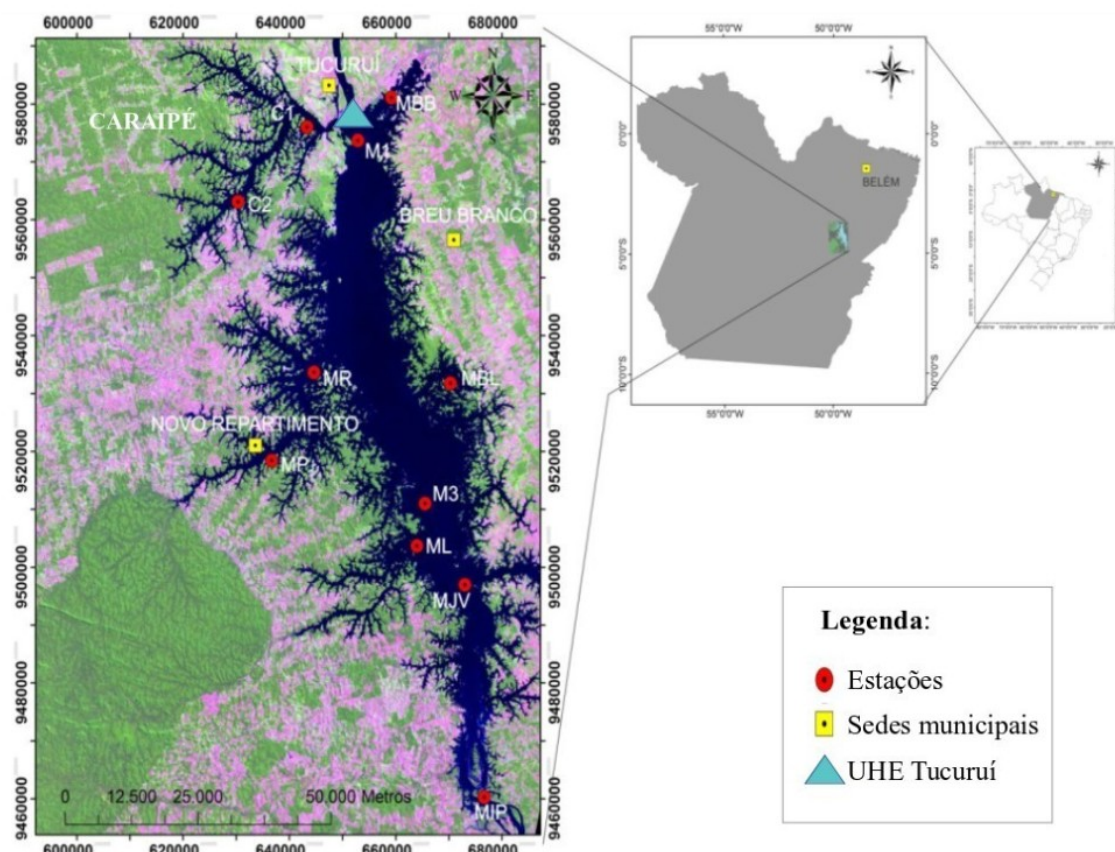


Figura 5: Localização do reservatório da UHE Tucuruí e de suas estações (Fonte: Adaptado de Silva, 2018).

Desde o início dos anos 90, cerca de 6.000 pescadores atuam no reservatório, movimentando R\$ 4,2 milhões por ano, suas espécies locais alvo são o Mapará, a Pescada e o Tucunaré, onde esta última é a espécie mais importante para a população, já que é a base do consumo local e da fonte de renda (Almeida, 2019).

Apesar dos avanços energéticos e de infraestrutura, a instalação da UHE Tucuruí causou inúmeros impactos negativos, principalmente a baixa produtividade das ilhas dos municípios que ficam à jusante da barragem, como no município de Cametá, implicando na queda da produção de frutos, como do cacau e do açaí, a extinção de algumas espécies de peixes, a poluição da água e o assoreamento do rio Tocantins, além disso, houve um aumento da incidência de doenças (Pompeu *et al.*, 2019).

Um dos principais impactos gerados pela construção de UHEs é o acúmulo e transporte de espécies químicas de mercúrio (Hg) nos reservatórios (Pestana *et al.*, 2019), o que pode desencadear mecanismos de co-seleção nestes ambientes. Apesar da região de Tucuruí não ser afetada diretamente por garimpos que utilizam mercúrio (Arrifano *et al.*,

2018), a inundação de áreas previamente cobertas por vegetação, como o que ocorre a partir da construção de UHEs, cria condições que favorecem a conversão de Hg em suas espécies químicas mais tóxicas, o metilmercúrio (MeHg) (Pestana *et al.*, 2019).

Na região de Tucuruí já foram observados níveis significativos de Hg na água e no sedimento, nas raízes de plantas flutuantes, nos peixes, como o Tucunaré, e níveis deste metal e de MeHg acima dos limites recomendados pela OMS, em habitantes que vivem próximos da barragem (Arrifano *et al.*, 2018).

Os metais pesados têm sido relacionados com a propagação da resistência a antimicrobianos, por meio de mecanismos de co-seleção (Fang *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2019), alcançados pela co-resistência ou resistência cruzada, o que representa um risco de transferências horizontais para patógenos humanos bacterianos distantemente relacionados (Imran, Das & Naik, 2019), uma vez que, a resistência a antimicrobianos ocorre não exclusivamente por pressão dos antimicrobianos, mas ainda, devido aos contaminantes do meio (Knapp *et al.*, 2017).

Com o objetivo de subverter estes impactos, originam-se as reservas de desenvolvimento sustentável, a fim de, preservar o meio ambiente, a qualidade de vida, valorizando, conservando e aperfeiçoando as técnicas de manejo dos recursos naturais das populações locais, assim, surgiu a Reserva de Desenvolvimento Sustentável Alcobaça, criada pela Secretaria Estadual de Meio Ambiente, Lei Estadual Nº 6.451 de 08 de Abril de 2002, localizada nos municípios de Tucuruí e Novo Repartimento, para conservar a biodiversidade degradada pelas obra de construção da UHE Tucuruí, e para atenuar os múltiplos conflitos territoriais locais, decorrentes da implantação deste empreendimento (Almeida, 2019).

1.4 IMPORTÂNCIA DA AVALIAÇÃO DO RESISTOMA EM LAGOS DE INTENSA AÇÃO ANTROPOLÓGICA GERADOS PELA CONSTRUÇÃO DE UHEs

Os lagos são ambientes importantes para investigar a contaminação por antibacterianos, bem como, para o estudo da disseminação dos ARGs, tanto na água quanto no sedimento (Yang *et al.*, 2019).

A maioria das populações urbanas e rurais na Amazônia brasileira não apresenta saneamento básico, associado a isto, a construção de barragens desencadeia diversos problemas de contaminação da água, representando riscos à saúde humana (Gauthier *et al.*, 2019). Como exemplo da carência de saneamento na região, o município de Tucuruí

apresentou somente 15% de esgotamento sanitário adequado, segundo o último censo do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2010).

Karkman, Pärnänen & Larsson (2019), identificaram uma correlação positiva entre a poluição fecal e a abundância de ARGs na água do rio, uma vez que, o esgoto atua como uma importante fonte de disseminação de ARBs e ARGs para o meio ambiente, já que águas residuais não tratadas contém bactérias oriundas de humanos, animais e do ambiente que podem se associar a antimicrobianos e agentes co-seletivos.

Além da falta do tratamento de rejeitos, o comportamento humano contribui para o agravamento de contaminantes do sedimento fluvial, a partir do descarte inadequado de resíduos de pesticidas, antimicrobianos, metais pesados e poluentes orgânicos, que influenciam a diversidade e estrutura das comunidades de *archaeas* e bactérias (Wang *et al.*, 2018).

Os rios urbanos representam os ambientes mais envolvidos na disseminação e persistência de antimicrobianos e de ARBs, ambos oriundos de efluentes de águas residuais não tratadas, o que pode incluir bactérias patogênicas oportunistas, tornando assim, este um ecossistema favorável à troca horizontal de MGEs, que transferem genes de resistência a antimicrobianos, entre o material fecal e bactérias de água doce (Proia *et al.*, 2018).

A ocorrência de efluentes de águas residuais no leito dos rios é frequentemente facilitada durante o período de chuvas, uma vez que, o bloqueio do esgoto pela falta de infraestrutura adequada causa o transbordamento desses efluentes, o que aumenta a incidência de ARGs nesses ambientes (Williams *et al.*, 2022).

A quantidade de ARBs é extremamente alta em muitos rios, cerca de 98% das bactérias identificadas nos rios albergam ARGs, seguido de lagos com 77% das bactérias, em contrapartida, barragens, apresentam menos de 1% destas bactérias, uma das principais e mais preocupantes resistências é a resistência à β -lactamase de espectro estendido, produzida por MRSA e por *Enterococcus* resistente a vancomicina (VRE) (Nnadozie & Odume, 2019).

Tendo em vista o grande impacto gerado pela construção da UHE Tucuruí, que promoveu a rápida urbanização no entorno e consequentemente, a estreita relação da população com a água do reservatório, associado ao déficit no tratamento do esgoto no município, a disseminação de ARGs se torna assunto preocupante, transformando a região em alvo para estudos que elucidem e caracterizem a presença desses genes no reservatório Tucuruí.

Proia e colaboradores (2018) ressaltam a importância de investigar ARGs em água doce, para identificar possíveis estratégias de manejo que controlem e reduzam sua disseminação.

Devido a grande ação antropológica ao redor do reservatório de Tucuruí, deve-se levar em consideração a possível diversidade de ARGs, bem como, aqueles de relevância clínica e sua associação a MGEs, favorecendo sua disseminação, principalmente durante o período chuvoso.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o resistoma no reservatório da Usina Hidrelétrica Tucuruí de acordo com sua distribuição espacial e sazonal.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a distribuição dos ARGs;
- Quantificar a abundância de ARGs, incluindo aqueles de interesse clínico;
- Relacionar a presença de ARGs e MGEs no mesmo contexto genético;
- Associar a abundância e a disseminação de ARGs, principalmente os de interesse clínico, a sazonalidade regional.

3 CAPÍTULO 1 – ARTIGO: HIGH ABUNDANCE AND DIVERSITY OF ANTIBIOTIC RESISTANCE GENES DURING RAINFALL IN TUCURUÍ HYDROELECTRIC POWER PLANT LAKE.



High abundance and diversity of antibiotic resistance genes during rainfall in Tucuruí hydroelectric power plant lake

Journal:	<i>Genetics and Molecular Biology</i>
Manuscript ID	GMB-2022-0317
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	24-Oct-2022
Complete List of Authors:	Oliveira, Andreza; Universidade Federal do Pará Graças, Diego; Universidade Federal do Pará Baraúna, Rafael ; Universidade Federal do Para Silva, Artur; Universidade Federal do Pará
Keyword:	antibiotic resistance genes, metagenomics, hydroelectric power plant

High abundance and diversity of antibiotic resistance genes during rainfall in Tucuruí hydroelectric power plant lake

Antibiotic resistance in HPP

Andreza Paloma Góes Oliveira^{1*}; Diego Assis das Graças¹; Rafael Azevedo Baraúna¹; Artur Luiz da Costa da Silva¹

¹Laboratório de Engenharia Biológica, Parque de Ciência e Tecnologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Av. Augusto Corrêa, 01 - Guamá – Belém/PA – Brazil.

*Corresponding author: andrezapgo@gmail.com (<https://orcid.org/0000-0001-5190-610X>)

ABSTRACT

Tucuruí is the second largest entirely Brazilian hydroelectric power plant (HPP), the artificial lake modified the ecosystem of the region. Many pathogenic and free-living microorganisms harboring Antibiotic Resistance Genes (ARGs) are adapted to live in aquatic habitats, which makes rivers possible sources of ARGs. This work aims to describe the occurrence of ARGs according to spatial and seasonal variability in the lake of Tucuruí HPP. The samples were collected from the Photic, Aphotic and Sediment layers of the Montante 1 and Montante Novo Repartimento stations, during the Amazon's summer and Amazon's winter. The DNA samples were extracted and sequenced in the Ion Proton platform for the whole metagenomic analysis. Megahit performed de novo assembled in the reads, the ORFs were predicted by Prodigal, and the ARGs were obtained from CARD and MEGARES. The ARG-carrying contigs were generated for downstream analysis. The statistical analysis was evaluated on the R and the package ggplot2 was used. The Amazonian winter and the water surface presented significant abundances and diversity of ARGs in the lake of the Tucuruí HPP, indicating that the human influence on this lake represents one of the reasons for concern about the spread of these genes.

Keywords: antibiotic resistance genes; metagenomics; hydroelectric power plant.

