



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIOCÊNCIAS

Tatiany Aparecida Teixeira Soratto

**Caracterização do microbioma e resistoma de amostras de dejetos da  
avicultura de corte e suinocultura do Oeste do estado de Santa Catarina**

Florianópolis

2024

Tatiany Aparecida Teixeira Soratto

**Caracterização do microbioma e resistoma de amostras de dejetos da avicultura de corte e suinocultura do Oeste do estado de Santa Catarina**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Biotecnologia e Biociências.

Orientador: Prof. Glauber Wagner, Dr.  
Coorientador: Luiz Felipe Valter de Oliveira, Dr.

Florianópolis

2024

Ficha catalográfica gerada por meio de sistema automatizado gerenciado pela BU/UFSC.  
Dados inseridos pelo próprio autor.

Soratto, Tatiany Aparecida Teixeira

Caracterização do microbioma e resistoma de amostras de dejetos da avicultura de corte e suinocultura do Oeste do estado de Santa Catarina / Tatiany Aparecida Teixeira Soratto ; orientador, Glauber Wagner, coorientador, Luiz Felipe Valter De Oliveira, 2024.

117 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Biotecnologia e Biociências. 2. resistoma ambiental. 3. microbioma avícola e suinícola. 4. genes de resistência antimicrobiana. 5. fatores de virulência. I. Wagner, Glauber. II. De Oliveira, Luiz Felipe Valter. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. IV. Título.

Tatiany Aparecida Teixeira Soratto

**Caracterização do microbioma e resistoma de amostras de dejetos da avicultura de corte e suinocultura do Oeste do estado de Santa Catarina**

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado, em 29 de maio de 2024, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof<sup>ª</sup>. Thaís Cristine Marques Sincero, Dr<sup>ª</sup>.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Diogo Antônio Tschoeke, Dr.  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Rubens Tadeu Delgado Duarte, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia e Biociências.

---

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

---

Prof. Glauber Wagner, Dr.  
Orientador

Florianópolis, 2024.

Dedico a mim mesmo,  
como um lembrete de que eu consigo.

## AGRADECIMENTOS

Quem diria que uma garotinha do interior de São Paulo, de uma cidade com cerca de 1.500 habitantes, poderia alcançar o mais alto título acadêmico? Isso só foi possível devido às oportunidades e pessoas que passaram pelo meu caminho. Por isso, agradeço:

À todos que estiveram ao meu lado e contribuíram para a realização desta tese. É inegável a importância de ter uma rede de suporte e apoio, principalmente durante um período tão desafiador.

Ao meu orientador, professor Glauber Wagner, por ter me recebido e me orientado durante minha transição de área, além do suporte constante ao longo de toda a pesquisa. Sua expertise e conselhos foram cruciais para o progresso e a conclusão deste projeto. Ao meu coorientador, Luiz Felipe Valter de Oliveira, agradeço pelas valiosas dicas e orientações sobre os caminhos a seguir. Sua contribuição e colaboração enriqueceram significativamente o desenvolvimento desta tese. Seu apoio e insights foram extremamente valiosos. Ao professor Björn Andersson, que me orientou durante o período de sanduíche na Suécia, agradeço por me permitir participar de projetos desafiadores e cohorts com pessoas renomadas. Seu apoio, orientação e confiança foram essenciais para o sucesso desta fase da pesquisa e para o meu desenvolvimento acadêmico.

Aos professores, Thaís Cristine Marques Sincero, Diogo Antônio Tschoeke e Rubens Tadeu Delgado Duarte, membros da minha banca de defesa, pela disponibilidade de avaliar este trabalho e pela contribuição prestada. À Universidade Federal de Santa Catarina, e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, que proporcionaram a infraestrutura, serviços e o ambiente necessários para o desenvolvimento desta pesquisa. Sua organização e apoio foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Às agências de fomento FAPESC e CAPES pelo financiamento dos projetos que permitiram a realização deste trabalho, assim como pela bolsa fornecida. Ao Programa Institucional de Internacionalização da Capes (Capes PrInt) e ao Programa *Joint Brazilian-Swedish Research Collaboration* (STINT) pelas bolsas que permitiram a realização do meu doutorado sanduíche.

Às equipes do Laboratório de Bioinformática e do Núcleo de Bioinformática, em especial aos imbatíveis e tristes, Beatriz, Carolina, Dayane, Eric, Guilherme,

Fernando, Karin, Maiara, Renato e Vilmar, por todo ensinamento, ajuda, companheirismo e cooperação dentro e fora do laboratório. Sem vocês, esta jornada de doutorado não teria sido a mesma. À equipe do Laboratório de Protozoologia, aos professores pelos ensinamentos, pelo incentivo quando ao pensamento crítico e ao rigor científico. À todos colegas em especial à Adriana, Amabili, Caibe, Carime, Laryssa, Thaís e Vanessa que tornaram o ambiente colaborativo e os momentos compartilhados fundamentais para o meu crescimento profissional e pessoal. À equipe do Laboratório de Virologia Aplicada, especialmente à professora Gislaine Fongaro pela doação das amostras, e a seus alunos, Rafael e Paula, que além de ajudarem com as extrações de DNA, também tornaram os dias mais leves e alegres.

À Gislaine e ao Gabriel, sem vocês a Suécia não teria sido a mesma. À todo o pessoal do corredor do Karolinska Institutet, Cagla, Catarina, Leyre, Nicole e Nuno. Vocês tornaram a Suécia um lugar mais acolhedor e alegre, especialmente durante o desafiador período da pandemia.

Aos amigos e companheiros que conheci nas minhas primeiras semanas no hostel, agradeço pelo acolhimento e camaradagem que foram essenciais para minha adaptação. A todo o pessoal da república do meu primeiro ano de doutorado, conheci pessoas incríveis que não só me ajudaram a explorar e a conhecer melhor a ilha, mas também se tornaram grandes amigos. Ao Abadio e à Natália, que compartilharam o lar comigo por um longo período, proporcionando um ambiente acolhedor e por me fazerem sentir em casa.

À toda minha família, meu porto seguro, em especial ao meu pai Marcos, minha mãe Izete e meu irmão Marcos Bruno, meu mais profundo agradecimento pelo apoio incondicional que me permitiu chegar até aqui. Vocês sempre foram a base sólida sobre a qual construí minha trajetória.

À minha companheira, Queila, pela paciência e suporte contínuo, que foram cruciais durante este último ano de doutorado. Sua compreensão e encorajamento foram inestimáveis. Ao Joãozinho, que foi meu apoio emocional nas últimas semanas de escrita, sua presença e apoio foram fundamentais para superar os momentos mais difíceis.

À todos que contribuíram de alguma forma para esta jornada, meu sincero agradecimento e carinho.

*A reação mais comum da mente humana a uma conquista  
não é a satisfação,  
e sim o anseio por mais.*

Livro - "Sapiens: Uma Breve História da Humanidade", por Yuval Noah Harari

## RESUMO

O setor de produção animal em Santa Catarina é crucial social, econômica, ambiental e sanitariamente tanto a nível estadual quanto nacional. O uso de antimicrobianos tem um impacto relevante na produção e na Saúde Única. Considerando a importância dos ambientes de criação como fontes de genes de resistência antimicrobiana (ARGs) e fatores de virulência (VFs), o objetivo deste trabalho é analisar a microbiota, o resistoma e os VFs em dejetos de aves e suínos, além de investigar como diferentes práticas de produção influenciam esses padrões no oeste do Estado de Santa Catarina. Na avicultura, foram coletadas 8 amostras de cama de aviário, provenientes dos lotes 1, 2, 3, 4, 6, 9 e 12, sendo cada lote correspondente a um ciclo de produção de aves com duração aproximada de 40 a 45 dias. Além disso, foi obtida uma amostra de um sistema de criação orgânica. Na suinocultura, as amostras foram coletadas na entrada (afluente) e na saída (efluente) dos biodigestores das granjas entre 2013 e 2019. Para a granja com manejo orgânico, a coleta foi realizada diretamente do tanque de armazenamento de dejetos brutos (esterqueira), totalizando 15 amostras. O DNA total das amostras foi extraído e sequenciado utilizando a técnica de shotgun. A análise foi conduzida através de duas abordagens. A primeira incluiu a realização de uma análise taxonômica com o Kraken e a busca por genes de resistência com o MegaRes. A segunda abordagem envolveu a montagem das sequências com o MetaSPAdes, a busca por genes de resistência utilizando o CARD e a identificação de plasmídeos com o PlasClass, além da detecção de fagos com o DeepVirFinder. Os resultados das amostras de cama de aviário mostram que a diversidade microbiana aumenta com o uso sucessivo das camas pelos lotes de animais, enquanto a presença ARGs tende a diminuir, sugerindo que as práticas de manejo são eficazes na redução desses genes. Em contraste, os dejetos de suínos tratados em biodigestores mostram uma alteração na comunidade microbiana, resultando em um perfil mais homogêneo, mas sem diferenças significativas nos ARGs entre a entrada e a saída dos biodigestores. A análise comparativa entre os sistemas de produção revelou 1.697 contigs com ARGs, distribuídos em vinte classes farmacológicas, sendo as mais prevalentes as que codificam para aminoglicosídeos, multirresistentes e tetraciclina. Foram encontrados também 309 contigs com VFs, como adesinas, flagelos e fatores de aquisição de nutrientes. O gênero *Escherichia* foi associado principalmente aos ARGs e VFs nas amostras de cama de aviário, indicando um impacto potencial de *Escherichia coli* patogênica aviária (APEC) na avicultura. Além disso, a presença de *Staphylococcus* e *Gammaproteobacteria* em ambos os ambientes sugere que estes são reservatórios de ARGs. A relevância dos elementos genéticos móveis (MGEs), especialmente plasmídeos, destaca a necessidade de monitoramento e controle para combater a propagação da resistência antimicrobiana (AMR). Estes resultados ressaltam a complexidade da interação entre ARGs, VFs e MGEs, sublinhando a necessidade de estratégias abrangentes para enfrentar esse desafio global de saúde.

**Palavras-chave:** resistoma ambiental; microbioma avícola e suinícola; genes de resistência antimicrobiana; fatores de virulência.

## Microbiome and resistome characterization of broiler and swine manure samples from western Santa Catarina

### ABSTRACT

The animal production sector in Santa Catarina is crucial both socially, economically, environmentally, and sanitary at both state and national levels. The use of antimicrobials has a significant impact on production and One Health. Considering the importance of production environments as sources of antimicrobial resistance genes (ARGs) and virulence factors (VFs), the study aimed to analyze the microbiota, resistome, and VFs in broilers and swine manure samples and to investigate how different production practices influence these patterns in Santa Catarina western region. In poultry farming, eight samples of broiler litter were collected from batches 1, 2, 3, 4, 6, 9, and 12, with each batch corresponding to a production cycle of broilers lasting approximately 40 to 45 days. Additionally, a sample was obtained from an organic farming system. In swine farming, samples were collected from the inlet (influent) and outlet (effluent) of biodigesters on farms between 2013 and 2019. For the organic farm, the sample was collected directly from the raw manure storage tank (manure pit), totaling 15 samples. Total DNA was extracted from the samples and sequenced using the shotgun technique. The analysis was carried out using two approaches. The first approach involved a taxonomic analysis with Kraken and a search for resistance genes with MegaRes. The second approach included sequence assembly with MetaSPAdes, searching for resistance genes using CARD, identifying plasmids with PlasClass, and detecting phages with DeepVirFinder. The results from the broiler litter samples indicate that microbial diversity increases with successive use of litter by animal batches. At the same time, the presence of ARGs tends to decrease, suggesting that management practices reduce these genes. In contrast, manure from swine treated in biodigesters shows changes in the microbial community, resulting in a more homogeneous profile but no significant differences in ARGs between the inlet and outlet of the biodigesters. Comparative analysis between the production systems revealed 1,697 contigs containing ARGs distributed across twenty pharmacological classes, the most prevalent being those encoding for aminoglycosides, multidrug-resistant, and tetracyclines. Additionally, 309 contigs with VFs such as adhesins, flagella, and nutrient acquisition factors were identified. The genus *Escherichia* was primarily associated with ARGs and VFs in the broiler litter samples, indicating a potential impact of pathogenic *Escherichia coli* (APEC) in poultry farming. Furthermore, the presence of *Staphylococcus* and Gammaproteobacteria in both environments suggests that these are reservoirs of ARGs. The significance of mobile genetic elements (MGEs), especially plasmids, underscores the need for monitoring and controlling these elements to combat the spread of antimicrobial resistance (AMR). These results highlight the complexity of the interaction between ARGs, VFs, and MGEs, emphasizing the need for comprehensive strategies to address this global health challenge.