INTRODUCTION

The hydroelectric power plants (HPPs) construction project stimulates debate on economic, social, and environmental issues, the positive economic impacts are related to the improvement of infrastructure, with the construction of roads, contributing to urban development and increasing local income, and the negative points are the loss of agriculture productivity and fisheries (Faria *et al.*, 2017).

The intense anthropic activities over the Brazilian Amazon basin during the 70s were accompanied by the growth of the national economy and the construction of HPPs (Silva Junior *et al.*, 2018).

Tucuruí is the second largest entirely Brazilian HPP and the fifth largest in the world, the artificial lake, with 4,214 km², modified the ecosystem of the region, occupying much of the native tropical forest (Silva *et al.*, 2017), with 100 km of length and 18 km of width (Almeida, 2019), submerging about 14 riverside villages (Montoya, 2018).

The Tucuruí reservoir is divided into at least 10 stations representing the differences in morphometry of the system, which directly influence the circulation and flow of water in the region (Silva, 2018).

The population around the reservoir has a close relationship with the lake which provides them with food, water for consumption, displacement, and recreation (Yoshino, 2017). Even after the beginning of activities at the Tucuruí HPP fishing continued to be practiced, with great economic and social importance, especially for the local population (Flexa *et al.*, 2016).

The seasonal variation in precipitation in the State of Pará is characterized by a rainy season, which in most locations, as in Tucuruí-Pará, comprises the months from December to May, and a dry season, which generally corresponds to the period from June to November (Hoffmann *et al.*, 2018).

Many pathogenic and free-living microorganisms are adapted to live in aquatic habitats, which makes rivers possible sources of antibiotic resistance genes (ARGs), mainly in those with intense human interference (Reichert *et al.*, 2021).

In addition, levels of ARGs demonstrated a correlation with sewage markers in rivers of intense anthropic action, associated with known human pathogens and rainfall (Peng *et al.*, 2019; Williams *et al.*, 2022).

Knowing that Tucuruí had only 15% of adequate sanitary sewage, according to the

latest census by the Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE, 2010), like most urban and rural populations in the Brazilian Amazon that do not have adequate sanitation (Gauthier *et al.*, 2019), suggesting that wastewater from sewage human are dispersed in the lake of Tucuruí HPP, aided by the flow of these tailings to the river bed during the rainy season, representing a risk for the public health of dissemination of bacteria harboring ARGs in this environment.

This work aims to describe the abundance and diversity of ARGs and their potential for dissemination according to spatial and seasonal variability in the lake of Tucuruí HPP.

MATERIAL AND METHODS

The water and sediment samples were collected in the lake of Tucuruí HPP from September/2015 to March/2017 in the Photic (P), Aphotic (A) and Sediment (S) layers of the Montante 1 (M1) and Montante Novo Repartimento (MR) stations (Figure 6) during the Amazon's summer (1) corresponding June to November sampling months and Amazon's winter (2) corresponding December to May sampling months.

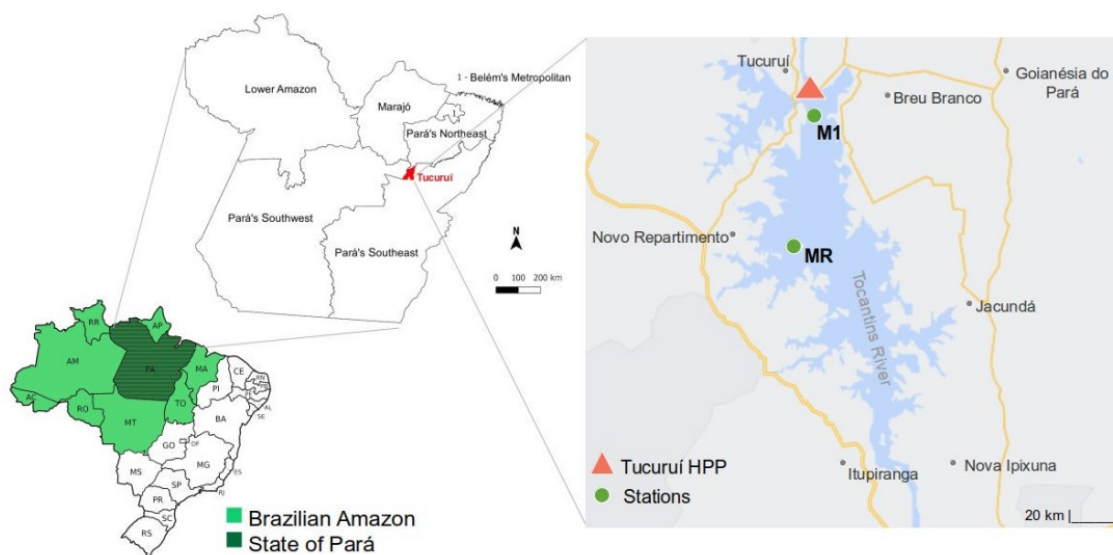


Figura 6: Map of the sampling with the marking of the HPP and the studied stations.

After filtering in a 0,22 μ M nitrocellulose membrane (Whatman, USA), the DNA samples were extracted using the UltraClean Microbial kit[®] (Qiagen). The Whole Metagenome Sequencing (WMS) was performed on the Ion Proton[™] platform (Thermo

Fisher Scientific) using a fragment library.

The reads were submitted to the tool FastX-toolkit v. 0.0.13 (-20/-1100/-q20/-p70) (Gordon & Hannon, 2010) for quality control, Spades v. 3.13.0 (Bankevich *et al.*, 2012) was performed for correct sequencing errors. Megahit v. 1.2.9 (Li *et al.*, 2015) tool was used during the *de novo* assembly, Open Reading Frames (ORFs) were predicted using Prodigal v. 2.6.3 (Hyatt *et al.*, 2010).

The ARGs were identified through the alignment tool Resistance Gene Identifier (RGI) v. 5.2.0 with the Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD) v. 3.1.4 (Alcock *et al.*, 2020), October 2021 release, using BLASTX approach, perfect and strict algorithm, and the MEGARES database v. 2.0.0 (Lakin *et al.*, 2017), 14 October 2019, using TBLASTN approach, both results were merged and filtered by identity $\geq 80\%$ and coverage $\geq 40\%$.

The abundance (coverage, $\times/\text{Gb}$) of ARG-like ORFs in each sample was calculated in according to Ma *et al.* (2016), through the following formula:

$$\text{Abundance (coverage, } \times/\text{Gb)} = \sum_1^n \frac{N_{\text{mapped reads}} \times L_{\text{reads}} / L_{\text{ARG-like ORF}}}{S}$$

The ARG-carrying contigs (ACC) file was generated for downstream analysis, using Patric v. 3.6.12. Kraken2 (Davis *et al.*, 2020) was used for taxonomy prediction, and Plasmid Finder v. 2.1 (Camacho *et al.*, 2009; Carattoli *et al.*, 2014), for the identification of plasmids using the following parameters: Enterobacteriaceae, identity $\geq 80\%$ and coverage $\geq 40\%$. Plasmids found were classified about your mobility by MOB-Typer v. 3.0.3 (Robertson & Nash, 2018). SimpleSynteny v. 1.5 (Veltri *et al.*, 2016) was used to obtain the arrangement of ARGs and plasmid.

The heatmap was generated by Morpheus (Broad Institute, 2022) and the statistical analysis was evaluated on the R and the package ggplot2 was used (Allaire, 2011).

RESULTS

After the assembly, 4,453 ARG-like ORFs originated from 2,409 ACCs distributed in the 12 samples were recorded (Table S1). The taxonomy profile showed that the ARGs were related to Proteobacteria mainly in M1P1, M1A1, M1P2, MRP2, and MRA2, with

frequencies upper to 70%, whereas the other samples showed similar frequencies of that bacteria phylum and the Terrabacteria group, each down to 40%.

ARG-like ORFs were more frequent in samples M1P1 (6.79%) and M1A1 (2.74%) (Table S1) than in the other samples.

A total of 343 ARG subtypes (Table S5) belonging to 25 ARG types were identified (Table S2). The greatest diversity of ARG subtypes was observed in samples from the MR station collected during the Amazon's winter ($\chi^2 = 33.93$, $df = 1$, $p\text{-value} = 5.73\text{e-}09$). Figure 7 shows the distribution and abundance of different ARG types in relation to the samples, with a range from 0.15 to 1274.39 x/Gb per sample. The most abundant ARG types in relation to the total samples were Beta-lactam (3,317.92 x/Gb), Macrolide-Lincosamide-Streptogramin (MLS) (1,079.77 x/Gb), Tetracycline (968.23 x/Gb), Aminoglycoside (779.25 x/Gb) and Multidrug (698.94 x/Gb) resistance genes (Table S3).

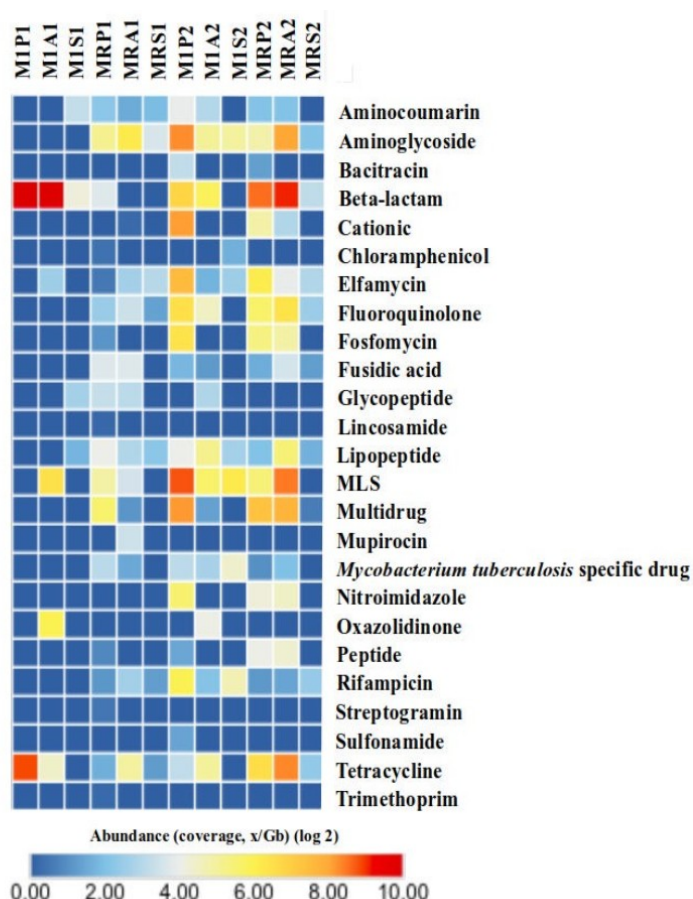


Figura 7: Composition and abundance of different ARG types in relation to the collections carried out in the Photic (P), Aphotic (A) and Sediment (S) layers of the M1 and MR stations in Tucuruí HPP, during the Amazon's summer (1) and winter (2). Abundance values were transformed using log of 2. MLS: macrolide-lincosamide-streptogramin.

The Kruskal-Wallis rank sum test indicated that the ARG types abundances were highly significant ($\chi^2 = 64.01$, $df = 11$, $p\text{-value} = 1.65\text{e-}09$), and the sample M1P2 was significantly in relation to all the others samples in the Wilcoxon rank sum test ($W \geq 416.50$, $p\text{-value} \leq 0.03$), except with MRP1 ($W = 216$, $p\text{-value} = 0.06$), MRP2 ($W = 361$, $p\text{-value} = 0.35$) and MRA2 ($W = 336.50$, $p\text{-value} = 0.64$) (Figure 8).