**Keywords:** environmental resistome; broilers and swine microbiome; antibiotic resistance genes; virulence factors.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Número de publicações com o termo “microbiome” no PubMed.....	27
Figura 2 – Fluxograma das análises de bioinformáticas.....	48
Figura 3 – Composição das amostras de camas de aviário.....	50
Figura 5 – Diversidade nas amostras de camas de aviário baseada na diversidade de espécies encontradas.....	53
Figura 6 – Taxonomia ao nível de (A) domínio, (B) Filo e (C) família encontradas nas camas de aviário.....	56
Figura 7 – Os 28 gêneros mais abundantes encontrados nas camas de aviário.....	57
Figura 8 – As 40 espécies mais abundantes encontradas nas camas de aviário.....	58
Figura 9 – Classes de antimicrobianos para os quais foram identificados ARGs nas amostras de camas de aviário.....	62
Figura 10 – Os 30 genes de resistência aos antimicrobianos mais abundantes.....	63
Figura 11 – Diversidade nas amostras de camas de aviário baseada nos genes de resistência antimicrobiana (ARGs) encontrados.....	64
Figura 12 – Composição das amostras de entrada (E) e saída (S) dos biodigestores de dejetos de suinocultura.....	67
Figura 13 – Diversidade nas amostras de entrada (E) e saída (S) dos biodigestores de dejetos de suinocultura baseada na diversidade de espécies encontradas.....	68
Figura 14 – Taxonomia ao nível de (A) domínio, (B) Filo e (C) família encontradas nas amostras de entrada (E) e saída (S) dos biodigestores de dejetos de suinocultura.....	71
Figura 15 – Os 30 gêneros mais abundantes encontrados nas amostras de entrada (E) e saída (S) dos biodigestores de dejetos de suinocultura.....	72
Figura 16 – Espécies diferencialmente abundantes entre as amostras de entrada e saída dos biodigestores de dejetos da suinocultura.....	73
Figura 17 – Classes de antimicrobianos para os quais foram identificados ARGs nas amostras de entrada (E) e saída (S) dos biodigestores de dejetos de suinocultura..	75
Figura 18 – Os 30 genes de resistência aos antimicrobianos mais abundantes.....	76
Figura 19 – Diversidade nas amostras de entrada (E) e saída (S) dos biodigestores	

de dejetos de suinocultura baseada nos genes de resistência antimicrobiana (ARGs) encontrados.....	77
Figura 20 – Abundâncias relativas de ARGs (A) e número de contigs (B) por amostras de dejetos avícolas e suinícolas.....	81
Fonte: elaborado pela autora.....	81
Figura 21 – Abundâncias relativas de VFs (A) e número de contigs (B) por amostras de dejetos avícolas e suinícolas.....	82
Fonte: elaborado pela autora.....	82
Figura 22 – Diagrama de Venn representando genes comuns e exclusivos dentro do grupos para (A) ARGs e (B) VFs.....	83
Figura 23 – Heatmap com a frequência das classes de antimicrobianos para os quais foram identificados ARGs nas amostras de dejetos avícolas e suinícolas.....	84
Figura 24 – Abundância relativa no nível taxonômico mais alto encontrado até o nível de gênero para ARGs nas amostras de dejetos avícolas e suinícolas.....	86
Figura 25 – Número de contigs no nível taxonômico mais alto encontrado até o nível de gênero nas amostras de dejetos avícolas e suinícolas.....	86
Figura 26 – Abundância de ARGs e VFs em MGEs para as amostras de dejetos avícolas e suinícolas.....	88

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Pré-processamento das amostras de camas de aviário.....	49
Tabela 2 – Pré-processamento das amostras de entrada (E) e saída (S) dos biodigestores de dejetos de suinocultura.....	66

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMR	Resistência aos antimicrobianos
ARGs	Genes de resistência antimicrobiana
ASVs	Variantes de sequência de <i>amplicon</i>
CDC	<i>Center for Diseases Control and Prevention</i>
ddNTPs	Didesoxirribonucleotídeos trifosfatados
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
DSA	Departamento de Saúde Animal
HGT	Transferência horizontal de genes
HMP	<i>Human Microbiome Project</i>
ITS	Espaçador interno transcrito
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
MAGs	<i>Metagenome-assembled genomes</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MDR	Resistente a múltiplos medicamentos
MetaSUB	<i>Metagenomics &amp; Metadesign of Subways &amp; Urban Biomes</i>
MGEs	Elementos genéticos móveis
MLS	Macrolídeos, lincosamidas e estreptogramina
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
NGS	<i>New Generation Sequencing</i>
NNIS	<i>National Nosocomial Infections Surveillance</i>
ONT	<i>Oxford Nanopore Technology</i>
OTUs	Unidades taxonômicas operacionais
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	RNA ribossomal
UTI	Unidades de terapia intensiva
VFs	Fatores de virulência
VRE	<i>Enterococcus faecium</i> resistentes à vancomicina
WGS	<i>Whole Genome Sequencing</i>

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
1.1. AGRONEGÓCIO EM SANTA CATARINA.....	17
1.2. TERMINOLOGIA E DEFINIÇÕES IMPORTANTES RELACIONADOS AO MICROBIOMA.....	18
1.3. GENES BACTERIANOS DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS.....	21
1.4. SEQUENCIAMENTO DE DNA.....	26
1.5. ANÁLISE DE DADOS DE MICROBIOMA.....	29
1.5.1. Metagenoma.....	29
1.5.2. Microbiota.....	33
1.5.3. Conceitos e aplicações de ecologia microbiana.....	35
1.5.4. Ferramentas de predição e bancos de dados de ARGs.....	38
1.6. ANTIMICROBIANOS E PRODUÇÃO ANIMAL.....	39
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>43</b>
2.1. OBJETIVO GERAL.....	43
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	43
<b>3. METODOLOGIA.....</b>	<b>44</b>
3.1. COLETA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS.....	44
3.1.1. Coleta das amostras de cama de aviário.....	44
3.1.2. Coleta das amostras de granjas de suínos.....	44
3.2. EXTRAÇÃO DE DNA E SEQUENCIAMENTO METAGENÔMICO.....	45
3.3. ANÁLISES BIOINFORMÁTICAS.....	45
3.3.1. Controle de qualidade e pré-processamento.....	45
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>49</b>
4.1. METAGENÔMICA DE AMOSTRAS DE CAMA DE AVIÁRIO.....	49
4.1.1. Sequenciamento e pré-processamento das amostras.....	49
4.1.2. Diversidade microbiana.....	50
4.1.3. Composição taxonômica.....	54
4.1.4. Caracterização do resistoma.....	58

4.2. METAGENÔMICA DE AMOSTRAS DE ENTRADA E SAÍDA DE BIODIGESTORES SUINÍCOLAS.....	65
4.2.1. Sequenciamento e pré-processamento das amostras.....	65
4.2.2. Diversidade microbiana.....	67
4.2.3. Composição taxonômica.....	69
4.2.4. Caracterização do resistoma.....	73
4.3. COMPARANDO OS GENES DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS E FATORES DE VIRULÊNCIA ENTRE AS AMOSTRAS DE DEJETOS DOS SISTEMAS DE PRODUÇÃO ANIMAL AVÍCOLA E SUINÍCOLA.....	78
4.3.1. Resistoma e VFs nas amostras de dejetos de aves e suínos.....	78
4.3.2. Taxonomia do resistoma e dos VFs das camas de aviário e dos dejetos de suínos.....	84
4.3.3. Elementos móveis na disseminação de ARGs e VFs.....	87
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>89</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>91</b>
<b>APÊNDICE A – Publicações com análise de dados de microbiota.....</b>	<b>110</b>
<b>APÊNDICE B – Produções resultantes do doutorado sanduíche no Instituto Karolinska.....</b>	<b>112</b>
<b>APÊNDICE C – Outras produções colaborativas no âmbito do Laboratório de Bioinformática.....</b>	<b>115</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. AGRONEGÓCIO EM SANTA CATARINA

A cadeia produtiva de alimentos desempenha um papel fundamental na nutrição humana mundial, e o Brasil destaca-se como uma potência na oferta global de alimentos. O país é atualmente um dos principais produtores mundiais e tem produzido quantidade de alimento suficiente para abastecer seu mercado doméstico e grande parte da demanda externa. Segundo a ABIA (2023), o Brasil é atualmente o maior exportador de carne bovina e de frango, óleo de soja, açúcar, suco de laranja e café solúvel; além de estar entre os principais exportadores de algodão, milho, frutas, carne suína e produtos do setor florestal.

O estado de Santa Catarina é relevante neste contexto, sendo a agricultura uma das principais atividades econômicas do estado. Segundo a Epagri (2023), em 2022 o Valor de Produção Agropecuária (VPA) de Santa Catarina foi de R\$ 61 bilhões, representando um aumento de 13,8% em relação ao ano anterior. A avicultura e a suinocultura destacam-se como principais atividades para o agronegócio do estado.

Santa Catarina se destaca como líder na produção de suínos, sendo esta a principal atividade agropecuária do estado (EPAGRI, 2023). Em 2022, Santa Catarina liderou o país em abate e exportação de suínos, representando cerca de 55% das exportações nacionais. Além disso, aproximadamente 20,2% do Valor de Produção Agropecuária (VPA) do estado provém da produção de carne suína (EMBRAPA, 2023). Sendo a mesorregião do Oeste Catarinense responsável por 78,3% da produção do estado em 2018 (GIEHL; MONDARDO, 2019).

Quanto à produção de aves, em âmbito nacional, Santa Catarina ocupa uma posição de destaque, sendo o segundo maior produtor do Brasil. A produção de carne de frango representa cerca de 15,9% do Valor de Produção Agropecuária (VPA) estadual, totalizando R\$ 9,7 bilhões. No mercado externo, em 2022, Santa Catarina exportou aproximadamente 3,17 milhões de toneladas de carne de frango, o que correspondeu a um faturamento de 21,85% da receita nacional desse produto (EMBRAPA, 2023).

No entanto, a produção intensiva de animais, como suínos e aves, resulta em grandes volumes de dejetos, que, se não forem geridos de forma adequada, podem causar impactos negativos no meio ambiente e na saúde pública. Esses dejetos, quando não tratados corretamente, podem contaminar solo e água, contribuir para a emissão de gases de efeito estufa e criar condições favoráveis à proliferação de patógenos e resistência antimicrobiana (ALEGBELEYE; SANT'ANA, 2020; SAMBAZA; NAICKER, 2023).

Neste cenário, o conceito de Saúde Única se torna crucial. Esse conceito refere-se à interconexão estabelecida entre diversos ecossistemas na disseminação e emergência de traços que influenciam a saúde humana, animal, vegetal e sua integração ambiental (HERNANDO-AMADO *et al.*, 2019). A gestão eficaz dos dejetos da produção animal é um exemplo concreto de como uma abordagem integrada pode melhorar a saúde pública e animal, prevenindo a disseminação de doenças e a resistência aos antimicrobianos (AMR), e promovendo práticas sustentáveis que beneficiem o meio ambiente.