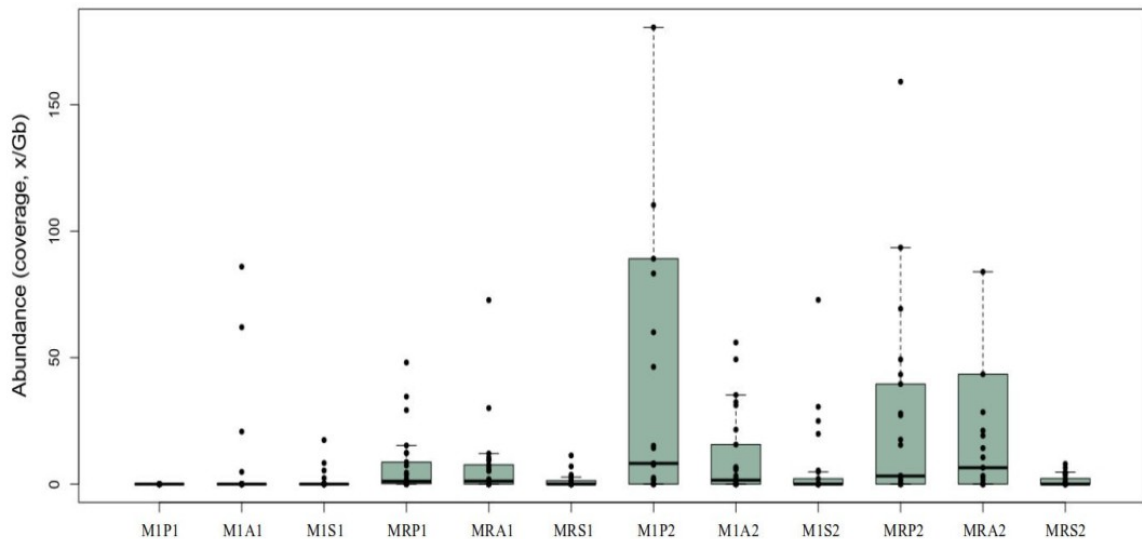


Figure 8: Comparison of the total ARG types abundances among different samples (outline = False) (Kruskal-Wallis rank sum test: $\chi^2 = 64.01$, $df = 11$, $p\text{-value} = 1.65\text{e-}09$).

In addition, the samples collected in the sediment layer were equal to each other ($W \leq 296$, $p\text{-value} \leq 0.19$) and statistically significant when compared with all the other samples ($W \geq 406$, $p\text{-value} \leq 0.04$) (Figure 8).

The total abundance of clinically important ARGs subtypes (at least one dose per day) (Zhang *et al.*, 2022), in relation to Beta-lactam and Multidrug ARG-types distributed in the different samples was calculated (Table S4). The Kruskal-Wallis rank sum test was significantly different among all the samples ($\chi^2 = 55.57$, $df = 11$, $p\text{-value} = 6.09\text{e-}08$) (Figure 9). Wilcoxon rank sum test showed a higher incidence of Beta-lactam in the photic layer of M1 and MR stations during the the Amazon's winter ($W \geq 294$, $p\text{-value} \leq 0.04$). ORFs affiliated to the Multidrug resistance gene ARG type were more incidence in the same categories observed in Beta-lactam, in addition of the aphotic layer only in relation to MR station ($W \geq 138$, $p\text{-value} \leq 0.01$).

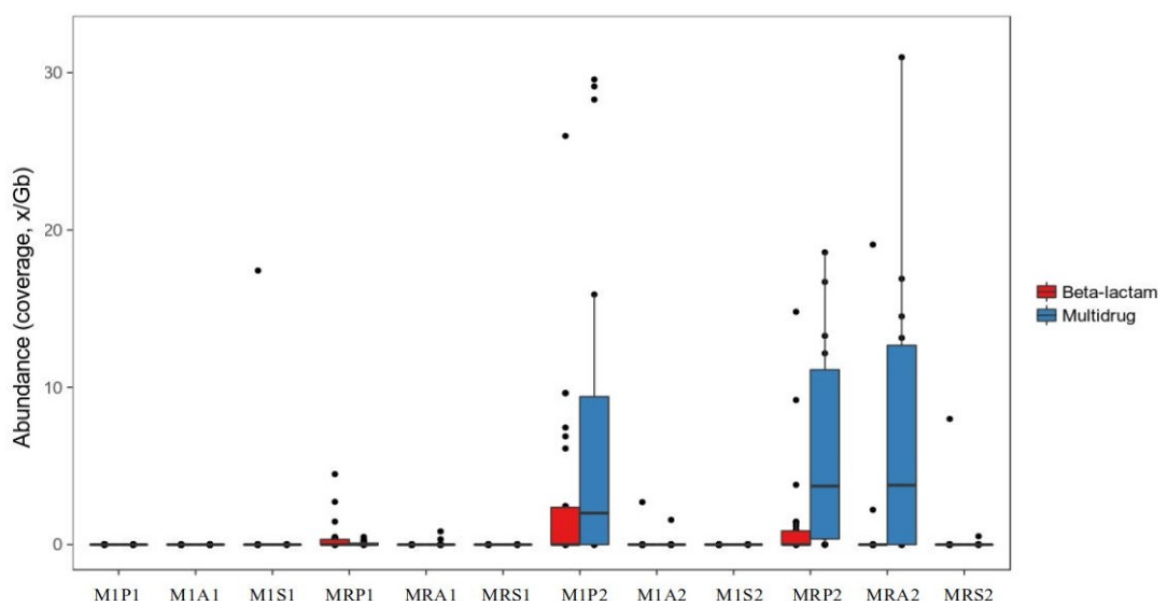


Figure 9: Comparison of the total clinically important ARGs subtypes abundances (at least one dose per day), in relation to Beta-lactam and Multidrug ARG types distributed in the different samples (outline = False) (Kruskal-Wallis rank sum test: $\chi^2 = 55.57$, $df = 11$, $p\text{-value} = 6.09e-08$).

The correlation of ARGs and plasmids was verified in M1P1, M1A1, and MRP2 (Figure 10), *bla*TEM-209, *bla*TEM-95, and *tetC* were found together with the ColRNAI plasmid, respectively, strongly indicating the transfer of these ARGs in these samples. The MOB-typer tool identified that only the plasmid related to *tetC* in MRP2 was predicted to be transferable.

Besides the correlation of ARGs and plasmid in the samples, was observed the association between the different ARGs, originating the clusters *mar*RA, *kpn*EF and *emr*RA in M1P2, MRP2, and MRA2, respectively (Figure 10).

DISCUSSION

According to the data presented in this study, human activity contributes to the spread of ARGs into aquatic ecosystems, as already observed by Laffite *et al.* (2020) and Gomes *et al.* (2021).

The growing of water pollution represent an urgent trouble for the river ecosystems from mainly anthropogenic activities such as domestic and hospital sewage, the pollution of this ecosystems may measure through clearly understand the distribution and transmission of ARGs (Xue *et al.*, 2021; Zou *et al.*, 2021).

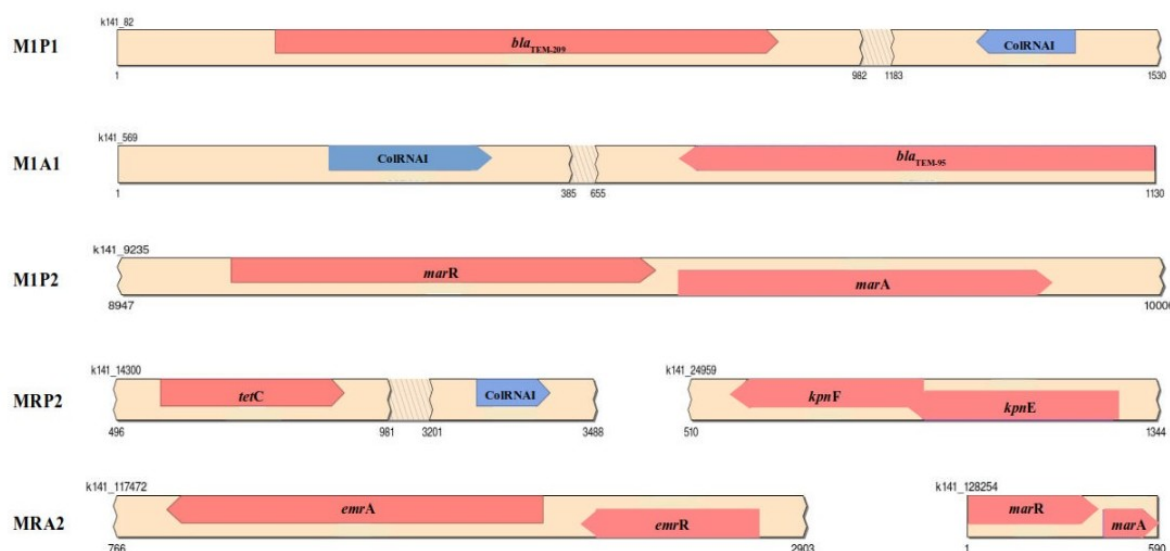


Figure 10: Co-association between ColRNAI plasmid replicon and ARGs, originating clusters in the specific samples.

The samples M1P1 and M1A1 showed a high abundance of Beta-lactam ARGs (Figure 2), 1,274.39 x/Gb for *bla*TEM-209 and 927.73 x/Gb for *bla*TEM-95, respectively, whilst in M1P2, MRP2 and MRA2 were observed high abundance of the most abundant ARG types of this study (Beta-lactam, MLS, Tetracycline, Aminoglycoside and Multidrug).

*bla*TEM was the most prevalent beta-lactam in the water sampled, independently of the hydroelectric station or the collection period, similar that found by Yu *et al.* (2018), the *tetC* was also widely distributed throughout these samples, same to work of Jia *et al.* (2021), which identified a large number of genes conferring resistance to tetracycline in a Brazilian river and in microbiota intestinal of an ornamental fish, indicating the need for greater attention to the dissemination of these ARGs in anthropogenic environments.

On the other hand, the high incidence of macrolide-resistant 23S ribosomal RNA (MLS23S), *rrs* e *marRA*, providing resistance, respectively, to the ARG-types MLS, Aminoglycoside and Multidrug, seems to be associated with water sampled during the Amazon's winter, as identified by Amarasiri *et al.* (2019) and Bianco *et al.* (2020).

Amazon's winter carries more diversity of ARG types (Figure 3), showing that the rainy season is the mainly influence of distribution and concentration of ARGs, corroborating with Peng *et al.* (2019), Wu *et al.* (2020), Rodríguez *et al.* (2021), Williams *et al.* (2022), indicating that high levels of ARGs in anthropogenic action environments represent a potential risk to human health following significant rainfall events (Williams *et al.*, 2022).

Williams *et al.* (2022) showed a significant relationship between sewage markers and ARGs at an Australian beach, collaborating with Rodríguez *et al.* (2021) that found endemic conditions, physicochemical and climatological parameters influencing the absolute abundance of several ARGs in wastewater samples taken from a wastewater treatment plants (WWTPs) in Colombia.

The inadequate sanitary sewage in Tucuruí suggests that besides the rainfall, the non-treatment wastewater raise the risk of contamination by ARGs, once the leaching process during the period of intense rains, commonly observed during the Amazon's winter, helps the flow of wastes to the river beds, and knowing that the Amazonian rivers represent sources of locomotion and food for the population, the risk of contamination turn an alert to public health.

According to the layers and stations collected, the high abundance of ARGs from these parameters was determined by Amazon's winter (Figure 3), once in M1 station only during this season the photic layer showed the most abundance, different of others layers in this station, whereas MR station during the rainfall the abundance between photic and aphotic layers did not differ significantly, on the other hand during the Amazon's summer ARGs abundance was bigger in photic layer than the aphotic.

Independent of station or season, ARGs abundance in the sediment layer did not differ from each other, but was significantly different from all others samples, standing out with the least amount of ARGs.

ARGs were more diverse and abundant in surface water than those in sediments, similar finding by Jiang *et al.* (2018) and Zou *et al.* (2021), but different of observed by Calero-Cáceres *et al.* (2017), that showed ARGs occurrence in sediment of a Spain river, persisting for long periods independent of precipitation, but the authors highlight the potential influence of the microbiome and the physicochemical stability of the river, mediated by the continuous discharge of sewage, in ARGs diversity and persistence.

The results of clinically important ARGs subtypes abundance (Figure 4) were similar to the total abundance of ARGs types in relation to the samples (Figure 3), with the highest abundance on M1P2, MRP2 and MRA2. Beta-lactams were verified more abundant in the photic and aphotic layers and Amazon's winter, independently of stations, while ARGs subtypes categorized by Multidrug resistance remained more abundant in the same season and layers of Beta-lactams, independently of stations. The sediment layers persist with the lowest abundance.

Similar in Isabela River, Dominican Republic, were multiples Beta-lactams were

founded by the behavior of inhabitants as well as the lack of infrastructure (Calderón *et al.*, 2021).

The presence of ARGs associated to ColRNAI plasmid replicon represent a strong evidence of transference of this genes, mainly in MRP2 (Figure 5), as shown by Sugita *et al.* (2021) and Xu *et al.* (2021), which observed *bla*KPC-2 and *tetA* transfer, respectively.

In addition, this study has verified the ARGs relation, *marRA* (61.33 x/Gb) representing transcription factors for multidrug resistance in M1P2, *kpnEF* (9.61 x/Gb) efflux pump involved in broad-spectrum antimicrobial resistance in MRP2 and *emrRA* (48.41 x/Gb) involved in efflux pump regulation in fluoroquinolone resistance in MRA2 (Figure 4).

To our knowledge, there are few studies on the spatial and seasonal variation of ARGs in artificial lakes formed by the construction of HPPs, our findings draw attention to the dissemination and persistence of ARGs in these environments so influenced by human action.

This study sought to draw public health attention to the importance of the correct treatment of sewage efflux in the Amazon region, since significant abundances and diversity of ARGs were identified in the lake of the Tucuruí HPP, mainly on the surface of the water and during the rainy season, showing strong evidence of transposition of these genes. The human influence on this lake began during the construction of the HPP and has intensified over the years, representing one of the reasons for concern about the spread of ARGs, since Tucuruí has low levels of adequate sanitation.

The Acknowledgements: We would like to acknowledge the Fundação Amparo e Desenvolvimento da Pesquisa – FADESP/UFPA, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação – PROPESP/UFPA, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES and Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular – PPGBM/UFPA.

Conflict of interest: The authors declare no conflicts of interest.

Author contributions: DAG, RAB and ALCS planned sampling locations, designed experiments and performed the samples sequencing, APGO analysed data and wrote the manuscript.

Supplementary Material: the following online material is available for this article:
Table S1 – Metagenomic datasets.

Table S2 – No. of ARG subtypes identified across samples.

Table S3 – Abundance of ARG types. MLS: macrolide-lincosamide-streptogramin.

Table S4 – Abundance of clinically important antibiotic resistance genes (ARGs).

Table S5 – ARGs identified.

REFERENCES

- Alcock BP, Raphenya AR, Lau TTY, Tsang KK, Bouchard M, Edalatmand A, Huynh W, Nguyen ALV, Cheng AA, Liu S *et al.* (2020) CARD 2020: Antibiotic resistome surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Research* 48(D1) D517–D525.
- Allaire J (2011) The R User Conference 2011. R Studio: Intergrated Development Environment For R 770 14.
- Almeida NDJR (2019) Alternativas De Manejo Pesqueiro No Lago Da Usina Hidrelétrica De Tucuruí/Pa. *Nova Revista Amazônica* 7(1) 243.
- Amarasiri M, Sano D and Suzuki S (2019) Understanding human health risks caused by antibiotic resistant bacteria (ARB) and antibiotic resistance genes (ARG) in water environments: Current knowledge and questions to be answered.
- Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Prjibelski AD *et al.* (2012) SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *Journal of Computational Biology*.
- Bianco K, Albano RM, de Oliveira SSA, Nascimento APA, dos Santos T and Clementino MM (2020) Possible health impacts due to animal and human fecal pollution in water intended for drinking water supply of Rio de Janeiro Brazil. *Journal of Water Supply: Research and Technology-Aqua* 69(1) 70–84.
- Calderón VV, Bonnelly R, Del Rosario C, Duarte A, Baraúna R, Ramos RT, Perdomo OP, Rodriguez FLE and Franco EF (2021) Distribution of Beta-Lactamase Producing Gram-Negative Bacterial Isolates in Isabela River of Santo Domingo Dominican Republic. *Frontiers in Microbiology* 11.
- Calero-Cáceres W, Méndez J, Martín-Díaz J and Muniesa M (2017) The occurrence of antibiotic resistance genes in a Mediterranean river and their persistence in the riverbed sediment. *Environmental Pollution* 223 384–394.
- Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K and Madden TL

- (2009) BLAST+: Architecture and applications. *BMC Bioinformatics* 10 1–9.
- Carattoli A, Zankari E, García-Fernández A, Larsen MV, Lund O, Villa L, Aarestrup FM and Hasman H (2014) In Silico detection and typing of plasmids using plasmidfinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58(7) 3895–3903.
- Davis JJ, Wattam AR, Aziz RK, Brettin T, Butler R, Butler RM, Chlenski P, Conrad N, Dickerman A, Dietrich EM *et al.* (2020) The PATRIC Bioinformatics Resource Center: Expanding data and analysis capabilities. *Nucleic Acids Research* 48(D1) D606–D612.
- Faria FAM, Davis A, Severnini E and Jaramillo P (2017) The local socio-economic impacts of large hydropower plant development in a developing country. *Energy Economics* 67 533–544.
- Flexa CE, Silva KCA and Cintra IHA (2016) Pescadores artesanais à jusante da usina hidrelétrica de tucuruí amazônia Brasil. *Boletim Do Instituto de Pesca* 42(1) 221–235.
- Gauthier C, Lin Z, Peter BG and Moran EF (2019) Hydroelectric Infrastructure and Potential Groundwater Contamination in the Brazilian Amazon: Altamira and the Belo Monte Dam. *Professional Geographer* 71(2) 292–300.
- Gomes S, Fernandes C, Monteiro S, Cabecinha E, Teixeira A, Varandas S and Saavedra MJ (2021) The Role of Aquatic Ecosystems (River Tua Portugal) as Reservoirs of Multidrug-Resistant *Aeromonas* spp. *Water* 2021 Vol. 13 Page 698 13(5) 698.
- Gordon A and Hannon GJ (2010) *Fastx-toolkit. FASTQ/A short-reads pre-processing tools.*
- Hoffmann EL, Dallacort R, Carvalho MAC, Yamashita OM and Barbieri JD (2018) Variabilidade das chuvas no Sudeste da Amazônia paraense Brasil. *Revista Brasileira de Geografia Física* 11(4) 1251–1263.
- Hyatt D, Chen GL, LoCascio PF, Land ML, Larimer FW and Hauser LJ (2010) Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics* 11(1) 119.
- Jia J, Gomes-Silva G, Plath M, Pereira BB, UeiraVieira C and Wang Z (2021) Shifts in bacterial communities and antibiotic resistance genes in surface water and gut microbiota of guppies (*Poecilia reticulata*) in the upper Rio Uberabinha Brazil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 211 111955.
- Jiang H, Zhou R, Zhang M, Cheng Z, Li J, Zhang G, Chen B, Zou S and Yang Y (2018) Exploring the differences of antibiotic resistance genes profiles between river surface water and sediments using metagenomic approach. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 161(May) 64–69.

- Laffite A, Al Salah DMM, Slaveykova VI, Otamonga JP and Poté J (2020) Impact of anthropogenic activities on the occurrence and distribution of toxic metals extending-spectra β -lactamases and carbapenem resistance in sub-Saharan African urban rivers. *Science of The Total Environment* 727 138129.
- Lakin SM, Dean C, Noyes NR, Dettenwanger A, Ross AS, Doster E, Rovira P, Abdo Z, Jones KL, Ruiz J, Belk KE, Morley PS and Boucher C (2017) MEGARes: An antimicrobial resistance database for high throughput sequencing. *Nucleic Acids Research* 45(D1) D574–D580.
- Li D, Liu CM, Luo R, Sadakane K and Lam TW (2015) MEGAHIT: An ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. *Bioinformatics* 31(10) 1674–1676.
- Ma L, Xia Y, Li B, Yang Y, Li LG, Tiedje JM and Zhang T (2016) Metagenomic Assembly Reveals Hosts of Antibiotic Resistance Genes and the Shared Resistome in Pig Chicken and Human Feces. *Environmental Science and Technology* 50(1) 420–427.
- Montoya ADV (2018) Avaliação Do Processo De Cobertura Da Terra No Entorno De Usinas Hidrelétricas Na Amazônia Entorno De Usinas Hidrelétricas Na Amazônia Brasileira: A Evolução Da Uhe De Tucuruí.
- Peng F, Isabwe A, Guo Y, Chen H and Yang J (2019) An extensively shared antibiotic resistome among four seasons suggests management prioritization in a subtropical riverine ecosystem. *Science of the Total Environment* 673 533–540.
- Reichert G, Hilgert S, Alexander J, Rodrigues de Azevedo JC, Morck T, Fuchs S and Schwartz T (2021) Determination of antibiotic resistance genes in a WWTP-impacted river in surface water sediment and biofilm: Influence of seasonality and water quality. *Science of The Total Environment* 768 144526.
- Robertson J and Nash JHE (2018) MOB-suite: software tools for clustering reconstruction and typing of plasmids from draft assemblies. *Microbial Genomics* 4(8).
- Rodríguez EA, Pino NJ and Jiménez JN (2021) Climatological and Epidemiological Conditions Are Important Factors Related to the Abundance of bla KPC and Other Antibiotic Resistance Genes (ARGs) in Wastewater Treatment Plants and Their Effluents in an Endemic Country. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 11(August) 1–14.
- Silva Junior OM, dos Santos MA, Szlafsztein CF, Gomez JMA and Pereira JP (2018) Protected areas as strategies for preserving vegetation cover in the vicinity of hydroelectric projects in the Brazilian Amazon. *Energy Sustainability and Society* 8(1)

1–16.

- Silva ASO, da Gondim M, da C, Martins DG and Reis ARS (2017) Características da vegetação remanescente em torno do complexo da UHE de Tucuruí Pará Brasil. 4 1–5.
- Silva H (2018) Estimating the Concentration of Physico-Chemical Parameters in Hydroelectric Power Plant Reservoir.
- Sugita K, Aoki K, Komori K, Nagasawa T, Ishii Y, Iwata S and Tateda K (2021) Molecular Analysis of bla KPC-2 -Harboring Plasmids: Tn 4401a Interplasmid Transposition and Tn 4401a -Carrying ColRNAI Plasmid Mobilization from *Klebsiella pneumoniae* to *Citrobacter europaeus* and *Morganella morganii* in a Single Patient . *MSphere* 6(6).
- Veltri D, Wight MM and Crouch JA (2016) SimpleSynteny: a web-based tool for visualization of microsynteny across multiple species. *Nucleic Acids Research* 44(W1) W41–W45.
- Williams NLR, Siboni N, McLellan SL, Potts J, Scanes P, Johnson C, James M, McCann V and Seymour JR (2022) Rainfall leads to elevated levels of antibiotic resistance genes within seawater at an Australian beach. *Environmental Pollution* 307(April) 119456.
- Wu DL, Zhang M, He LX, Zou HY, Liu YS, Li BB, Yang YY, Liu C, He LY and Ying GG (2020) Contamination profile of antibiotic resistance genes in ground water in comparison with surface water. *Science of the Total Environment* 715.
- Xu J, Zhu Z, Chen Y, Wang W and He F (2021) The Plasmid-Borne tet(A) Gene Is an Important Factor Causing Tigecycline Resistance in ST11 Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Under Selective Pressure. *Frontiers in Microbiology* 12(February) 1–10.
- Xue X, Jia J, Yue X, Guan Y, Zhu L and Wang Z (2021) River contamination shapes the microbiome and antibiotic resistance in sharpbelly (*Hemiculter leucisculus*). *Environmental Pollution* 268 115796.
- Yoshino GH (2017) Estudo da vulnerabilidade hídrica das populações que moram na região do lago da usina hidrelétrica de Tucuruí no Estado do Pará.
- Yu X, Zhang M, Zuo J, Shi X, Tang X, Chen L and Li Z (2018) Evaluation of antibiotic resistant lactose fermentative opportunistic pathogenic Enterobacteriaceae bacteria and blaTEM-2 gene in cephalosporin wastewater and its discharge receiving river. *Journal of Environmental Management* 228 458–465.
- Zhang Z, Zhang Q, Wang T, Xu N, Lu T, Hong W, Penuelas J, Gillings M, Wang M, Gao W and Qian H (2022) Assessment of global health risk of antibiotic resistance genes. *Nature Communications* 13(1).

Zou HY, He LY, Gao FZ, Zhang M, Chen S, Wu DL, Liu YS, He LX, Bai H and Ying GG (2021) Antibiotic resistance genes in surface water and groundwater from mining affected environments. *Science of the Total Environment* 772.

INTERNET RESOURCES SECTION

Broad Institute (2022) *Morpheus*. <https://software.broadinstitute.org/morpheus> (September 4, 2022)

IBGE. (2010). Ibge - 2010. In *Instituto Brasileiro de Geografia e Geoestatística*. <http://censo2010.ibge.gov.br/> (September 4, 2022)

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Tabel S1 - Metagenomic datasets.