## 1.2. TERMINOLOGIA E DEFINIÇÕES IMPORTANTES RELACIONADOS AO MICROBIOMA

A vida microbiana pode ser encontrada em todos os ambientes terrestres, desde os mais familiares, como no oceano (MORAN, 2015), no solo (JANSSON; HOFMOCKEL, 2020; KÖBERL *et al.*, 2020), nas folhas e nas raízes das plantas (TRIVEDI *et al.*, 2020), até ambientes considerados inóspitos devido a condições extremas, como, por exemplo, nas planícies abissais do oceano (ACINAS *et al.*, 2021), no Ártico (RAPP; SULLIVAN; DEMING, 2021) ou em crostas de sal do deserto hiperárido do Atacama (FINSTAD *et al.*, 2017). Os microrganismos também colonizam praticamente todo o corpo humano, principalmente regiões como o trato gastrointestinal, a boca, a pele, o sistema respiratório e geniturinário inferior (GRICE; SEGRE, 2012). Muitos desses microrganismos não são cultivados em laboratório. Assim, a possibilidade de estudar microrganismos cultiváveis e não cultiváveis por meio do avanço das plataformas analíticas de DNA/RNA combinado com o aumento das tecnologias de computação e sequenciamento revolucionou o conhecimento no campo da microbiologia, ajudando a elucidar essas comunidades microbianas. O

rápido desenvolvimento dessa área trouxe confusão no vocabulário usado para descrever diferentes aspectos dessas comunidades e seus ambientes (MARCHESI; RAVEL, 2015). Dessa forma, as definições dos principais termos utilizados são apresentadas a seguir.

O microbioma refere-se a todo o habitat, incluindo os microrganismos (bactérias, arqueias, eucariotos inferiores e superiores, e vírus), seus genomas e as condições ambientais circundantes. Essa definição é baseada na de "bioma", que engloba os fatores bióticos e abióticos de determinados ambientes. O microbioma é caracterizado pela aplicação de uma ou combinações de metagenômica (perfil genômico), metabolômica (perfil metabólico), metatranscriptômica (RNAs expressos) e metaproteômica (perfil de proteínas), combinadas com metadados clínicos ou ambientais (MARCHESI; RAVEL, 2015).

A microbiota pode ser definida como todos os microrganismos que habitam um dado microbioma (KONOPKA, 2009; MARCHESI; RAVEL, 2015). O termo microbiota foi definido pela primeira vez por Lederberg e McCray (2001), que enfatizaram a importância dos microrganismos que habitam o corpo humano na saúde e na doença. Este censo microbiano é estabelecido usando métodos moleculares baseados predominantemente na amplificação e sequenciamento de marcadores genéticos, que incluem os genes RNA ribossomal 16S (genes 16S rRNA) para bactérias, o espaçador interno transcrito (ITS) para fungos, os genes 18S rRNA para eucariotos, ou outros genes marcadores e regiões genômicas (GHOSH; MEHTA; KHAN, 2019). Esses marcadores permitem estimar a diversidade taxonômica e a funcionalidade desses organismos, que podem ser descritas como as "tarefas" biológicas que os membros de uma comunidade de microrganismos podem ou não realizar (MORGAN; HUTTENHOWER, 2012).

O termo metagenoma foi usado pela primeira vez em 1998 (HANDELSMAN et al., 1998) e consiste na coleção de todos ('meta'-) os genomas ('-genoma') e genes da microbiota (GHOSH; MEHTA; KHAN, 2019; MARCHESI; RAVEL, 2015; QUINCE *et al.*, 2017). A metagenômica, no que lhe concerne, é a análise do metagenoma através da extração e sequenciamento de seu DNA, o que permite estudar comunidades de organismos diretamente em seu ambiente natural (GHOSH; MEHTA; KHAN, 2019). Com esta técnica, é possível analisar os genomas de todos os microrganismos em uma amostra, não apenas daqueles que são

passíveis de cultivo. Desta forma, oferece uma lente poderosa para observar comunidades microbianas em uma escala mais ampla e nos permite abordar questões fundamentais da evolução e ecologia da diversidade microbiana (QUINCE *et al.*, 2017).

A metagenômica utiliza o sequenciamento não direcional (*shotgun*) de todos os genomas microbianos presentes em uma amostra. Tal metodologia é útil para determinar a composição taxonômica e o potencial funcional de comunidades microbianas, além de possibilitar a recuperação de sequências genômicas completas dos microrganismos (QUINCE *et al.*, 2017). Os estudos pioneiros de metagenômica pesquisaram a diversidade microbiana dos oceanos (RUSCH *et al.*, 2007), e desde então esta técnica tem sido usada para caracterizar diversos ambientes, como solos (HOWE *et al.*, 2014), águas residuais (MUNCK *et al.*, 2015), e até mesmo cidades, como no consórcio MetaSUB (do inglês, *Metagenomics & Metadesign of Subways & Urban Biomes*) (AFSHINNEKOO *et al.*, 2015; DANKO *et al.*, 2021). Além da caracterização do microbioma humano, como no Projeto Microbioma Humano (do inglês, *Human Microbiome Project - HMP*), que utilizou metagenômica para a última parte do projeto (HUTTENHOWER *et al.*, 2012).

O termo resistoma foi proposto pela primeira vez em 2006 (D’COSTA *et al.*, 2006), e hoje é definido como o conjunto de genes responsáveis pela AMR, antisséptica e a metais pesados em um ecossistema microbiano específico (WANG *et al.*, 2021). A relação entre a microbiota e a resistência a antimicrobianos tem sido cada vez mais estudada devido à sua natureza multifatorial, envolvendo interações complexas entre ambientes, humanos, animais e plantas. Nos últimos anos, os custos decrescentes das abordagens metagenômicas de alto rendimento (THOMAS; GILBERT; MEYER, 2012) permitiram aos pesquisadores estudar o resistoma em uma infinidade de reservatórios diferentes, por exemplo, em humanos, animais, solo (FORSBERG *et al.*, 2014; PAL *et al.*, 2016; WRIGHT, 2007), lixo sanitário (PETERSEN *et al.*, 2015), esgoto (BENGTSSON-PALME *et al.*, 2016; FRESIA *et al.*, 2019), criações animais (BELTRAME *et al.*, 2022; MAK *et al.*, 2022), e de patógenos (DELGADO-BAQUERIZO *et al.*, 2020; DOMÍNGUEZ-BEGINES *et al.*, 2020), bem como seus riscos de disseminação via aplicações no solo e processos ecológicos (FORSBERG *et al.*, 2012; NESME; SIMONET, 2015).

O viruloma refere-se ao conjunto de genes que codificam fatores de virulência (VFs), os quais são essenciais para a capacidade de patógenos causarem doenças e evadirem as defesas do hospedeiro. Esses VFs são características moleculares que podem interagir com os genes de resistência antimicrobiana (ARGs), potencializando a patogenicidade dos microrganismos. A interação entre VFs e AMR pode levar a uma maior virulência e resistência a tratamentos, o que representa um desafio significativo para o controle de infecções (ESCUDEIRO et al., 2019).

Os elementos genéticos móveis (MGEs) incluem plasmídeos, transposons e fagos, que são segmentos de DNA capazes de se mover entre diferentes genomas, facilitando a transferência horizontal de genes de resistência e virulência (NOGUEIRA et al., 2009; NOGUEIRA; TOUCHON; ROCHA, 2012; SVARA; RANKIN, 2011). Esse processo permite que bactérias inicialmente não patogênicas ou comensais adquiram características patogênicas, transformando-as em patógenos oportunistas. A mobilidade desses elementos genéticos é um fator crucial na disseminação de características de resistência e virulência entre diferentes microrganismos e ambientes, influenciando a dinâmica das infecções e a eficácia dos tratamentos antimicrobianos (ESCUDEIRO et al., 2019).

### 1.3. GENES BACTERIANOS DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS

Os antimicrobianos representam uma das maiores conquistas da medicina, garantindo segurança no tratamento de doenças e na prevenção de complicações cirúrgicas, melhorando significativamente a longevidade e a qualidade de vida humana. No entanto, a crescente AMR emergiu como uma preocupação global em saúde pública. Os antimicrobianos mais comuns estão se tornando menos eficazes, tornando o tratamento de infecções cada vez mais difícil e ameaçando a saúde, o bem-estar, a produção de alimentos e a economia em escala global (ANVISA, 2017). A AMR é um dos maiores problemas associados à Saúde Única devido à sua forte relação com os microbiomas encontrados nos mais diversos ambientes (BAQUERO et al., 2019).

Estima-se que até 2050, a cada três segundos uma pessoa morrerá devido a essa questão, resultando em cerca de 10 milhões de óbitos por ano (ANVISA,

2017; BROGAN; MOSSIALOS, 2016; O'NEILL, JIM, 2016). Além disso, os impactos indiretos incluem perdas econômicas significativas devido à redução da produtividade global, prevendo-se que esses prejuízos alcancem cerca de 100 trilhões de dólares (ANVISA, 2017; BROGAN; MOSSIALOS, 2016; O'NEILL, JIM, 2016).

A AMR ocorre quando os microrganismos conseguem sobreviver a uma exposição que normalmente seria letal ou interromperia seu crescimento. Essa resistência pode surgir como uma propriedade intrínseca de uma espécie bacteriana ou ser adquirida ao longo do tempo. Mecanismos intrínsecos são aqueles que evoluíram como uma resposta geral aos antimicrobianos, como as respostas de reparo do DNA do tipo SOS, bombas de efluxo de amplo espectro, enzimas de inativação codificadas pelo cromossomo bacteriano e barreiras de entrada, como porinas e a presença de uma membrana externa em bactérias Gram-negativas. Por outro lado, os mecanismos de resistência adquirida envolvem adaptações específicas a determinados antimicrobianos, como bombas de efluxo para compostos específicos, expressão de alvos que não são sensíveis ao fármaco e enzimas que modificam o alvo ou o antimicrobiano. Esses mecanismos podem ser disseminados por meio de transferência gênica horizontal, como a conjugação, onde os genes de resistência são transferidos entre diferentes organismos bacterianos (SURETTE; WRIGHT, 2017).

A seleção e disseminação de mecanismos de AMR são impulsionadas pela pressão seletiva exercida pelo aumento e, muitas vezes, uso inadequado desses medicamentos na vida moderna. Esse uso excessivo e inadequado de antimicrobianos cria um ambiente propício para o surgimento e a disseminação de bactérias resistentes, como os patógenos resistentes a antimicrobianos ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e espécies de *Enterobacter*). Esses organismos compartilham um conjunto comum de características, como a capacidade de prosperar em ambientes de hospitais, e possuem um repertório de determinantes de resistência intrínsecos e adquiridos, que lhes permitiram se tornar uma causa significativa de infecções resistentes ao longo do tempo (MILLER; ARIAS, 2024). Os patógenos ESKAPE desenvolveram mecanismos de resistência contra uma ampla gama de classes de antimicrobianos, incluindo oxazolidinonas,

lipopeptídeos, macrolídeos, fluoroquinolonas, tetraciclina,  $\beta$ -lactâmicos, combinações de  $\beta$ -lactâmicos com inibidores de  $\beta$ -lactamase, bem como os considerados a última linha de defesa, como carbapenêmicos, glicopeptídeos e polimixinas clinicamente desfavoráveis (DE OLIVEIRA *et al.*, 2020).

*Enterococcus faecium* resistentes à vancomicina (VRE), representam uma preocupação significativa em ambientes hospitalares devido à sua resistência aos antimicrobianos, especialmente a vancomicina, um dos medicamentos mais importantes para o tratamento de infecções bacterianas graves (CIMEN *et al.*, 2023). Essas bactérias são capazes de causar uma variedade de infecções, incluindo infecções do trato urinário, bacteremias e de feridas. A resistência à vancomicina surge principalmente devido a alterações genéticas que afetam a síntese da parede celular bacteriana. A disseminação de VRE em hospitais pode resultar em infecções difíceis de tratar, prolongamento do tempo de internação, aumento dos custos de cuidados de saúde e maior morbidade e mortalidade entre os pacientes infectados (CIMEN *et al.*, 2023; DE OLIVEIRA *et al.*, 2020; MILLER; ARIAS, 2024).