Sample ID	Filtered reads (GB)	Total contigs	Total ORFs	Total ACC (%)	Total ARG-like ORFs (%)	No. of unique ARG subtypes
M1P1	11,998,511 (2.07)	149	162	5 (3.36)	11 (6.79)	3
M1A1	26,533,384 (4.91)	607	584	11 (1.81)	16 (2.74)	7
M1S1	13,604,372 (2.71)	18,677	24,102	4 (0.02)	4 (0.02)	4
MRP1	56,681,602 (10.46)	1,238,560	1,767,721	608 (0.05)	1,068 (0.06)	58
MRA1	55,420,581 (10.17)	1,337,314	1,935,706	656 (0.05)	1,189 (0.06)	32
MRS1	10,086,666 (1.91)	47,130	58,370	21 (0.04)	31 (0.05)	8
M1P2	12,245,734 (2.02)	245,147	350,519	373 (0.15)	785 (0.22)	73
M1A2	10,188,484 (1.67)	141,422	226,978	176 (0.12)	305 (0.13)	25
M1S2	988,999 (0.17)	10,604	13,679	8 (0.07)	12 (0.09)	6
MRP2	25,722,784 (4.18)	200,200	296,771	266 (0.13)	536 (0.18)	60
MRA2	16,883,351 (2.78)	133,578	204,866	230 (0.17)	418 (0.2)	53
MRS2	15,666,627 (2.85)	112,110	137,328	51 (0.04)	78 (0.06)	14
TOTAL	256,021,095 (45.9)	3,485,498	5,016,786	2,409 (100)	4,453 (100)	343

Tabel S2 - No. of ARG subtypes identified across samples.

ARG Type	M1P1	M1A1	M1S1	MRP1	MRA1	MRS1	M1P2	M1A2	M1S2	MRP2	MRA2	MRS2
Aminocoumarin	0	0	1	3	3	1	3	3	0	1	1	0
Aminoglycoside	0	0	0	9	3	1	5	2	1	3	4	2
Bacitracin	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
Beta-lactam	2	3	1	12	0	0	12	2	0	9	4	1
Cationic	0	0	0	0	1	0	5	0	0	3	1	0
Chloramphenicol	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
Elfamycin	0	1	0	1	1	1	2	1	1	2	2	1
Fluoroquinolone	0	0	0	4	5	1	5	4	0	6	6	2
Fosfomycin	0	0	0	1	0	0	5	0	0	4	5	0
Fusidic acid	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1
Glycopeptide	0	0	1	3	1	0	0	1	0	0	0	1
Lincosamide	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Lipopeptide	0	0	1	1	2	2	2	2	1	2	2	2
MLS	0	1	0	4	1	0	1	1	1	1	2	0
Multidrug	0	0	0	6	5	0	22	1	0	21	17	1
Mupirocin	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> specific drug	0	0	0	3	4	0	3	2	1	1	3	0
Nitroimidazole	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0
Oxazolidinone	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Peptide	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0
Rifampicin	0	0	0	2	1	1	1	1	1	1	1	1
Streptogramin	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0

Sulfonamide	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Tetracycline	1	1	0	3	3	1	2	2	0	2	2	1
Trimethoprim	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
TOTAL	3	7	4	58	32	8	73	25	6	60	53	14

Tabel S3 - Abundance of ARG types. MLS: macrolide-lincosamide-streptogramin.

[illegible]

<i>Mycobacterium tuberculosis</i> specific drug	0.00	0.00	0.00	7.35	1.86	0.00	7.63	5.70	19.86	1.01	3.03	0.00	46.44
Nitroimidazole	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	46.35	0.00	0.00	17.58	21.14	0.00	85.07
Oxazolidinone	0.00	62.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	15.65	0.00	0.00	0.00	0.00	77.69
Peptide	0.00	0.00	0.00	0.79	0.00	0.00	1.77	0.00	0.00	15.48	19.17	0.00	37.21
Rifampicin	0.00	0.00	0.00	1.21	5.19	1.45	60.03	3.30	24.96	1.28	1.68	4.36	103.46
Streptogramin	0.00	0.00	0.00	0.39	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.39
Sulfonamide	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.65	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.65
Tetracycline	457.73	20.77	0.00	2.11	30.05	1.36	8.15	31.16	0.00	93.50	319.31	4.09	968.23
Trimethoprim	0.00	0.00	0.00	0.17	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.17
TOTAL COVERAGE	1,732.12	1,101.32	33.48	182.71	174.05	29.12	1,930.97	268.54	160.56	929.35	1,907.06	35.15	8,484.43

Tabel S4 - Abundance of clinically important antibiotic resistance genes (ARGs).

COVERAGE (x/GB)													
ARGs	M1P1	M1A1	M1S1	MRP1	MRA1	MRS1	M1P2	M1A2	M1S2	MRP2	MRA2	MRS2	TOTAL
Beta-lactam													
<i>act</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	37.76	0.00	0.00	9.19	0.00	0.00	46.95
<i>act-29</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.34	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.34
<i>act-50</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	14.80	19.07	0.00	33.87
<i>ampH</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	6.11	0.00	0.00	1.46	0.00	0.00	7.57
<i>blaA</i>	0.00	0.00	0.00	0.39	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.39
<i>cfe</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	6.88	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	6.88
<i>cmh</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.75	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.75
<i>cmy</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	25.98	0.00	0.00	3.80	0.00	0.00	29.78
<i>ctx</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.85	0.00	0.00	0.85

<i>ftu-1</i>	0.00	0.00	0.00	1.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.46
<i>len-4</i>	0.00	0.00	0.00	2.72	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.72
<i>len-6</i>	0.00	0.00	0.00	0.35	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.35
<i>och-4</i>	0.00	0.00	0.00	4.48	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4.48
<i>omp36</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.19	0.00	0.00	1.19
<i>omp37</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	7.44	0.00	0.00	0.95	0.00	0.00	8.39
<i>oxa-12</i>	0.00	0.00	0.00	0.33	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.33
<i>oxa-134</i>	0.00	0.00	0.00	0.49	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.49
<i>oxa-571</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.70	0.00	0.00	0.00	0.00	2.70
<i>oxa-641</i>	0.00	0.00	0.00	0.26	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.26
<i>pbp2</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.35	0.00	0.00	1.39	0.00	0.00	2.73
<i>shv-82</i>	0.00	0.00	0.00	0.43	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.43
<i>srt-2</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.46
<i>tem</i>	109.90	305.65	0.00	0.00	0.00	0.00	9.63	0.00	0.00	0.00	515.63	0.00	940.80
<i>tem-2</i>	0.00	0.00	17.42	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	17.42
<i>tem-95</i>	0.00	302.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	302.05
<i>tem-116</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	9.63	53.27	0.00	0.00	0.00	0.00	62.90
<i>tem-171</i>	0.00	320.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	341.15	0.00	7.99	669.17
<i>tem-209</i>	1,164.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1,164.50
<i>vim-71</i>	0.00	0.00	0.00	0.24	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.21	0.00	2.45
TOTAL	1,274.39	927.73	17.42	11.14	0.00	0.00	110.32	55.98	0.00	374.78	536.91	7.99	3,316.66
Multidrug	M1P1	M1A1	M1S1	MRP1	MRA1	MRS1	M1P2	M1A2	M1S2	MRP2	MRA2	MRS2	TOTAL
<i>abcA</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.48	1.47	0.00	1.94
<i>acrA</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	18.58	30.98	0.00	49.56
<i>asmA</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.03	0.00	0.00	1.66	5.27	0.00	7.96

<i>H-NS</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.54	0.00	0.00	12.16	12.51	0.00	27.21
<i>kpnE</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.18	0.00	0.00	5.40	8.72	0.00	15.30
<i>kpnF</i>	0.00	0.00	0.00	0.22	0.00	0.00	15.90	0.00	0.00	4.78	0.00	0.00	20.90
<i>marA</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	32.22	0.00	0.00	16.70	13.14	0.00	62.06
<i>marR</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	29.13	0.00	0.00	13.27	16.90	0.00	59.30
<i>mdr23S</i>	0.00	0.00	0.00	46.88	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	46.88
<i>mtrAD</i>	0.00	0.00	0.00	0.49	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.49
<i>muxB</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.84	0.00	2.30	1.57	0.00	1.91	2.28	0.53	9.43
<i>muxC</i>	0.00	0.00	0.00	0.32	0.34	0.00	2.00	0.00	0.00	2.66	10.54	0.00	15.86
<i>nalC</i>	0.00	0.00	0.00	0.18	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.18
<i>oqxB</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	28.29	0.00	0.00	9.28	14.51	0.00	52.08
<i>ramA</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	29.57	0.00	0.00	10.77	0.00	0.00	40.34
<i>sdiA</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.91	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.91
TOTAL	0.00	0.00	0.00	48.08	1.18	0.00	147.08	1.57	0.00	97.65	116.32	0.53	412.41

Tabel S5 - ARGs identified.

Sample ID	Antibiotic resistant gene
M1P1	tem-209
M1P1	tem
M1P1	tetC
M1A1	tem-95
M1A1	tem-171
M1A1	tem
M1A1	MLS23S

M1A1	O23S
M1A1	tetC
M1A1	tufAB
M1S1	tem-2
M1S1	rpoC
M1S1	pare
M1S1	rpoCL
MRP1	parE
MRP1	gyrBA

MRP1	parY
MRP1	AAC(2')-Ic
MRP1	AAC(6')-Ia
MRP1	AAC(6')-Iag
MRP1	AACA43
MRP1	ANT(2'')-Ia
MRP1	APH(3')-Ix
MRP1	APH(3')-Vb
MRP1	rpsL

MRP1	A16S
MRP1	ftu-1
MRP1	ind-6
MRP1	len-4
MRP1	len-6
MRP1	och-4
MRP1	oxa-12
MRP1	oxa-134
MRP1	oxa-641
MRP1	shv-82
MRP1	vim-71
MRP1	blaA
MRP1	yem-1
MRP1	catB2
MRP1	tufAB
MRP1	qnrB34
MRP1	gyrB
MRP1	gyrA
MRP1	parC
MRP1	fomB
MRP1	fusA
MRP1	vanSC
MRP1	vanWI
MRP1	rpoC
MRP1	inuD

MRP1	rpoBL
MRP1	erm(47)
MRP1	ermN
MRP1	MLS23S
MRP1	oleC
MRP1	kpnF
MRP1	nalC
MRP1	muxC
MRP1	mdr23S
MRP1	mtrAD
MRP1	muxB
MRP1	rpsA
MRP1	thyA
MRP1	katG
MRP1	cprR
MRP1	rph
MRP1	rpoB
MRP1	vatE
MRP1	tet(30)
MRP1	tetA(58)
MRP1	rpsJ
MRP1	dfrA39
MRA1	gyrBA
MRA1	parE
MRA1	parY

MRA1	rpsL
MRA1	A16S
MRA1	rrsH
MRA1	ugd
MRA1	tufAB
MRA1	gyrB
MRA1	gyrA
MRA1	parC
MRA1	gyrRC
MRA1	parEF
MRA1	fusA
MRA1	rpoC
MRA1	ropCL
MRA1	rpoBL
MRA1	MLS23S
MRA1	mtrAD
MRA1	msbA
MRA1	macB
MRA1	muxC
MRA1	muxB
MRA1	ileS
MRA1	rpsA
MRA1	katG
MRA1	embC
MRA1	thyA

MRA1	rpoB
MRA1	rpsJ
MRA1	tet16S
MRA1	tetC
MRS1	A16S
MRS1	gyrBA
MRS1	tufAB
MRS1	parEF
MRS1	rpoBL
MRS1	rpoCL
MRS1	rpoB
MRS1	rpsJ
M1P2	gyrBA
M1P2	parE
M1P2	parY
M1P2	AAC(6')-Ic
M1P2	rpsL
M1P2	A16S
M1P2	rrsH
M1P2	kdpE
M1P2	bacA
M1P2	act-29
M1P2	act-8
M1P2	srt-2
M1P2	tem-116

M1P2	cmy
M1P2	pbp2
M1P2	omp37
M1P2	ampH
M1P2	act
M1P2	cmh
M1P2	cfe
M1P2	tem
M1P2	ugd
M1P2	cap16S
M1P2	eptA
M1P2	pmrF
M1P2	arnA
M1P2	Ef-Tu
M1P2	tufAB
M1P2	emrR
M1P2	gyrB
M1P2	gyrA
M1P2	parEF
M1P2	parC
M1P2	fosA2
M1P2	murA
M1P2	uhpT
M1P2	ptsL
M1P2	glpT

M1P2	fusA
M1P2	rpoBL
M1P2	rpoCL
M1P2	MLS23S
M1P2	baeR
M1P2	chrB
M1P2	cpxA
M1P2	crp
M1P2	marR
M1P2	mdfA
M1P2	kpnE
M1P2	kpnF
M1P2	marA
M1P2	oqxB
M1P2	poxTA
M1P2	ramA
M1P2	rsmA
M1P2	rosB
M1P2	muxB
M1P2	msbA
M1P2	rosA
M1P2	asmA
M1P2	ompF
M1P2	muxC
M1P2	sdiA

M1P2	hns
M1P2	rpsA
M1P2	thyA
M1P2	katG
M1P2	msbA
M1P2	lpsB
M1P2	rpoB
M1P2	folP
M1P2	rpsJ
M1P2	tetR
M1A2	parE
M1A2	parY
M1A2	gyrBA
M1A2	A16S
M1A2	rpsL
M1A2	tem-116
M1A2	oxa-571
M1A2	catII
M1A2	tufAB
M1A2	gyrA
M1A2	gyrB
M1A2	parC
M1A2	parEF
M1A2	fusA
M1A2	rpoC