*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), uma bactéria Gram-positiva, conhecida por sua extrema resistência a antimicrobianos e está associada a uma variedade de infecções, incluindo pneumonia, infecções de pele e tecidos moles, e infecções sanguíneas. MRSA demonstra resistência à maioria dos  $\beta$ -lactâmicos, incluindo as penicilinas antiestafilocócicas (como nafciclina, oxaciclina e flucloxacilina) e cefalosporinas (com a notável exceção da ceftarolina e ceftobiprole) (MILLER; ARIAS, 2024). Dados do National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) do Center for Disease Control and Prevention (CDC) dos Estados Unidos da América (EUA) indicam que desde 1999 a proporção de MRSA entre pacientes em unidades de terapia intensiva (UTI) ultrapassa 50%. No Brasil, os índices de cepas MRSA em UTIs também são consideravelmente elevados, variando de 40% a 80% (ANVISA, 2017).

As enterobactérias *Klebsiella pneumoniae* que produzem a enzima carbapenemase (KPC), pode causar resistência a todos os agentes  $\beta$ -lactâmicos, incluindo os carbapenêmicos, uma classe de antimicrobianos bastante usada para tratar infecções causadas por bactérias multirresistentes. O gene que codifica a enzima KPC foi identificado em plasmídeos, tendo grande potencial de disseminação. No Brasil, já foram reportados casos de *K. pneumoniae*, *Escherichia*

*coli*, *Proteus mirabilis* e *Serratia marcescens* carreando o gene *blaKPC* (DALMOLIN *et al.*, 2017; FIRMO *et al.*, 2020; RARO *et al.*, 2020).

*Acinetobacter baumannii* resistente a múltiplos medicamentos (MDR), esta bactéria é conhecida por sua resistência a uma ampla gama de antimicrobianos, incluindo carbapenêmicos, aminoglicosídeos e quinolonas. É uma causa comum de infecções nosocomiais, especialmente em pacientes gravemente doentes em unidades de terapia intensiva (DE OLIVEIRA *et al.*, 2020; IBRAHIM *et al.*, 2021).

*Pseudomonas aeruginosa* é resistente a uma ampla gama de antimicrobianos, incluindo cefalosporinas de primeira e segunda geração, piperacilina-tazobactam, aminoglicosídeos, quinolonas, carbapenêmicos e polimixinas. Essa resistência contribui para infecções do trato urinário, sanguíneas, respiratórias crônicas, de pele e tecidos moles, pneumonia associada à ventilação e endocardite. A taxa de mortalidade causada por *P. aeruginosa* MDR em infecções sanguíneas é de 67%, enquanto em infecções do trato urinário é de 33,9% (DE OLIVEIRA *et al.*, 2020; FERREIRO *et al.*, 2017).

*Klebsiella aerogenes* e *Enterobacter cloacae* representam ameaças crescentes em unidades neonatais e de terapia intensiva, com resistência a múltiplos medicamentos. O surgimento dessas espécies ocorreu em ondas epidêmicas simultâneas, com *E. aerogenes* prevalecendo até 2003 e *E. cloacae* assumindo depois. Nos Estados Unidos, linhagens de *E. aerogenes* são prevalentes em infecções nosocomiais, enquanto a resistência aos carbapenêmicos se espalhou pelo país devido à disseminação de isolados hospitalares resistentes. Recentemente, *E. aerogenes* MDR, inclusive à colistina, surgiu, representando um desafio adicional para o tratamento de infecções bacterianas (BAND *et al.*, 2016; DE OLIVEIRA *et al.*, 2020).

*E. coli*, apesar de não ser formalmente reconhecida como parte do grupo de patógenos ESKAPE, é responsável por infecções sanguíneas e do trato urinário em âmbitos comunitários e hospitalares globalmente. Pandemias de linhagens multirresistentes têm se disseminado. Altas taxas de resistência a aminopenicilinas, fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e cefalosporinas de terceira geração são observadas em toda a Europa, embora a resistência aos carbapenêmicos seja rara em cepas invasivas. A resistência à colistina, último recurso, também foi identificada.

*E. coli* AMR é atualmente um dos maiores ônus clínicos enfrentados tanto pela saúde humana quanto animal (DE OLIVEIRA *et al.*, 2020; LIU *et al.*, 2016).

O uso extensivo e indiscriminado de antimicrobianos acelera a diversificação e disseminação de ARGs em reservatórios ambientais e bactérias patogênicas (FORSBERG *et al.*, 2012). Embora a resistência aos antimicrobianos seja anterior à descoberta da penicilina por Fleming (PERRON *et al.*, 2015), diversos habitats bacterianos abrigam uma ampla gama de ARGs, suscetíveis à transferência para agentes patogênicos (ALLEN *et al.*, 2010; MONIER *et al.*, 2011; SOMMER; CHURCH; DANTAS, 2010). É comumente sugerido que o solo é uma fonte importante desses genes, influenciado tanto pela criação animal quanto pela ecologia natural da produção de antimicrobianos no solo (DAVIES; DAVIES, 2010; ZHANG *et al.*, 2015). A descoberta de ARGs em depósitos do Pleistoceno confirma que as bactérias já possuíam estratégias de resistência há milênios (D’COSTA *et al.*, 2006; TAVARES *et al.*, 2013; THOMPSON *et al.*, 2023), sugerindo que esses genes podem ser transmitidos horizontalmente e espalhados por diferentes gêneros bacterianos.

O resistoma móvel se refere ao conjunto de ARGs que são capazes de serem transferidos horizontalmente entre diferentes espécies bacterianas. Ao contrário do enfoque em bactérias resistentes específicas, a investigação desse resistoma móvel proporciona uma compreensão mais abrangente da epidemiologia dos ARGs, especialmente na interface complexa entre os ecossistemas humano e animal. Essa abordagem permite uma análise mais ampla da disseminação e da dinâmica dos genes de resistência em diferentes ambientes microbiológicos (HU *et al.*, 2016). Em 2016, um estudo investigou a influência do uso de antimicrobianos na composição do resistoma suíno. Maiores abundâncias de ARGs foram observadas em animais alimentados continuamente com baixas doses de antimicrobianos (XIAO *et al.*, 2016). Esses ARGs podem se disseminar pelos ecossistemas sendo adquiridos por patógenos capazes de afetar a saúde humana (FORSBERG *et al.*, 2012; NESME; SIMONET, 2015). Dessa forma, desvendar como a atividade humana e as práticas da agropecuária podem atingir e influenciar na transferência de ARGs, bem como afetar o resistoma encontrado nos diversos ambientes, é crucial, não apenas do ponto de vista do risco para a saúde pública, mas também para facilitar o desenvolvimento de medidas de controle adequadas.

Além disso, mais de 30 anos se passaram sem a descoberta de novas classes de antimicrobianos, agravando ainda mais o problema da resistência (SILVER, 2011). Para combater a resistência antimicrobiana, algumas estratégias recomendadas pela CDC (2024), incluem: (1) prevenir infecções e evitar a propagação da resistência; (2) rastrear a disseminação de resistência; (3) melhorar a prescrição e o uso de antimicrobianos; e (4) desenvolver novas drogas e diagnósticos. A bioinformática pode desempenhar um papel fundamental nas nessas estratégias, auxiliando na análise e interpretação de dados microbiológicos.

As metodologias clássicas de detecção de microrganismos resistentes podem levar dias, semanas ou até meses, dependendo da espécie, para produzir resultados. Além disso, apenas uma pequena fração das espécies microbianas pode ser cultivada e crescida em laboratório. Em contraste, metodologias que utilizam sequenciamento de DNA podem fornecer resultados em questão de horas ou poucos dias. Esse método permite a análise direta de todo o DNA presente em uma amostra ambiental, sem a necessidade de cultivo, possibilitando o estudo da diversidade microbiana completa, incluindo microrganismos que não são cultiváveis em condições laboratoriais tradicionais (DIDELOT et al., 2012).

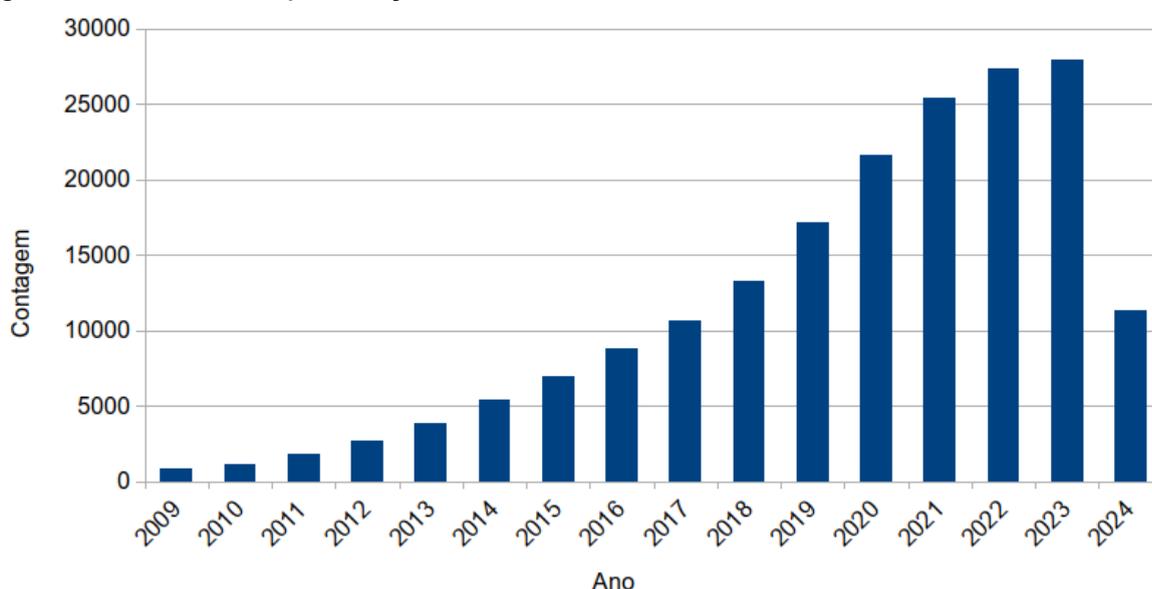
#### 1.4. SEQUENCIAMENTO DE DNA

No final da década de 1970, Carl Woese propôs o uso de genes que codificam o RNA ribossomal (rRNA) como marcadores moleculares para a classificação da vida (WOESE; FOX, 1977). Essa ideia, aliada ao método de sequenciamento automatizado de Sanger (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977), revolucionou o estudo e a classificação de microrganismos. Algumas décadas depois, avanços em técnicas moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), foram aplicados à descrição da diversidade microbiana, proporcionando acesso a uma nova gama de microrganismos não cultiváveis. O primeiro estudo da comunidade microbiana utilizando bibliotecas de genes 16S rRNA foi realizado em 1986 (PACE et al., 1986).

A partir de 2009, as publicações de estudos de microbiomas tiveram um crescimento exponencial, partindo de 811 publicações com o termo "microbiome" no PubMed em 2009 para 27.983 em 2023 (Figura 1) (CONRADTS; ABDELBAR, 2019;

ESCOBAR-ZEPEDA; LEÓN; SANCHEZ-FLORES, 2015). Este aumento substancial se deu principalmente devido ao avanço nas técnicas de sequenciamento de DNA, que evoluíram desde o método automatizado Sanger do início da década de 1990, considerado a primeira geração, até os métodos lançados a partir de 2005, conhecidos como sequenciamento de nova geração (do inglês, *Next Generation Sequencing* - NGS). Essas novas tecnologias são influenciadas por diversos fatores, como a preparação das amostras (montagem das bibliotecas), a tecnologia de sequenciamento e os métodos de análise aplicados (BENN *et al.*, 2018; CLOONEY *et al.*, 2016; CONRADS; ABDELBARY, 2019).

Figura 1 - Número de publicações com o termo “microbiome” no PubMed.



Fonte: elaborado pela autora.

Legenda: Pesquisa realizada no dia 08/05/2024.

As plataformas de sequenciamento podem ser divididas em três tipos: sequenciamento de primeira, segunda e terceira geração. As plataformas de sequenciamento diferem principalmente em relação ao tamanho e quantidade de dados gerados (sequências, ou, do inglês, *reads*), a qualidade desses *reads*, o tempo e o custo necessários para gerá-los (HORNER *et al.*, 2010; POP, 2009).

O sequenciamento de primeira geração refere-se ao método desenvolvido por Sanger, Nicklen e Coulson (1977), que consiste na geração de uma fita complementar de DNA a partir de uma fita molde, na presença de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs) - utilizados pela DNA polimerase - e

didesoxirribonucleotídeos trifosfatados (ddNTPs), que interrompem o processo quando inseridos nas terminações das cadeias dos oligonucleotídeos sintetizados. Os ddNTPs terminais são então utilizados para revelar a sequência de DNA presente na fita molde (MOROZOVA; MARRA, 2008; SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977). Atualmente, o sequenciamento Sanger é realizado em capilares em um processo automatizado, capaz de recuperar até 96 sequências por corrida, com um comprimento médio dos *reads* gerados de 650 pares de base (pb) (ESCOBAR-ZEPEDA; LEÓN; SANCHEZ-FLORES, 2015).

As tecnologias de segunda geração permitem a geração de um maior volume de dados com um custo menor em comparação com o método de Sanger (DOMINGUEZ DEL ANGEL *et al.*, 2018; METZKER, 2010). Para que os dados sejam gerados, as plataformas de segunda geração requerem uma etapa de amplificação antes do sequenciamento em massa, e ambas as etapas utilizam o princípio do método de Sanger, de leitura por extensão, onde bases marcadas complementares à fita molde são adicionadas à nova fita sintetizada (HORNER *et al.*, 2010). Os sequenciadores de segunda geração mais utilizados atualmente, como o Illumina MiSeq, podem gerar *reads* mais longos (2x300 pb) com um volume de dados menor (15Gb), em comparação com o Illumina HiSeq, que produz *reads* mais curtos (2x150 pb) com um volume de dados maior (até 1Tb) (BENN *et al.*, 2018; CLOONEY *et al.*, 2016; CONRADS; ABDELBAR, 2019). O Illumina NovaSeq pode gerar um volume ainda maior de dados, chegando até 6Tb, com um tamanho máximo de *read* intermediário às duas tecnologias citadas anteriormente (2x250 pb).

Por fim, os métodos de sequenciamento de terceira geração diferem dos demais em várias características: eles possibilitam a geração de *reads* mais longos sem a necessidade de uma etapa preliminar de amplificação, reduzindo assim o tempo de preparação para o sequenciamento (CONRADS; ABDELBAR, 2019; DOMINGUEZ DEL ANGEL *et al.*, 2018; LIU *et al.*, 2012). Uma nova característica presente nos métodos de sequenciamento de terceira geração é a capacidade de *basecalling* (chamada de base) em tempo real, à medida que novos nucleotídeos são adicionados à fita complementar sintetizada (LIU *et al.*, 2012). Os sequenciadores de terceira geração, como o Pacific Biosciences (PacBio), realizam o sequenciamento de uma única molécula em tempo real (SMRT) e geram um pequeno número de sequências muito longas (de 5.000 até 30.000 pb) (CONRADS;

ABDELBAR, 2019). Outro sequenciador de terceira geração que tem se popularizado é o sistema de nanoporos da *Oxford Nanopore Technology* (ONT), que utiliza tecnologia de detecção de nanoporos. Um exemplo é o aparelho MinION, um dispositivo extremamente compacto com um peso de 100 gramas, do tamanho de um grampeador, projetado para sequenciamento portátil de DNA (CONRADS; ABDELBAR, 2019).

Uma das grandes vantagens das tecnologias de sequenciamento de segunda e terceira geração em relação à primeira geração é que a preparação da biblioteca não requer vetores de clonagem de DNA ou hospedeiros bacterianos, simplificando assim o processo e reduzindo a contaminação por DNA de outros organismos que não fazem parte do metagenoma (ESCOBAR-ZEPEDA; LEÓN; SANCHEZ-FLORES, 2015).

Embora as tecnologias de sequenciamento de nova geração gerem um grande volume de dados e nos permitam descobrir novos mundos microbianos e explorar novos ambientes, elas apresentam limitações e vieses que devem ser contornadas. Os dados obtidos a partir de tecnologias de sequenciamento de segunda ou terceira geração requerem recursos computacionais específicos para análise. Quanto maior o conjunto de dados gerados, mais recursos computacionais e análises de bioinformática mais complexas são necessárias. Com isso, a capacidade de armazenamento, processamento e análise desses dados abundantes tornou-se um fator limitante para execução. Sendo assim, a aplicação e o desenvolvimento de conceitos e soluções em *Big Data* dentro da bioinformática são essenciais para aprimorar o uso desses dados e melhorar as análises de dados metagenômicos (ESCOBAR-ZEPEDA; LEÓN; SANCHEZ-FLORES, 2015; HE; GE; HE, 2017).

## 1.5. ANÁLISE DE DADOS DE MICROBIOMA

### 1.5.1. Metagenoma

Ao contrário do sequenciamento por *shotgun* de todo o genoma (do inglês, *Whole Genome Sequencing* - WGS) de organismos individuais, em que o resultado é idealmente um único genoma totalmente montado, os metagenomas tendem a não

ter uma única "linha de chegada" e têm sido analisados com sucesso usando uma variedade de técnicas (BELTRAME *et al.*, 2022; DANKO *et al.*, 2021; QIU *et al.*, 2022). O método mais simples não envolve nenhuma montagem e parte do princípio de que os *reads* produzidos como dados primários são tratados como marcadores taxonômicos ou como fragmentos de genes, após um controle de qualidade, e podem ser analisados diretamente. Esta estratégia é conhecida como baseada em sequência. De modo geral, as análises baseadas em sequências produzem bons resultados quando a diversidade microbiana das amostras é relativamente bem conhecida (KNIGHT *et al.*, 2018), mas os resultados finais podem ser fortemente influenciados pela escolha do banco de dados (BREITWIESER *et al.*, 2019; SHAIBER; EREN, 2019). Ferramentas de inferência de perfis taxonômicos visam identificar todas as taxa presentes na amostra e a abundância pode ser estimada pelo número de sequências atribuídas para cada taxa. Alguns classificadores comumente utilizados para esse fim são Kraken2 (WOOD; LU; LANGMEAD, 2019), Kaiju (MENZEL; NG; KROGH, 2016) e MetaPhlan3 (BEGHINI *et al.*, 2021).

A análise funcional na metagenômica concentra-se na predição de possíveis genes funcionais presentes no metagenoma. Um dos principais objetivos da metagenômica é investigar as funções desempenhadas pela comunidade microbiana na totalidade, além de compreender como taxa individuais contribuem para essas funções. Os perfis funcionais baseados em sequências visam principalmente caracterizar o potencial funcional global, quantificando as famílias gênicas e as vias metabólicas (BHARTI; GRIMM, 2021; KNIGHT *et al.*, 2018). No entanto, associar genes a taxa usando apenas informações de sequências pode ser bastante desafiador, dado que a informação em sequências curtas frequentemente é insuficiente para distinguir entre genes homólogos. Os genes são considerados homólogos quando suas sequências de DNA derivam de um ancestral comum (KNIGHT *et al.*, 2018).

A análise funcional baseada em sequências depende de um ou mais bancos de dados de genes e proteínas para a anotação. As pesquisas nos bancos de dados podem ser realizadas ao nível de sequências de nucleotídeos ou aminoácidos, utilizando ferramentas de alinhamento local como BlastX (CAMACHO *et al.*, 2009) ou Diamond (BUCHFINK; REUTER; DROST, 2021). Alguns dos bancos de dados de vias metabólicas comumente usados incluem COG (GALPERIN *et al.*, 2015),

EggNOG (HUERTA-CEPAS *et al.*, 2019) e KEGG (KANEHISA *et al.*, 2016). Alternativamente, também é possível mapear as sequências em famílias de proteínas, contra bancos de dados como Pfam (MISTRY *et al.*, 2021) ou TIGRfam (HAFT; SELENGUT; WHITE, 2003), utilizando o HMMER (MISTRY *et al.*, 2013). A cobertura e a abundância das vias metabólicas podem ser calculadas a partir das abundâncias das famílias gênicas, utilizando bancos de dados como MetaCyc (CASPI *et al.*, 2020) ou KEGG. Alguns exemplos de pipelines disponíveis para caracterização funcional incluem METABOLIC (ZHOU *et al.*, 2022), HUMAnN3 (BEGHINI *et al.*, 2021), ShotMAP (NAYFACH *et al.*, 2015) e Fun4me (SHARIFI; YE, 2017). Além disso, existem alguns serviços online que podem ser usados tanto para caracterização funcional quanto taxonômica, como MG-RAST (KEEGAN; GLASS; MEYER, 2016), IMG/M (CHEN *et al.*, 2017) e EBI *metagenomics* (HUNTER *et al.*, 2014).

Uma alternativa aos métodos baseados em sequências é a reconstrução dos genomas presentes nas amostras utilizando métodos de montagem de sequências. Esses genomas resultantes da análise de dados metagenômicos são conhecidos como MAGs (do inglês, *metagenome-assembled genomes*). A montagem genômica feita com dados metagenômicos apresenta desafios que dificultam a obtenção de um genoma completo, como a mistura de diversos taxa com tamanhos de fragmentos e coberturas desiguais, resultantes das diferentes abundâncias presentes na amostra. Diferentes montadores metagenômicos foram desenvolvidos nos últimos anos, a maioria deles baseados em grafos de Bruijn. Ferramentas comumente citadas incluem Megahit (LI *et al.*, 2015), SPAdes (BANKEVICH *et al.*, 2012) e MetaSPAdes (NURK *et al.*, 2017). Embora a escolha da ferramenta de montagem não seja trivial, o montador Megahit é frequentemente recomendado como ponto de partida devido à qualidade da montagem, uso de recursos e velocidade em comparação com outros montadores (AYLING; CLARK; LEGGETT, 2020; SCZYRBA *et al.*, 2017).

As estratégias de montagem variam dependendo do número de amostras, da profundidade do sequenciamento e da complexidade da comunidade microbiana (GHURYE; CEPEDA-ESPINOZA; POP, 2016). Idealmente, as amostras devem ser reconstruídas individualmente para maximizar a captura da variação específica da amostra. No entanto, para melhorar a recuperação de microrganismos de baixa

abundância, as amostras também podem ser montadas em conjunto, embora isso possa resultar na perda da variação individual da amostra, e gerar possíveis quimeras. As sequências reconstruídas são normalmente chamadas de *contigs*, que representam a junção contínua de diversos *reads*. A qualidade da montagem pode ser avaliada por estatísticas, como o tamanho dos *contigs* e sua cobertura, além da porcentagem de *reads* utilizados nas montagens.

O próximo passo após a montagem é o *binning* (agrupamento): o objetivo é agrupar os *contigs* em *bins* que pertencem ao mesmo táxon. As ferramentas de *binning* de novo (que realizam esse agrupamento sem uma referência) disponíveis, contam com duas estratégias principais para separar os *bins*: baseado na composição das sequências, na cobertura, ou na combinação de ambas. O *binning* baseado na composição das sequências é derivado da observação de que a composição de tetrâmeros de fragmentos do mesmo genoma será semelhante. Em contraste, o *binning* baseado em cobertura parte do pressuposto de que a cobertura dos *contigs* do mesmo genoma será covariável entre diferentes amostras. Ferramentas de *binning* de última geração, como CONCOCT (ALNEBERG *et al.*, 2014), Metabat2 (KANG *et al.*, 2015) e MaxBin 2.0 (WU; SIMMONS; SINGER, 2016), usam uma combinação de ambas as estratégias. Já existem ferramentas que combinam os resultados de diferentes *binners*, como o meta-binner Das-Tool (SIEBER *et al.*, 2018). Alternativamente, *bins* de genoma podem ser inferidos anotando taxonomicamente cada *contig* e agrupando *contigs* com a mesma anotação taxonômica (SCZYRBA *et al.*, 2017).