M1A2	rpoBL
M1A2	rpoCL
M1A2	MLS23S
M1A2	muxB
M1A2	rpsA
M1A2	katG
M1A2	O23S
M1A2	rpoB
M1A2	tet16S
M1A2	rpsJ
M1S2	rpsL
M1S2	tufAB
M1S2	rpoCL
M1S2	MLS23S
M1S2	katG
M1S2	rpoB
MRP2	gyrBA
MRP2	rpsL
MRP2	A16S
MRP2	kdpE
MRP2	bacA
MRP2	act-50
MRP2	tem-171
MRP2	pbp2
MRP2	cmy

MRP2	ampH
MRP2	omp36
MRP2	omp37
MRP2	ctx
MRP2	act
MRP2	arnA
MRP2	cap16S
MRP2	ugd
MRP2	Ef-Tu
MRP2	tufAB
MRP2	emrR
MRP2	parC
MRP2	gyrA
MRP2	gyrC
MRP2	gyrB
MRP2	parEF
MRP2	glpT
MRP2	murA
MRP2	ptsL
MRP2	uhpT
MRP2	fusA
MRP2	rpoBL
MRP2	rpoCL
MRP2	MLS23S
MRP2	baeR

MRP2	chrB
MRP2	cpxA
MRP2	crp
MRP2	acrA
MRP2	marR
MRP2	H-NS
MRP2	kpnE
MRP2	kpnF
MRP2	marA
MRP2	oqxB
MRP2	ramA
MRP2	rsmA
MRP2	asmA
MRP2	msbA
MRP2	rosA
MRP2	hns
MRP2	abcA
MRP2	rosB
MRP2	muxC
MRP2	muxB
MRP2	rpsA
MRP2	msbA
MRP2	bacA
MRP2	rpoB
MRP2	rpsJ

MRP2	tetC
MRA2	gyrBA
MRA2	rpsL
MRA2	rrsC
MRA2	A16S
MRA2	kdpE
MRA2	act-50
MRA2	act-8
MRA2	vim-71
MRA2	tem
MRA2	ugd
MRA2	Ef-Tu
MRA2	tufAB
MRA2	emrA
MRA2	emrR
MRA2	gyrA
MRA2	gyrB
MRA2	parEF
MRA2	parC
MRA2	fosA2
MRA2	fosK
MRA2	uhpT
MRA2	glpT
MRA2	murA
MRA2	fusA

MRA2	rpoCL
MRA2	rpoBL
MRA2	emrN
MRA2	MLS23S
MRA2	baeR
MRA2	cpxA
MRA2	crp
MRA2	acrA
MRA2	marR
MRA2	H-NS
MRA2	kpnE
MRA2	marA
MRA2	oqxB
MRA2	ramA
MRA2	rsmA
MRA2	asmA
MRA2	muxB
MRA2	muxC
MRA2	ramA
MRA2	msbA
MRA2	abcA
MRA2	thyA
MRA2	rpsA
MRA2	katG
MRA2	msbA

MRA2	bacA
MRA2	rpoB
MRA2	tetC
MRA2	rpsJ
MRS2	AAC(6')-Ij
MRS2	rpsL
MRS2	tem-171
MRS2	tufAB
MRS2	gyrA
MRS2	gyrB
MRS2	fusA
MRS2	rpoC
MRS2	rpoBL
MRS2	rpoCL
MRS2	muxB
MRS2	rpoB
MRS2	tetC
MRS2	dfrB3

4 DISCUSSÃO

Especialmente na Amazônia, a população apresenta íntimo contato com os rios, utilizando esses ambientes como forma de sustento, locomoção e lazer, a exemplo está o lago artificial formado com a construção da UHE Tucuruí, a partir da qual ascendeu drasticamente a atividade humana local, como a piscicultura, originada enquanto alternativa econômica, resultado do intenso processo de transformação do espaço (Brabo & Rodrigues, 2022).

É bem estabelecido que a atividade humana contribui para a disseminação de ARGs em ecossistemas aquáticos, como já observado por Laffite *et al.* (2020) e Gomes *et al.* (2021). O aumento da poluição da água representa um problema urgente para os ecossistemas fluviais provenientes principalmente de atividades antrópicas, como esgoto doméstico e hospitalar (Xue *et al.* 2021; Zou *et al.* 2021).

Em vista disso, M1P1 e M1A1 mostraram uma alta abundância de ARGs Beta-lactâmicos, principalmente *bla*TEM-209 e *bla*TEM-95, respectivamente, enquanto em M1P2, MRP2 e MRA2 estiveram distribuídos, majoritariamente, os tipos de ARGs considerados os mais abundantes do estudo, Beta-lactâmico, MLS, Tetraciclina, Aminoglicosídeo e Multidroga Resistente.

*bla*TEM foi o beta-lactâmico mais prevalente nas amostras de água, independentemente da estação ou do período de coleta, semelhante ao encontrado por Yu *et al.* (2018), o gene *tetC* também esteve amplamente distribuído nas amostras, assim como no trabalho de Jia *et al.* (2021), que identificou um grande número de genes que conferem resistência à tetraciclina em ambiente aquático, indicando a necessidade de maior atenção para a disseminação desses ARGs em ambientes antrópicos.

Freitas *et al.* (2019) isolaram de um lago da Amazônia uma bactéria gram-negativa produtora de beta-lactamase de espectro estendido, ressaltando que genes que conferem resistência a betalactâmicos representam o mecanismo de sobrevivência bacteriana de maior sucesso, bem como, o mais preocupante a saúde humana quando associados a bactérias da família *Enterobacteriaceae*.

ARGs envolvidos na resistência a beta-lactâmicos e tetraciclina foram ambos isolados de peixes oriundos da atividade de piscicultura, associados a bactéria gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa*, trazendo à tona a importância da avaliação da suscetibilidade antimicrobiana para prevenir o surgimento de cepas resistentes a antibióticos de potencial preocupação para a saúde pública (Algammal *et al.* 2020).

Por outro lado, a alta incidência de ARGs dos tipos MLS, Aminoglicosídeo e

Multidroga Resistente, parecem estar associado à água coletada durante o inverno amazônico, o mesmo identificado por Amarasiri, Sano & Suzuki (2019) e Bianco *et al.* (2020).

O inverno amazônico se destacou pela maior diversidade de ARGs, mostrando que o estação chuvosa apresenta uma importante influência na distribuição e concentração desses genes, corroborando com os achados de Peng *et al.* (2019), Wu *et al.* (2020), Rodríguez, Pino & Jiménez (2021) e Williams *et al.* (2022), indicando que altos níveis de ARGs em ambientes de influência antrópica representam um risco potencial para a saúde humana após o período de intensas chuvas Williams *et al.* (2022).

Williams *et al.* (2022) demonstraram uma relação significativa entre marcadores de esgoto e ARGs em uma praia australiana, colaborando com Rodríguez, Pino & Jiménez (2021), os quais associaram as condições endêmicas, parâmetros físico-químicos e climatológicos à abundância de diferentes ARGs em efluentes.

Apesar desse estudo não ter quantificado marcadores de esgotamento sanitário no lago da UHE Tucuruí, este ainda é considerado inadequado (Agência Nacional de Águas – ANA, 2017), sugerindo que, o efluente não tratado eleva o risco de contaminação por ARGs, uma vez que, o processo de lixiviação durante o período de chuvas intensas, comumente observadas durante o inverno amazônico, facilita a fluxo de resíduos para os leitos dos rios, representando um alerta à população local e à saúde pública.

Os ARGs foram mais diversos e abundantes nas amostras de água, quando comparado ao sedimento, achado semelhante aos de Jiang *et al.* (2018) e Zou *et al.* (2021), mas diferente do observado por Calero-Cáceres *et al.* (2017), que mostrou a ocorrência de ARGs em sedimento de um rio da Espanha, persistindo por longos períodos independente da precipitação, mas os autores destacam a potencial influência do microbioma e da estabilidade físico-química do rio, mediada pelo lançamento contínuo de esgoto.

De modo geral, os ARGs do tipo Beta-lactâmico e Multidroga Resistente foram verificados mais abundantes na camada fótica e durante o inverno amazônico, independentemente das estações, semelhante ao rio Isabela, na República Dominicana, onde múltiplos Beta-lactâmicos foram detectados, influenciados pelo comportamento dos habitantes, bem como, pela falta de infra-estrutura (Calderón *et al.* 2021).

A presença de ARGs associados ao replicon do plasmídeo ColRNAI representou uma forte evidência da transferência desses genes, principalmente em MRP2, como demonstrado por Sugita *et al.* (2021) e Xu *et al.* (2021), que observaram a transferência de *blaKPC-2* e *tetA*.

Nguyen *et al.* (2019) e Chaturvedi *et al.* (2020) identificaram que a superfície da água

é responsável por conter e disseminar genes multidroga resistentes e beta-lactamases de espectro estendendo, sugerindo que estes ARGs são persistentes no ambiente aquático.

Além disso, este estudo verificou *clusters* de ARGs, como *marRA* em M1P2, representando fatores de transcrição para resistência a múltiplas drogas, *kpnEF* em MRP2, envolvidos na resistência antimicrobiana de amplo espectro e *emrRA* em MRA2, regulando a bomba de efluxo na resistência às fluoroquinolonas.

Ao nosso conhecimento, existem poucos estudos sobre a variação espacial e sazonal de ARGs em lagos artificiais formados pela construção de UHEs, nossos achados chamam a atenção para a disseminação e persistência de ARGs nestes ambientes tão influenciados pela ação antrópica.

5 CONCLUSÃO

Uma forte característica da população Amazônica é o seu íntimo contato com os rios e lagos que permeiam a região, onde a população busca se beneficiar dessa condição, porém, durante o inverno Amazônico, correspondendo aos meses de dezembro a maio, a região é caracterizada por chuvas intensas e muitas endemias se manifestam, onde os rios passam a ser uma ameaça a população, principalmente devido às inundações e aos efluentes oriundos da falta de saneamento básico que são escoados para seus leitos.

Uma ampla diversidade de ARGs foi identificada no lago da UHE Tucuruí, influenciada majoritariamente pela frequente ação antropogênica na região iniciada desde a construção da UHE, a exemplo da piscicultura que se tornou uma alternativa econômica a população local após a instalação da usina.

Abundância e diversidade significativas no lago da UHE Tucuruí foram determinadas pelo período de chuvas, predominantemente na superfície da água, indicando uma possível associação entre a falta de saneamento adequado da região com o escoamento de rejeitos para o leito do lago durante este período.

São necessários mais estudos que possam correlacionar os parâmetros sanitários a abundância de ARGs no local, durante os diferentes períodos sazonais na região Amazônica, para assim traçar estratégias que possam reduzir a potencialidade de transmissão de cepas resistentes, uma vez que, a resistência antimicrobiana representa um grave problema à saúde pública.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agência Nacional de Águas – ANA. 2017. “RELATÓRIO DE ESGOTAMENTO SANITÁRIO MUNICIPAL - TUCURUÍ/PA ATLAS ESGOTOS: Despoluição de Bacias Hidrográficas.”
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. 2019. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controlere/rede_rm/cursos/rm_controlere/opas_web/modulo1/antimicrobianos.htm>. Acesso em: 17 ago. 2019.
- Algammal, Abdelazeem M., Mahmoud Mabrok, Elayaraja Sivaramasamy, Fatma M. Youssef, Mona H. Atwa, Ali W. El-kholy, Helal F. Hetta, and Wael N. Hozzein. 2020. “Emerging MDR-Pseudomonas Aeruginosa in Fish Commonly Harbor OprL and ToxA Virulence Genes and BlaTEM, BlaCTX-M, and TetA Antibiotic-Resistance Genes.” **Scientific Reports** 10 (1): 1–12, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72264-4>.
- Almeida, Neila De Jesus Ribeiro. ALTERNATIVAS DE MANEJO PESQUEIRO NO LAGO DA USINA HIDRELÉTICA DE TUCURUÍ/PA. **Nova Revista Amazônica** 7 (1): 243, 2019. <https://doi.org/10.18542/nra.v7i1.6986>.
- Amarasiri, Mohan, Daisuke Sano, and Satoru Suzuki. Understanding Human Health Risks Caused by Antibiotic Resistant Bacteria (ARB) and Antibiotic Resistance Genes (ARG) in Water Environments: Current Knowledge and Questions to Be Answered. **Critical Reviews In Environmental Science And Technology** 50 (19): 2016–59, 2019. <https://doi.org/10.1080/10643389.2019.1692611>.
- Antimicrobials Working Group. **Antimicrobial Resistance**. 2019. Disponível em: <https://www.antimicrobialsworkinggroup.org/antimicrobial-resistance/>. Acesso em: 17 ago. 2019.
- Arrifano, Gabriela P. F.; Martín-Doimeadios, Rosa C. Rodrigue.; Jiménez-Moreno, María; Ramírez-Mateos, Vanesa; Da Silva, Núbia F. S.; Souza-Monteiro, José Rogério; Augusto-Oliveira, Marcus; Paraense, Ricardo S. O.; Macchi, Barbarella M.; Do Nascimento, José Luiz M.; Crespo-Lopez, Maria Elena. Large-scale projects in the amazon and human exposure to mercury: The case-study of the Tucuruí Dam. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s. l.], v. 147, n. February 2017, p. 299–305, 2018. <<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.08.048>>
- Banin, Ehud, Diarmaid Hughes, and Oscar P. Kuipers. Editorial: Bacterial Pathogens, Antibiotics and Antibiotic Resistance. **FEMS Microbiology Reviews** 41 (3): 450–452, 2017. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux016>.
- Bianco, Kayo, Rodolpho Mattos Albano, Samara Sant Anna de Oliveira, Ana Paula Alves Nascimento, Thaís dos Santos, and Maysa Mandetta Clementino. Possible Health Impacts Due to Animal and Human Fecal Pollution in Water Intended for Drinking Water Supply of Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Water Supply: Research and**