*Bins* podem ser avaliados utilizando diversas ferramentas para determinar a qualidade dos genomas recuperados. Ferramentas como checkM (PARKS *et al.*, 2015) ou metaQUAST (MIKHEENKO; SAVELIEV; GUREVICH, 2016) podem ser empregadas para esse propósito. Métricas comuns incluem contaminação, integridade do genoma e pureza. Os *bins* podem ser refinados manualmente com o auxílio de anotações e ferramentas multifuncionais como Anvi'o (EREN *et al.*, 2015). Posteriormente, os *bins* que passaram pelo processo de controle de qualidade podem ser classificados taxonomicamente utilizando ferramentas como Kraken2 (WOOD; LU; LANGMEAD, 2019), GTDB-Tk (CHAUMEIL *et al.*, 2022) ou MEGAN (HUSON *et al.*, 2007), e Filogeneticamente por meio de ferramentas como PhyloPhlAn (SEGATA *et al.*, 2013). Além disso, os genes preditos e anotados podem

ser obtidos utilizando ferramentas como FragGeneScan (RHO; TANG; YE, 2010), MetaGeneMark (ZHU; LOMSADZE; BORODOVSKY, 2010) ou Prokka (SEEMANN, 2014).

### 1.5.2. Microbiota

Uma alternativa para determinar o perfil da microbiota em um determinado ambiente é o sequenciamento de um marcador genético ou *amplicon*, método também conhecido como *metabarcoding*. Identificar o perfil de comunidades microbianas usando marcadores genéticos, como os genes 16S rRNA, é um método direto e econômico para estudar a composição taxonômica e Filogenética de uma comunidade microbiana, embora a resolução taxonômica seja limitada devido à conservação do marcador genético e ao comprimento do produto de *amplicon* (PETERSON *et al.*, 2021). Além disso, o marcador genético não nos fornece a capacidade funcional da comunidade microbiana, apesar de existirem ferramentas para estimá-la (DOUGLAS *et al.*, 2020; WEMHEUER *et al.*, 2020). A abordagem de sequenciamento de *amplicon* foi fundamental para a primeira análise em larga escala de comunidades bacterianas humanas (COSTELLO *et al.*, 2009; GRICE *et al.*, 2009; RAVEL *et al.*, 2011) e para o estabelecimento e execução do HMP, um esforço sistemático para mapear a diversidade da microbiota no corpo humano (HUTTENHOWER *et al.*, 2012).

A grande diferença em relação ao método de *shotgun* é a realização de uma PCR com iniciadores específicos para o marcador genético de interesse na montagem das bibliotecas, visando enriquecer o marcador genético. No entanto, essa etapa pode introduzir artefatos nas sequências (erros de PCR) e, posteriormente, viés na quantificação de taxa nos perfis taxonômicos resultantes (ACINAS *et al.*, 2005; TREMBLAY *et al.*, 2015). Por exemplo, a escolha de iniciadores que se ligam ao marcador genético durante a amplificação ou a presença de íntrons demonstraram ter um grande efeito na caracterização da comunidade do microbioma (CHEN *et al.*, 2019; SALMAN *et al.*, 2012; TREMBLAY *et al.*, 2015). Embora essa abordagem possa ser estendida para diferentes organismos, como arqueias, fungos, nematoides e outros eucariotos, ela não é adequada para uma inspeção universal de vírus devido ao baixo nível de conservação de genes entre os

vírus (KUCZYNSKI *et al.*, 2012). Apesar da necessidade de uma etapa de amplificação por PCR, esta análise de perfil microbiano requer um número relativamente baixo de sequências por amostra para maximizar a identificação de taxa raras e geralmente é mais econômico do que o sequenciamento metagenômico *shotgun*.

Uma maneira de descrever o perfil taxonômico da microbiota com base em dados de *amplicon* é criar Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs). As OTUs são agrupamentos de sequências com alta identidade (comumente 97% de similaridade) e representam a "unidade" de análise de nível mais baixo. Nos últimos anos, uma nova abordagem metodológica passou a ser adotada com o uso de Variantes de Sequência de *Amplicon* (ASVs). Essas metodologias, conhecidas como *denoising* empregam um modelo probabilístico para avaliar a probabilidade de uma sequência rara ser uma variante biológica verdadeira (CALLAHAN *et al.*, 2016).

Três exemplos de pipelines de *denoising* amplamente utilizadas para a produção de ASVs são: DADA2 (CALLAHAN *et al.*, 2016), Deblur (AMIR *et al.*, 2017) e UNOISE (EDGAR, 2016). Todos os *denoisers* são projetados para lidar com dados de *reads* curtos gerados pelas plataformas de sequenciamento Illumina, embora os autores da pipeline DADA2 sugiram que o método também pode ser aplicado a sequências produzidas por pirosequenciadores do tipo 454 (tecnologia de 2ª geração). Uma análise sugere que os resultados gerados pelas três pipelines são comparáveis, embora o número total de ASVs previstos varie com o conjunto de dados (NEARING *et al.*, 2018). Do ponto de vista da utilização de recursos computacionais, o UNOISE3 é o mais rápido das alternativas, mas o DADA2 pode ser melhor na recuperação de organismos de baixa abundância. Em geral, as abordagens baseadas em OTUs tendem a superestimar a diversidade (NEARING *et al.*, 2018). Além disso, a identificação de OTUs ou ASVs é independente do banco de dados, portanto, pode ser usada para identificar novos microrganismos em ambientes previamente não amostrados (CALLAHAN; MCMURDIE; HOLMES, 2017).

Uma vez identificadas as OTUs/ASVs, três resultados principais são produzidos para permitir as próximas análises: uma matriz de abundância (quantidade de sequências obtidas para cada OTUs/ASVs), uma árvore Filogenética e a anotação taxonômica das OTUs/ASVs. A matriz de abundância é construída

contando as sequências pertencentes a cada OTU/ASV em cada uma das amostras. A árvore Filogenética é construída a partir da execução de um alinhamento de múltiplas sequências das sequências representativas de cada OTU/ASV e, em seguida, usando o alinhamento para criar uma árvore Filogenética. Finalmente, as sequências podem ser anotadas taxonomicamente comparando-as com um banco de dados de sequências com anotação taxonômica. Normalmente, a classificação taxonômica é realizada utilizando um classificador Naïve Bayes (MCMURDIE; HOLMES, 2013). Alguns bancos de dados comumente usados para essa finalidade para os genes 16S rRNA são SILVA (GLÖCKNER *et al.*, 2017), Greengenes (DESANTIS *et al.*, 2006), Ribosomal Database Project (RDP) (COLE *et al.*, 2005), Refseq (SCHOCH *et al.*, 2020) e o GTDB (PARKS *et al.*, 2022). Para a região ITS, são geralmente utilizados o UNITE (ABARENKOV *et al.*, 2024) e o Mycobank (ROBERT *et al.*, 2013).

### 1.5.3. Conceitos e aplicações de ecologia microbiana

As informações biológicas obtidas tanto a partir de dados de metagenoma como de microbiota, após o processamento, podem ser resumidas como um conjunto de abundância ou matrizes binárias de amostras compostas por múltiplas características (como OTUs, ASVs, taxonomias, genes e vias metabólicas), com metadados associados para amostras ou para as características a serem avaliadas. Esses conjuntos de dados proporcionam uma visão detalhada da composição e funcionalidade das comunidades microbianas em diferentes ambientes, permitindo análises comparativas e investigações em diversos campos da biologia e da saúde (BHARTI; GRIMM, 2021).

Devido à natureza dos dados, a normalização mais comum é a abundância relativa, realizada para ajustar as abundâncias à profundidade de sequenciamento da amostra. Algumas ferramentas de *shotgun* produzem abundâncias relativas diretamente (por exemplo, como porcentagens). Para dados de *shotgun*, as estimativas de abundância também podem ser ajustadas para o tamanho do genoma microbiano ou comprimento do gene. Alguns pacotes da linguagem de programação R (<https://www.R-project.org/>) também tentam solucionar esse problema usando métodos estatísticos de transformação. Para remover a

dependência da variação da profundidade do sequenciamento, podemos citar entre eles o DESeq2 (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014), metagenomeSeq (PAULSON *et al.*, 2013) e o edgeR (MCCARTHY; CHEN; SMYTH, 2012).

Para analisar microbiomas ao nível de comunidade, precisamos de métodos para resumir características de toda a comunidade, como a distribuição dos microrganismos, ou encontrar maneiras de comparar diretamente perfis microbianos inteiros. As medidas de diversidade alfa e beta podem ser bastante úteis para abordar esse problema. Pacotes comuns para realizar essas análises incluem vegan (OKSANEN *et al.*, 2022) e o microbiome (LAHITI, LEO; SHETTY, SUDARSHAN, 2017), phyloseq (MCMURDIE; HOLMES, 2013). Além disso, o Qiime2 (BOLYEN *et al.*, 2019) é um programa amplamente reconhecido que realiza essas análises.

A diversidade alfa é uma medida que descreve a diversidade de espécies em um ambiente 'local'. Embora o termo 'local' possa variar entre ecologistas, em estudos de microbioma, a estimativa de um índice de diversidade alfa é calculada por amostra. A distribuição do índice é então analisada conforme os grupos de amostras relevantes (por exemplo, condição da doença, local anatômico). Os índices de diversidade alfa normalmente consideram o número de espécies (ou seja, riqueza) e a distribuição de abundâncias de espécies (ou seja, equitatividade) (KNIGHT *et al.*, 2018).

A riqueza de espécies pode ser estimada diretamente a partir do número de espécies observadas em uma amostra. No entanto, devido à profundidade limitada de sequenciamento, esperamos que o número de espécies observadas seja uma subestimativa do valor real da riqueza (HUGHES *et al.*, 2001). Portanto, alguns índices como Chao1 e ACE visam estimar a riqueza de espécies como o "número efetivo de espécies". Por exemplo, Chao1 estima o número de espécies ausentes em uma amostra com base na abundância de espécies raras, como as que são observadas apenas em uma ou poucas sequências (CHAO, 1984). Os estimadores do tipo ACE dependem do inverso da contagem de sequências únicas (HUGHES *et al.*, 2001). As curvas de rarefação também podem ser usadas para estimar a riqueza, mas têm sido pouco utilizadas devido a subestimação (MCMURDIE; HOLMES, 2013).

Um índice muito usado para medir a uniformidade das abundâncias de espécies é o índice de Shannon-Wiener, baseado na entropia de Shannon que mede

a entropia de informação (ou incerteza) em uma amostra (SHANNON, C. E., 1948). É calculado considerando o número de espécies, a proporção que cada espécie representa do número total de indivíduos, e somando a proporção multiplicada pelo logaritmo natural da proporção para cada espécie. Como o resultado é um número negativo, então tomamos o negativo desse valor. Quanto maior o número, maior é a diversidade de espécies (NOLAN; CALLAHAN, 2006). Uma medida semelhante é o índice de diversidade de Simpson, formulado como a probabilidade de que duas espécies selecionadas ao acaso resultará em ambos os indivíduos sendo da mesma espécie (SIMPSON, 1949). Os índices de diversidade alfa são úteis para identificar diferenças ou mudanças na distribuição da microbiota entre grupos de amostras. As medidas podem ajudar a identificar mudanças totais no número de espécies nas amostras, ou diferenças na abundância microbiana.

A diversidade beta foi formalmente definida como a razão entre a diversidade local (alfa) e a total (do ecossistema em estudo). No entanto, em análises metagenômicas, os índices de diversidade beta são usados como medidas de distância ou dissimilaridade aos pares para explorar a variabilidade dentro e entre grupos de amostras (por exemplo, condição clínica, natureza da amostra). Duas métricas bastante utilizados são os de Jaccard e o de Bray-Curtis. O índice de Jaccard é uma métrica que considera apenas a presença ou ausência de cada táxon. É calculado como a razão de espécies comuns entre ambas as amostras divididas pelo número total de espécies únicas. A dissimilaridade de Bray-Curtis considera não apenas a presença, mas também a abundância dos taxa comuns entre as amostras (BRAY; CURTIS, 1957).