- Technology-Aqua** 69 (1): 70–84, 2020. <https://doi.org/10.2166/AQUA.2019.061>.
- Bortoni, Edson C., Luciano T. Santos, Olivier Bertrand, and Patrick Sauvaget. Acoustic Doppler Profiler Measurements and CFD Validation for Tucuruí Hydro Power Plant Tailrace Flow Investigation. **Flow Measurement and Instrumentation** 68 (August): 101583, 2019. <https://doi.org/10.1016/J.FLOWMEASINST.2019.101583>.
- Brabo, Marcos Ferreira, and Renato Pinheiro Rodrigues. n.d. A Piscicultura Em Tanques-Rede Como Nova Forma de Uso Dos Recursos Pesqueiros No Lago de Tucuruí – Pará. **NAEA** 31 (1): 1–28, 2022.
- Calderón, Víctor V., Roberto Bonnelly, Camila Del Rosario, Albert Duarte, Rafael Baraúna, Rommel T. Ramos, Omar P. Perdomo, Luis E. Rodriguez de Francisco, and Edian F. Franco. Distribution of Beta-Lactamase Producing Gram-Negative Bacterial Isolates in Isabela River of Santo Domingo, Dominican Republic. **Frontiers in Microbiology** 11, 2021. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.519169>.
- Calero-Cáceres, William, Javier Méndez, Julia Martín-Díaz, and Maite Muniesa. The Occurrence of Antibiotic Resistance Genes in a Mediterranean River and Their Persistence in the Riverbed Sediment. **Environmental Pollution** 223: 384–94, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.01.035>.
- Campos, Pedro Henrique Pedreira. Ditadura, Interesses Empresariais e Desenvolvimentismo: A Obra Da Usina Hidrelétrica de Tucuruí. **Revista Tempo e Argumento** 11 (26): 255–86, 2019. <https://doi.org/10.5965/2175180311262019255>.
- Chaturvedi, Preeti, Deepshi Chaurasia, Ashok Pandey, and Pratima Gupta. Co-Occurrence of Multidrug Resistance, β -Lactamase and Plasmid Mediated AmpC Genes in Bacteria Isolated from River Ganga, Northern India. **Environmental Pollution** 267 (December): 115502, 2020. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2020.115502>.
- Clardy, Jon, Michael A Fischbach, and Cameron R Currie. The Natural History of Antibiotics. **Current Biology: CB** 19 (11): R437-441, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.04.001>.
- Cramer, Gail L., Krishna P. Paudel, and Andrew Schmitz. n.d. **The Routledge Handbook of Agricultural Economics**. Disponível em: [https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=rDVIDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA159&dq=antibiotics+use+in+agriculture&ots=SBwdw2WcmC&sig=Xsy0QDuU78SWKfLPfmcvZ9-XOqs#v=onepage&q=antibiotics use in agriculture&f=false](https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=rDVIDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA159&dq=antibiotics+use+in+agriculture&ots=SBwdw2WcmC&sig=Xsy0QDuU78SWKfLPfmcvZ9-XOqs#v=onepage&q=antibiotics+use+in+agriculture&f=false). Acesso em: 17 ago. 2019.
- Durand, Guillaume André, Didier Raoult, and Grégory Dubourg. Antibiotic Discovery: History, Methods and Perspectives. **International Journal of Antimicrobial Agents** 53 (4): 371–382, 2019. <https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2018.11.010>.
- Etebu, E., & Ariekpar, I. Antibiotics: Classification and Mechanisms of Action with Emphasis on Molecular Perspectives. 4: 90–101, 2016.
- Fang, Peiju, Feng Peng, Xiaofei Gao, Peng Xiao, and Jun Yang. Decoupling the Dynamics of

- Bacterial Taxonomy and Antibiotic Resistance Function in a Subtropical Urban Reservoir as Revealed by High-Frequency Sampling. **Frontiers in Microbiology** 10 (July): 1–12, 2019. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01448>.
- Flexa, Cassio Eduardo, Kátia Cristina Araújo Silva, and Israel Hidenburgo Aniceto Cintra. Pescadores Artesanais à Jusante Da Usina Hidrelétrica de Tucuruí, Amazônia, Brasil. **Boletim Do Instituto de Pesca** 42 (1): 221–235, 2016. <https://doi.org/10.5007/1678-2305.2016v42n1p221>.
- Founou, Raspail Carrel, Luria Leslie Founou, and Sabiha Yusuf Essack. Clinical and Economic Impact of Antibiotic Resistance in Developing Countries: A Systematic Review and Meta-Analysis. **PLOS ONE** 12 (12): e0189621, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189621>.
- Freitas, Dhara Y., Susana Araújo, Adriana R.C. Folador, Rommel T.J. Ramos, Juliana S.N. Azevedo, Marta Tação, Artur Silva, Isabel Henriques, and Rafael A. Baraúna. Extended Spectrum Beta-Lactamase-Producing Gram-Negative Bacteria Recovered from an Amazonian Lake near the City of Belém, Brazil. **Frontiers in Microbiology** 10 (FEB), 2019. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00364>.
- Frieri, Marianne, Krishan Kumar, and Anthony Boutin. Antibiotic Resistance. **Journal of Infection and Public Health** 10 (4): 369–378, 2017. <https://doi.org/10.1016/J.JIPH.2016.08.007>.
- Gao, Hui, Linxiao Zhang, Zihao Lu, Chunming He, Qianwei Li, and Guangshui Na. Complex Migration of Antibiotic Resistance in Natural Aquatic Environments. **Environmental Pollution** 232 (January): 1–9, 2018. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2017.08.078>.
- Gauthier, Cristina, Zihan Lin, Brad G. Peter, and Emilio F. Moran. Hydroelectric Infrastructure and Potential Groundwater Contamination in the Brazilian Amazon: Altamira and the Belo Monte Dam. **Professional Geographer** 71 (2): 292–300, 2019. <https://doi.org/10.1080/00330124.2018.1518721>.
- Gomes, Sónia, Conceição Fernandes, Sandra Monteiro, Edna Cabecinha, Amílcar Teixeira, Simone Varandas, and Maria José Saavedra. 2021. The Role of Aquatic Ecosystems (River Tua, Portugal) as Reservoirs of Multidrug-Resistant *Aeromonas* Spp. **Water** 13 (5): 698, 2021. <https://doi.org/10.3390/W13050698>.
- Grenni, Paola, Valeria Ancona, and Anna Barra Caracciolo. Ecological Effects of Antibiotics on Natural Ecosystems: A Review. **Microchemical Journal** 136 (January): 25–39, 2018. <https://doi.org/10.1016/J.MICROC.2017.02.006>.
- Hall, Clayton W., and Thien-Fah Mah. Molecular Mechanisms of Biofilm-Based Antibiotic Resistance and Tolerance in Pathogenic Bacteria. **FEMS Microbiology Reviews** 41 (3): 276–301, 2017. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux010>.
- Hendriksen, Rene S., Patrick Munk, Patrick Njage, Bram van Bunnik, Luke McNally, Oksana Lukjancenko, Timo Röder, *et al.* Global Monitoring of Antimicrobial Resistance

- Based on Metagenomics Analyses of Urban Sewage. **Nature Communications** 10 (1): 1124, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08853-3>.
- Hu, Jialin, Fuzheng Zhao, Xu-Xiang Zhang, Kan Li, Chaoran Li, Lin Ye, and Mei Li. Metagenomic Profiling of ARGs in Airborne Particulate Matters during a Severe Smog Event. **Science of The Total Environment** 615 (February): 1332–1340, 2018. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2017.09.222>.
- IBGE. 2010. CENSO 2010 - Instituto Brasileiro de Geografia e Geoestatística (IBGE). Disponível em: <http://censo2010.ibge.gov.br/>. Acesso em: 20 Ago. 2020.
- Imran, Md, Kirti Ranjan Das, and Milind Mohan Naik. Co-Selection of Multi-Antibiotic Resistance in Bacterial Pathogens in Metal and Microplastic Contaminated Environments: An Emerging Health Threat. **Chemosphere** 215: 846–857, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.114>.
- Jayarao, Bhushan, Raul Almeida, and Stephen P. Oliver. Antimicrobial Resistance on Dairy Farms. **Foodborne Pathogens and Disease** 16 (1): 1–4, 2019. <https://doi.org/10.1089/fpd.2019.29011.edi>.
- Jia, Jia, Guilherme Gomes-Silva, Martin Plath, Boscolli Barbosa Pereira, Carlos UeiraVieira, and Zaizhao Wang. Shifts in Bacterial Communities and Antibiotic Resistance Genes in Surface Water and Gut Microbiota of Guppies (*Poecilia Reticulata*) in the Upper Rio Uberabinha, Brazil. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 211 (March): 111955, 2021. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2021.111955>.
- Jiang, Haoyu, Renjun Zhou, Mengdi Zhang, Zhineng Cheng, Jun Li, Gan Zhang, Baowei Chen, Shichun Zou, and Ying Yang. Exploring the Differences of Antibiotic Resistance Genes Profiles between River Surface Water and Sediments Using Metagenomic Approach. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 161 (May): 64–69, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.05.044>.
- Karkman, Antti, Katariina Pärnänen, and D. G. Joakim Larsson. Fecal Pollution Can Explain Antibiotic Resistance Gene Abundances in Anthropogenically Impacted Environments. **Nature Communications** 10 (1): 80, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07992-3>.
- Knapp, Charles W, Anna C Callan, Beatrice Aitken, Rylan Shearn, Annette Koenders, and Andrea Hinwood. Relationship between Antibiotic Resistance Genes and Metals in Residential Soil Samples from Western Australia. **Environmental Science and Pollution Research** 24 (3): 2484–2494, 2017. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7997-y>.
- Laffite, Amandine, Dhafer Mohammed M. Al Salah, Vera I. Slaveykova, Jean Paul Otamonga, and John Poté. Impact of Anthropogenic Activities on the Occurrence and Distribution of Toxic Metals, Extending-Spectra β -Lactamases and Carbapenem Resistance in Sub-Saharan African Urban Rivers. **Science of The Total Environment**

727 (July): 138129, 2020. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2020.138129>.

- Lanza, Val F., Fernando Baquero, José Luís Martínez, Ricardo Ramos-Ruíz, Bruno González-Zorn, Antoine Andremont, Antonio Sánchez-Valenzuela, *et al.* In-Depth Resistome Analysis by Targeted Metagenomics. **Microbiome** 6 (1): 11, 2018. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0387-y>.
- Lekunberri, Itziar, José Luis Balcázar, and Carles M. Borrego. Metagenomic Exploration Reveals a Marked Change in the River Resistome and Mobilome after Treated Wastewater Discharges. **Environmental Pollution** 234 (March): 538–542, 2018. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2017.12.001>.
- Lewis, Kim, and Yue Shan. Why Tolerance Invites Resistance: Bacteria That Encounter Antibiotics First Become Tolerant and Then Resistant to Them. **Science**. 2017. <https://doi.org/10.1126/science.aam7926>.
- Manaia, Célia M. Assessing the Risk of Antibiotic Resistance Transmission from the Environment to Humans: Non-Direct Proportionality between Abundance and Risk. **Trends in Microbiology**. Elsevier Ltd, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.11.014>.
- Martínez, José L., Teresa M. Coque, Val F. Lanza, Fernando de la Cruz, and Fernando Baquero. Genomic and Metagenomic Technologies to Explore the Antibiotic Resistance Mobilome. **Annals of the New York Academy of Sciences** 1388 (1): 26–41, 2017. <https://doi.org/10.1111/nyas.13282>.
- Montoya, Andrés Danilo Velástegui. **Avaliação do processo de cobertura da terra no entorno de usinas hidrelétricas na amazônia entorno de usinas hidrelétricas na amazônia brasileira : a evolução da UHE de Tucuruí.** [s. l.], 2018.
- Ng, Charmaine, Martin Tay, Boonfei Tan, Thai Hoang Le, Laurence Haller, Hongjie Chen, Tse H. Koh, Timothy M.S. Barkham, and Karina Y.H. Gin. Characterization of Metagenomes in Urban Aquatic Compartments Reveals High Prevalence of Clinically Relevant Antibiotic Resistance Genes in Wastewaters. **Frontiers in Microbiology** 8 (NOV), 2017. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02200>.
- Nguyen, T. N., I. Kasuga, M. Liu, and H. Katayama. Occurrence of Antibiotic Resistance Genes as Emerging Contaminants in Watersheds of Tama River and Lake Kasumigaura in Japan. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science** 266 (1): 012003, 2019. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/266/1/012003>.
- Nnadozie, Chika F., and Oghenekaro Nelson Odume. Freshwater Environments as Reservoirs of Antibiotic Resistant Bacteria and Their Role in the Dissemination of Antibiotic Resistance Genes. **Environmental Pollution**. Elsevier Ltd, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113067>.
- Orthobullets.** 2019. Disponível em: <https://www.orthobullets.com/basic-science/9059/antibiotic-classification-and-mechanism>. Acesso em: 20 Ago. 2020.

- Parthasarathy, Anutthaman, Anna Christina Tyler, Matthew J Hoffman, Michael A Savka, and André O Hudson. Is Plastic Pollution in Aquatic and Terrestrial Environments a Driver for the Transmission of Pathogens and the Evolution of Antibiotic Resistance? **Environmental Science & Technology** 53 (4): 1744–1745, 2019. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b07287>.
- Pena, Rodolfo F. Alves. As Maiores Hidrelétricas Do Mundo. As 10 Maiores Hidrelétricas - Brasil Escola. **Brasil Escola**. 2019. Disponível em: <http://brasilecola.uol.com.br/geografia/as-maiores-hidreletricas-mundo.htm>. Acesso em: 20 Ago. 2020.
- Peng, Feng, Alain Isabwe, Yunyan Guo, Huihuang Chen, and Jun Yang. An Extensively Shared Antibiotic Resistome among Four Seasons Suggests Management Prioritization in a Subtropical Riverine Ecosystem. **Science of the Total Environment** 673: 533–40, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.031>.
- Pérez-Valera, Eduardo, Martina Kyselková, Engy Ahmed, Frantisek Xaver Jiri Sladeczek, Marta Goberna, and Dana Elhottová. Native Soil Microorganisms Hinder the Soil Enrichment with Antibiotic Resistance Genes Following Manure Applications. **Scientific Reports** 9 (1): 6760, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42734-5>.
- Pestana, Inácio Abreu, Lucas Silva Azevedo, Wanderley Rodrigues Bastos, and Cristina Maria Magalhães de Souza. The Impact of Hydroelectric Dams on Mercury Dynamics in South America: A Review. **Chemosphere** 219: 546–556, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.12.035>.
- Pompeu, José Carlos, Vanzeler, Doriedson do Socorro Rodrigues, and Alberto Damasceno. Brazil. Serviço Nacional de Aprendizagem Comercial., **Boletim Técnico Do SENAC**. Boletim Técnico Do Senac. Vol. 45. 2019. Disponível em: <http://bts.senac.br/index.php/bts/article/view/747>. Acesso em: 20 Ago. 2020.
- Proia, Lorenzo, Adriana Anzil, Jessica Subirats, Carles Borrego, Marinella Farrè, Marta Llorca, Jose Luis Balcázar, and Pierre Servais. Antibiotic Resistance along an Urban River Impacted by Treated Wastewaters. **Science of the Total Environment** 628–629: 453–466, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.083>.
- Rodríguez, Erika A., Nancy J. Pino, and J. Natalia Jiménez. Climatological and Epidemiological Conditions Are Important Factors Related to the Abundance of Bla KPC and Other Antibiotic Resistance Genes (ARGs) in Wastewater Treatment Plants and Their Effluents, in an Endemic Country. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology** 11 (August): 1–14, 2021. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.686472>.
- Rousham, Emily K., Leanne Unicomb, and Mohammad Aminul Islam. Human, Animal and Environmental Contributors to Antibiotic Resistance in Low-Resource Settings: Integrating Behavioural, Epidemiological and One Health Approaches. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences** 285 (1876), 2018. <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.0332>.

- Scott, H. Morgan, Gary Acuff, Gilles Bergeron, Megan W. Bourassa, Shabbir Simjee, and Randall S. Singer. Antimicrobial Resistance in a One Health Context: Exploring Complexities, Seeking Solutions, and Communicating Risks. **Annals of the New York Academy of Sciences** 1441 (1): 3–7, 2019. <https://doi.org/10.1111/nyas.14057>.
- Silva, Antonia Sandra Oliveira da, Matheus da Costa Gondim, Denise Garcia Martins, and Alisson Rodrigo Souza Reis. **Características Da Vegetação Remanescente Em Torno Do Complexo Da Uhe de Tucuruí, Pará, Brasil**. n. 4: 1–5, 2017.
- Silva, Han. **Estimating the Concentration of Physico-Chemical Parameters in Hydroelectric Power Plant Reservoir**. 2018. Disponível em: https://iris.uniroma1.it/retrieve/handle/11573/1157770/801996/Tesi_dottorato_NascimentoSilva.pdf. Acesso em: 20 Ago. 2020.
- Sugita, Kayoko, Kotaro Aoki, Kohji Komori, Tatsuya Nagasawa, Yoshikazu Ishii, Satoshi Iwata, and Kazuhiro Tateda. Molecular Analysis of Bla KPC-2 -Harboring Plasmids: Tn 4401a Interplasmid Transposition and Tn 4401a -Carrying ColRNAI Plasmid Mobilization from Klebsiella Pneumoniae to Citrobacter Europaeus and Morganella Morganii in a Single Patient. **MSphere** 6 (6), 2021. <https://doi.org/10.1128/msphere.00850-21>.
- Surette, Matthew D., and Gerard D. Wright. Lessons from the Environmental Antibiotic Resistome. **Annual Review of Microbiology** 71 (1): 309–329, 2017. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090816-093420>.
- Tan, Lu, Linyun Li, Nicholas Ashbolt, Xiaolong Wang, Yuxiao Cui, Xiao Zhu, Yan Xu, Yang Yang, Daqing Mao, and Yi Luo. Arctic Antibiotic Resistance Gene Contamination, a Result of Anthropogenic Activities and Natural Origin. **Science of The Total Environment** 621 (April): 1176–1184, 2018. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2017.10.110>.
- Travis, Anthony, Olga Chernova, Vladislav Chernov, and Rustam Aminov. Antimicrobial Drug Discovery: Lessons of History and Future Strategies. **Expert Opinion on Drug Discovery** 13 (11): 983–985, 2018. <https://doi.org/10.1080/17460441.2018.1515910>.
- Wang, Linqiong, Yi Li, Lihua Niu, Wenlong Zhang, Huanjun Zhang, Longfei Wang, and Peifang Wang. Response of Ammonia Oxidizing Archaea and Bacteria to Decabromodiphenyl Ether and Copper Contamination in River Sediments. **Chemosphere** 191: 858–867, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.10.067>.
- WHO, World Health Organization. **Critically Important Antimicrobials for Human Medicine: Ranking of Antimicrobial Agents for Risk Management of Antimicrobial Resistance Due to Non-Human Use**. 2017. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/255027/9789241512220-eng.pdf>. Acesso em: 18 Ago. 2020.
- Williams, Nathan L.R., Nachshon Siboni, Sandra L. McLellan, Jaimie Potts, Peter Scanes,

- Colin Johnson, Melanie James, Vanessa McCann, and Justin R. Seymour. Rainfall Leads to Elevated Levels of Antibiotic Resistance Genes within Seawater at an Australian Beach. **Environmental Pollution** 307 (April): 119456, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119456>.
- Willms, Inka Marie, Aysha Kamran, Nils Frederik Aßmann, Denis Krone, Simon Henning Bolz, Fabian Fiedler, and Heiko Nacke. Discovery of Novel Antibiotic Resistance Determinants in Forest and Grassland Soil Metagenomes. **Frontiers in Microbiology** 10 (MAR), 2019. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00460>.
- Wright, Gerard D. Environmental and Clinical Antibiotic Resistomes, Same Only Different. **Current Opinion in Microbiology** 51 (October): 57–63, 2019. <https://doi.org/10.1016/J.MIB.2019.06.005>.
- Wu, Dai Ling, Min Zhang, Lu Xi He, Hai Yan Zou, You Sheng Liu, Bei Bei Li, Yuan Yuan Yang, Chongxuan Liu, Liang Ying He, and Guang Guo Ying. Contamination Profile of Antibiotic Resistance Genes in Ground Water in Comparison with Surface Water. **Science of the Total Environment** 715, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136975>.
- Xu, Juan, Zhongliang Zhu, Yanmin Chen, Weizhong Wang, and Fang He. The Plasmid-Borne Tet(A) Gene Is an Important Factor Causing Tigecycline Resistance in ST11 Carbapenem-Resistant *Klebsiella Pneumoniae* Under Selective Pressure. **Frontiers in Microbiology** 12 (February): 1–10, 2021. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.644949>.
- Xue, Xue, Jia Jia, Xiaoya Yue, Yongjing Guan, Long Zhu, and Zaizhao Wang. River Contamination Shapes the Microbiome and Antibiotic Resistance in Sharpbelly (Hemiculter Leucisculus). **Environmental Pollution** 268 (January): 115796, 2021. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2020.115796>.
- Yadav, Shailendra, and Atya Kapley. Exploration of Activated Sludge Resistome Using Metagenomics. **Science of The Total Environment** 692 (November): 1155–1164, 2019. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2019.07.267>.
- Yang, Yuyi, Wenjuan Song, Hui Lin, Weibo Wang, Linna Du, and Wei Xing. Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes in Global Lakes: A Review and Meta-Analysis. **Environment International** 116 (July): 60–73, 2018. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2018.04.011>.
- Yang, Yuyi, Zan Li, Wenjuan Song, Linna Du, Chen Ye, Bo Zhao, Wenzhi Liu, *et al.* Metagenomic Insights into the Abundance and Composition of Resistance Genes in Aquatic Environments: Influence of Stratification and Geography. **Environment International** 127 (December 2018): 371–380, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.03.062>.
- Yoshino, Gabriel Hiromite. **Estudo Da Vulnerabilidade Hídrica Das Populações Que Moram Na Região Do Lago Da Usina Hidrelétrica de Tucuruí No Estado Do Pará.**

2017.

- Yu, Xin, Mengyu Zhang, Jiane Zuo, Xuchuan Shi, Xinyao Tang, Lei Chen, and Zaixing Li. Evaluation of Antibiotic Resistant Lactose Fermentative Opportunistic Pathogenic Enterobacteriaceae Bacteria and BlaTEM-2 Gene in Cephalosporin Wastewater and Its Discharge Receiving River. **Journal of Environmental Management** 228 (December): 458–65, 2018. <https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2018.09.043>.
- Zeng, Jiaxiong, Yu Pan, Jintao Yang, Mengtian Hou, Zhenling Zeng, and Wenguang Xiong. Metagenomic Insights into the Distribution of Antibiotic Resistome between the Gut-Associated Environments and the Pristine Environments. **Environment International** 126 (May): 346–354, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.02.052>.
- Zhou, Renjun, Shenzheng Zeng, Dongwei Hou, Jian Liu, Shaoping Weng, Jianguo He, and Zhijian Huang. Occurrence of Human Pathogenic Bacteria Carrying Antibiotic Resistance Genes Revealed by Metagenomic Approach: A Case Study from an Aquatic Environment. **Journal of Environmental Sciences (China)** 80 (June): 248–256, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2019.01.001>.
- Zou, Hai Yan, Liang Ying He, Fang Zhou Gao, Min Zhang, Shuai Chen, Dai Ling Wu, You Sheng Liu, Lu Xi He, Hong Bai, and Guang Guo Ying. Antibiotic Resistance Genes in Surface Water and Groundwater from Mining Affected Environments. **Science of the Total Environment** 772, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145516>.