As distâncias calculadas a partir dos índices de diversidade beta podem ser usadas para comparar grupos usando um teste estatístico chamado Análise de Variância Permutacional Multivariada (Adonis) ou PERMANOVA (TANG; CHEN; ALEKSEYENKO, 2016). A PERMANOVA testa a hipótese nula de que os centróides e a dispersão dos grupos são iguais. Uma alternativa seria o teste de Análise de Similaridades (ANOSIM), um teste não-paramétrico cujo objetivo é comparar conjuntos de amostras através da similaridade dentro dos grupos e entre eles (ANDERSON; WALSH, 2013). Para visualização da diversidade beta, é muito comum usar um método de ordenação como a Análise de Coordenadas Principais

(PCoA). A ordenação é o processo de projetar amostras em um espaço de baixa dimensão (duas ou três) para visualização.

Outra maneira de abordar os dados do microbioma é examinar a associação ou a diferença entre características individuais (microrganismos ou genes) e fenótipos ou grupos de amostras. Essa abordagem é conhecida como análise de abundância diferencial. Diferentes abordagens têm sido utilizadas na literatura para testes de abundância diferencial. Muitos estudos realizam análises de abundância diferencial usando testes estatísticos não paramétricos, como Kruskal-Wallis ou teste de Wilcoxon (MORGAN; HUTTENHOWER, 2012). O problema da expressão diferencial do RNA-seq é análogo ao problema da abundância diferencial do microbioma, por isso muitos autores optaram por aplicar ferramentas da transcriptômica, como DESeq2 (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014) e edgeR (ROBINSON; MCCARTHY; SMYTH, 2010). Outro pacote bastante utilizado é o ANCOM que considera a composição das amostras (MANDAL *et al.*, 2015). Um estudo sugere que esses métodos funcionam bem para dados de microbioma (WEISS *et al.*, 2017).

#### 1.5.4. Ferramentas de predição e bancos de dados de ARGs

Algumas ferramentas específicas de identificação e anotação de ARGs foram desenvolvidas nos últimos anos. Entre os bancos de dados criados, alguns foram descontinuados, como o RAC (Repository of Antibiotic resistance Cassettes) (TSAFNAT; COPTY; PARTRIDGE, 2011) e o ARDB (Antibiotic Resistance Genes Database) (LIU; POP, 2009), enquanto outros foram continuamente atualizados, como o MEGARes (um banco de dados de ARGs para sequenciamento de alto rendimento) (DOSTER *et al.*, 2020) e o CARD (Comprehensive Antibiotic Research Database) (ALCOCK *et al.*, 2020).

Em 2019, uma revisão da literatura identificou pelo menos 47 ferramentas de bioinformática de acesso livre desenvolvidas para esse fim (PENG *et al.*, 2021). Dentre elas, destacam-se o Resfams (GIBSON; FORSBERG; DANTAS, 2015), ARG-ANNOT (Antibiotic Resistance Gene-ANNOTation) (GUPTA *et al.*, 2014), SEAR (Search Engine for Antimicrobial Resistance) (ROWE *et al.*, 2015), DeepArg (ARANGO-ARGOTY *et al.*, 2018), AMR++ 2.0 (DOSTER *et al.*, 2020), PATRIC

(Pathosystems Resource Integration Center) (ANTONOPOULOS *et al.*, 2019), ResFinder (BORTOLAIA *et al.*, 2020) e ABRicate (SEEMANN, 2024). Cada ferramenta possui diferentes características, como o formato de dados de entrada, a utilização de bancos de dados próprios ou de terceiros, e os métodos de classificação empregados, como mapeamento ou alinhamento.

Dentre as ferramentas citadas, algumas são amplamente utilizadas ou frequentemente atualizadas, como o CARD, o MEGARes, o ResFinder e o ABRicate. O CARD, publicado em 2013, é um banco de dados específico de ARGs que integra dados heterogêneos e pode identificar ARGs em novas sequências genômicas por meio da ferramenta RGI (Resistance Gene Identifier) (ALCOCK *et al.*, 2020). Enquanto o MEGARes, criado em 2016 e atualizado em 2019, contém por volta de 8.000 ARGs curados manualmente e possui a ferramenta AMR++ 2.0 para análise de dados metagenômicos (DOSTER *et al.*, 2020). Já o ResFinder, publicado em 2012, é uma ferramenta online que utiliza o programa BLAST para identificar ARGs adquiridos em dados genômicos (BORTOLAIA *et al.*, 2020). Por fim, o ABRicate, lançado em 2018, é uma ferramenta de triagem em massa de contigs em busca de ARGs ou VFs, utilizando diversos bancos de dados (SEEMANN, 2024).

Essas ferramentas são essenciais para identificar estratégias de controle e prevenção contra a crescente ameaça dos ARGs, permitindo o estabelecimento de vigilância global de patógenos e rastreamento de ARGs com base na metagenômica. No entanto, ainda há a necessidade de padronização de pipelines e bancos de dados, além de previsões fenotípicas com base nos dados. Também é importante destacar que, atualmente, são poucas as opções de ferramentas específicas para identificação ou anotação de ARGs a partir de dados metagenômicos, entre elas estão MEGARes, CARD e ABRicate.

## 1.6. ANTIMICROBIANOS E PRODUÇÃO ANIMAL

Os dados e registros disponíveis sobre o uso de antimicrobianos tanto na avicultura quanto na suinocultura em Santa Catarina são muito escassos. Estatísticas relativas à administração de antimicrobianos para suínos nos EUA mostram que algumas moléculas se destacam por suas altas taxas de uso, como os beta-lactâmicos (45 mg/kg de massa viva comercializada), macrolídeos (12 mg/kg de

massa viva comercializada) e tetraciclina (110 mg/kg de massa viva comercializada) somente em 2017 (DAVIES; SINGER, 2020). Já para as granjas de frango, observa-se uma alta quantidade de antimicrobianos, como penicilinas (18.000 kg), tetraciclina (10.000 kg), bacitracina (5.000 kg) e sulfonamidas (2.000 kg), administrados na água para as aves durante o ano de 2017 (SINGER *et al.*, 2020).

No entanto, observa-se uma tendência em vários países de implementar políticas e regulamentações para reduzir ou banir o uso de antimicrobianos na produção animal. No Brasil, o uso de antimicrobianos na produção animal é regulamentado e se dá em duas formas: terapêutica, para tratar doenças, e não terapêutica, como aditivos melhoradores de desempenho. A legislação brasileira, administrada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) através do Departamento de Saúde Animal (DSA), tem implementado restrições quanto ao uso de antimicrobianos na alimentação animal para mitigar o risco de resistência antimicrobiana e proteger a saúde humana. Desde 1998, a avoparcina foi proibida, e posteriormente foram banidas como aditivos substâncias como anfenicóis, tetraciclina, penicilina, cefalosporinas, quinolonas, sulfonamidas, eritromicina, espiramicina, colistina, tilosina, lincomicina e tiamulina. Essas restrições seguem recomendações internacionais para garantir um uso responsável dos antimicrobianos (MAPA, 2022).

A iniciativa de reduzir o uso de antimicrobianos como promotores de crescimento tem estimulado pesquisas para desenvolver métodos alternativos que possam minimizar simultaneamente o impacto dos parasitas e atuar como promotores de crescimento. O equilíbrio da microbiota intestinal é fundamental para o bom desempenho animal, especialmente diante dos desafios sanitários. Portanto, um número crescente de estudos está sendo conduzido para descrever a microbiota dos animais em sistemas de produção, bem como para testar novos compostos como substitutos aos antimicrobianos em criações animais.

Ao longo dos anos, os antimicrobianos utilizados como promotores de crescimento desempenham um papel crucial no controle de patógenos e na preservação da integridade intestinal. A melhoria de desempenho atribuída aos antimicrobianos está relacionada à modificação da microbiota intestinal. Esses agentes promovem um equilíbrio significativo na população microbiana, reduzindo o

número de microrganismos produtores de toxinas no lúmen intestinal (YI *et al.*, 2005), além de agirem como agentes antibacterianos e anti-inflamatórios diretos (NIEWOLD, 2007). Estudos demonstraram que a administração de um produto comercial contendo uma mistura de líquido de casca de castanha de caju e óleo de mamona (óleo funcional) resultou em um melhor equilíbrio na microbiota de frangos desafiados pela coccidiose, reduzindo a presença de bactérias patogênicas como *Clostridium perfringens* e melhorando o desempenho animal (MORAES *et al.*, 2019; VIEIRA *et al.*, 2020). Outra pesquisa que utilizou esse mesmo óleo funcional e outros probióticos em suínos recém-desmamados mostrou que ambos os aditivos foram eficazes no aumento de espécies essenciais para a saúde intestinal animal, como Ruminococcaceae e Lachnospiraceae. Além disso, o óleo funcional foi capaz de reduzir a presença de bactérias patogênicas, como *Campylobacter* e *E. coli*, ao mesmo tempo em que otimiza o desempenho dos animais (VIEIRA *et al.*, 2021).

A abordagem de controle de patógenos e ARGs na criação de aves é crucial devido à possibilidade de as mesmas camas de aviário serem utilizadas por até 12 lotes de criação animal. Cada lote de criação corresponde a um ciclo de produção de aves, com duração aproximada de 40-45 dias, período em que as aves permanecem sobre essa matriz. Entre cada lote, é realizada a alcalinização das camas em escala real, com adição de 10% de calcário. Essa prática é realizada rotineiramente nas trocas de lotes de aves, considerando que as camas de aviário podem ser reutilizadas por múltiplos lotes.

Uma alternativa para controlar agentes patogênicos ou reduzir a dependência de antimicrobianos é a aplicação de bacteriófagos (HARADA *et al.*, 2018). Bacteriófagos são vírus capazes de infectar bactérias e têm sido eficazmente utilizados para o controle bacteriano. Um estudo recente demonstrou a eficácia dessa abordagem ao relatar a estabilidade e o controle da *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis através da aplicação de um bacteriófago lítico isolado de esterco suíno em camas de aviário que passaram por diferentes lotes de criação animal (ROGOVSKI *et al.*, 2021).

A suinocultura gera volumes significativos de dejetos, compostos por fezes e urina, que podem conter uma variedade de patógenos tanto animais quanto humanos, além de ser um reservatório de genes de resistência a antimicrobianos (ARGs), com potencial de contaminação do meio ambiente e dos recursos hídricos

(KUNZ; MIELE; STEINMETZ, 2009; VIANCELLI *et al.*, 2013). Para o tratamento e reaproveitamento desses dejetos, a biodigestão anaeróbia é um método amplamente adotado (GARCÍA-GONZÁLEZ; VANOTTI; SZOGI, 2016; SOUZA *et al.*, 2020; VIANCELLI *et al.*, 2013). Os biodigestores operam de forma contínua, com um tempo de retenção hidráulica de 30 a 50 dias, sendo sua eficácia influenciada pelas condições ambientais, já que esses sistemas não são aquecidos (GARCÍA-GONZÁLEZ; VANOTTI; SZOGI, 2016; KUNZ; MIELE; STEINMETZ, 2009). O material digerido resultante contém nutrientes como nitrogênio, fósforo e potássio, que podem ser utilizados como fertilizante orgânico. Em sistemas de produção em grande escala, o manejo adequado dos resíduos é essencial para evitar a disseminação de patógenos e de ARGs (SOUZA *et al.*, 2020).

A vigilância da AMR detectou genes de resistência clinicamente significativos em esterco de animais, indicando uma preferência dos ARGs por residirem em hospedeiros animais. Além disso, alguns ARGs podem evitar a compostagem ao transferirem-se para hospedeiros tolerantes ao calor ou sobreviver ao processo (QIU *et al.*, 2022), ressaltando a importância de compreender a transmissão e dispersão dos ARGs durante o tratamento dos dejetos. Assim, o esterco de animais é reconhecido como uma fonte crítica de ARGs, levando à sua acumulação no solo e na água. Portanto, vários autores enfatizaram a necessidade de determinar a AMR e a transmissão de ARGs em humanos, animais e no ambiente natural em nível regional (BENGTSSON-PALME *et al.*, 2016; YUAN *et al.*, 2022; ZHUANG *et al.*, 2021).

A produção orgânica de animais está ganhando destaque, impulsionada pela crescente preocupação com o bem-estar animal e pela redução do uso de compostos químicos em suas alimentações. Isso leva a um aumento na demanda por alimentos orgânicos por parte dos consumidores. Na criação orgânica, os animais são mantidos soltos e é proibido o uso de agrotóxicos, fertilizantes químicos sintéticos e antimicrobianos, visando promover a biodiversidade e os ciclos biológicos para garantir a sustentabilidade (AZEVEDO *et al.*, 2016). Portanto, é crucial realizar estudos para caracterizar o resistoma em amostras ambientais de criação animal, comparando os sistemas convencionais com os orgânicos, a fim de entender melhor a transmissão e os reservatórios de genes de resistência nesses ambientes.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Analisar a composição da microbiota, do resistoma e do viruloma presentes nos dejetos de aves e suínos, e investigar como diferentes práticas de produção animal podem influenciar esses padrões no oeste do Estado de Santa Catarina.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analisar o metagenoma de cama de aviário com o foco na caracterização do resistoma ao longo de 12 ciclos de produção;
2. Identificar o resistoma e analisar o metagenoma de entrada e saída de biodigestores de dejetos suínos;
3. Comparar como diferentes sistemas de produção animal influenciam nos padrões de resistoma e viruloma.

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1. COLETA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS**

##### **3.1.1. Coleta das amostras de cama de aviário**

Amostras de camas de aviário (sendo esta uma mistura de serragem, excretas de aves e 10% de calcário), foram coletadas de diferentes lotes de criação de aves de corte em granjas no Oeste do estado de Santa Catarina, Brasil, em 2019. Foram coletadas um total de 8 amostras, provenientes dos lotes 1, 2, 3, 4, 6, 9 e 12, sendo que cada lote correspondente a um ciclo de produção de aves. Adicionalmente, foi incluída uma amostra de uma granja de manejo orgânico que não realiza o uso de antimicrobianos.

A amostragem foi realizada através da coleta de 1 kg de cama de aviário em 15 pontos distribuídos randomicamente ao longo dos galpões aviários. As amostras foram fracionadas em 20 g para as análises e conservadas a 4 °C até seu processamento. As amostras de cama de aviário foram gentilmente cedidas pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gislaine Fongaro.

##### **3.1.2. Coleta das amostras de granjas de suínos**

Foram coletadas amostras provenientes de granjas de suínos cooperadas da mesma agroindústria, localizadas no oeste catarinense. As diferentes amostras de granjas de suínos trabalham com animais de corte empregando sistemas de produção granjas convencionais, em que usam antimicrobianos de modo profilático, e adicionalmente, foi coletada uma amostra proveniente de uma granja de manejo orgânico que não utiliza antimicrobianos. Amostras compostas (n=3), cada uma de 1 L, foram coletadas na entrada (afluente) e saída (efluente) dos biodigestores das granjas e para a granja de manejo orgânico foi coletado diretamente do tanque de armazenamento de dejetos brutos (esterqueira).

As amostragens foram realizadas anualmente, durante sete anos (2013–2019), e para a granja de manejo orgânico foi coletada uma amostra em

2019, totalizando quinze amostras coletadas. As amostras foram armazenadas em tubos Falcon de 50 mL e congeladas em freezers -80 °C até seu processamento. Amostras de entrada e saída dos biodigestores foram gentilmente cedidas pelas Prof<sup>as</sup>. Dr<sup>as</sup>. Gislaine Fongaro.

### 3.2. EXTRAÇÃO DE DNA E SEQUENCIAMENTO METAGENÔMICO

Para extração de DNA das amostras foi utilizado o kit DNeasy PowerSoil Pro Kit (QIAGEN, Estados Unidos) conforme recomendações do fabricante. O DNA extraído foi quantificado no aparelho de espectrofotometria NanoVue (BioChrom), e a qualidade foi verificada a partir das razões de absorbância A260/A280 para contaminação por lipídeos ou proteínas e A280/A230 para avaliar a contaminação por agentes orgânicos.

Para a preparação das bibliotecas metagenômicas foi utilizado o kit comercial ThruPLEX DNA-seq (Rubicon Genomics) seguindo as recomendações do fabricante. As bibliotecas foram sequenciadas no equipamento NovaSeq 6000 (Illumina NovaSeq Control Software 1.6.0/RTA v3.4.4) com uma configuração 2x151 *paired-end*. A conversão do resultado do sequenciamento para FastQ foi realizada usando `bcl2fastq_v2.20.0.422` do pacote de software CASAVA. A escala de qualidade utilizada foi Sanger / phred33 / Illumina 1.8+. O sequenciamento foi realizado no laboratório Science for Life (SciLifeLab), Estocolmo, Suécia, em uma parceria com o Prof. Dr. Björn Andersson.

### 3.3. ANÁLISES BIOINFORMÁTICAS

#### 3.3.1. Controle de qualidade e pré-processamento

As sequências foram processadas de acordo com o fluxograma apresentado na Figura 2. Resumidamente, as sequências geradas tiveram os adaptadores e bases de baixa qualidade trimados usando o Cutadapt (v. 2.8) (MARTIN, 2011) e o Trim Galore (v. 0.6.5-1) (<https://github.com/FelixKrueger/TrimGalore>), respectivamente. As sequências provenientes de ruídos esperados no ambiente, como em decorrência da criação e alimentação dos animais bem como do próprio

material em que as camas são confeccionadas foram removidas por mapeamento contra os genomas de referências usando Bowtie 2, com os parâmetros padrão (v. 2.4.1) (LANGMEAD; SALZBERG, 2012). Os genomas de referência utilizados foram o de *Gallus gallus domesticus* (número de acesso do GenBank: GCA\_016699485.1), *Sus scrofa* (número de acesso do Refseq: GCF\_000003025.6), das plantas: eucalipto (*Eucalyptus grandis* - GCF\_016545825.1), milho (*Zea mays* - GCF\_902167145.1), soja (*Glycine max* - GCF\_000004515.6), trigo (*Triticum aestivum* - GCF\_018294505.1) e sorgo (*Sorghum bicolor* - GCF\_000003195.3), baixados em Janeiro de 2021.

### 3.3.2. Análises baseadas em sequência

As sequências foram classificadas usando Kraken2 (v. 2.0.8-beta) (WOOD; LU; LANGMEAD, 2019), com um banco de dados construído para identificar arqueias, bactérias, vírus e fungos utilizando o banco de dados Reference sequence (RefSeq) do NCBI (O'LEARY et al., 2016) em 15/03/2021. Os ARGs foram identificados diretamente nas sequências por uma abordagem de mapeamento contra o banco de dados MEGARes (v. 2.0) (DOSTER et al., 2020) utilizando o Bowtie2, com o parâmetro *--very-sensitive*, e o resultado foi classificado utilizando o Resistome Analyser (<https://github.com/cdeanj/resistomeanalyzer>).

O cálculo da diversidade alfa foi realizado utilizando o pacote phyloseq (v. 1.36.0) (MCMURDIE; HOLMES, 2013) e a diversidade beta foi calculada utilizando o pacote vegan (v. 2.5-7) (OKSANEN et al., 2022), baseado na dissimilaridade de Bray-Curtis, após uma normalização usando o pacote DESeq2 (v. 1.32.0) (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014), a análise de clustering hierárquico foi empregada na matriz de dissimilaridade de Bray-Curtis utilizando o método de agrupamento Ward, as figuras foram plotadas usando o pacote ggplot2 (v. 3.3.5) (WICKHAM, 2016) do programa R (v. 4.1.2) (<https://www.R-project.org/>). Os índices de diversidade alfa e as distâncias de Bray-Curtis foram testados comparando as amostras de entrada com as de saída dos biodigestores usando o teste de Wilcoxon corrigido pelo FDR (False Discovery Rate). A matriz de distância de diversidade beta foi comparada usando o teste de Adonis. As estatísticas foram realizadas utilizando o pacote vegan

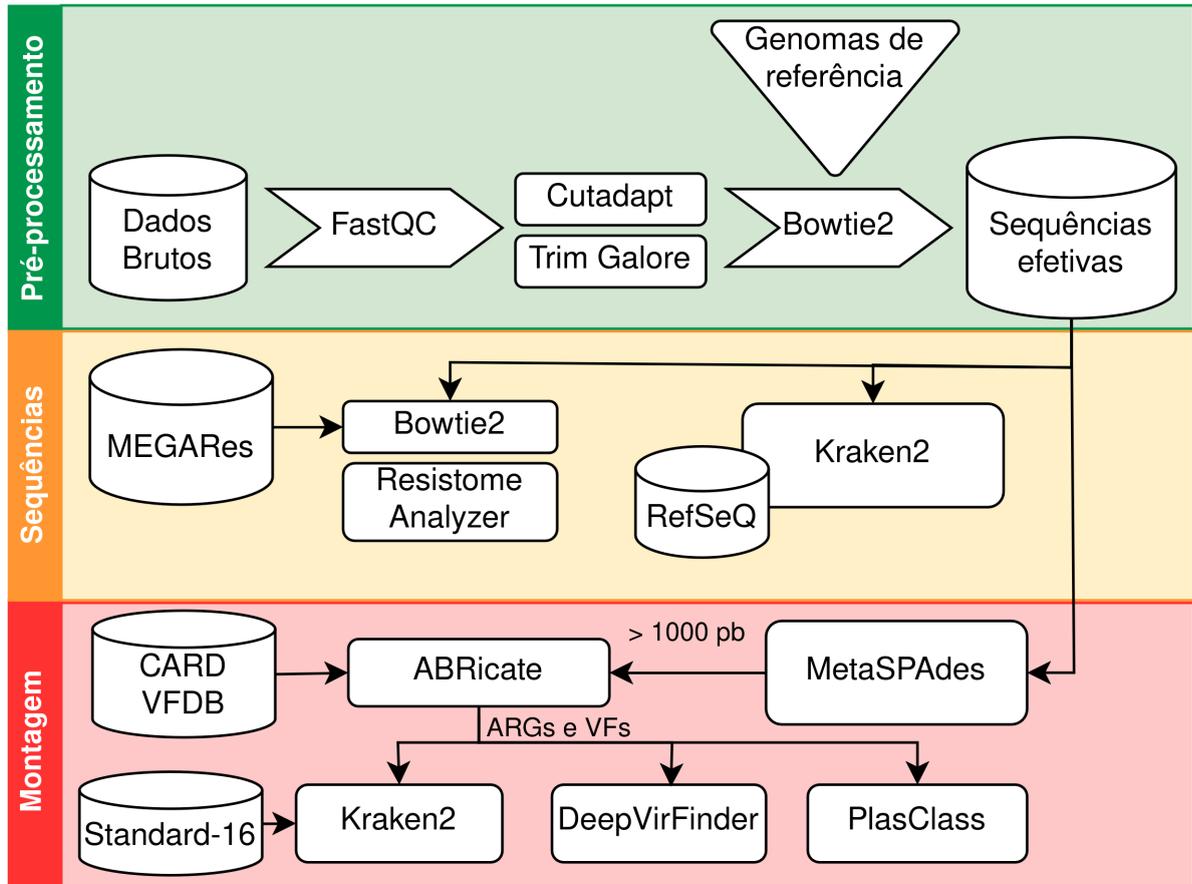
no R. As espécies diferencialmente abundantes foram calculadas utilizando o pacote DESeq2.

### **3.3.3. Análises baseadas na montagem**

A montagem foi realizada utilizando o MetaSPAdes (v. 3.14.1) (NURK et al., 2017). Contigs menores que 1000 bases foram excluídos. A identificação de ARGs e VFs foi realizada com o programa ABRicate (SEEMANN, 2024), com corte de identidade de pelo menos 80%, buscando genes previamente anotados nas bases de dados CARD (ALCOCK et al., 2020) e VFDB (CHEN et al., 2016). Contigs pertencentes a ARGs e VFs foram submetidos a uma classificação taxonômica usando o Kraken 2 (v. 2.0.8-beta) (WOOD; LU; LANGMEAD, 2019) contra o banco de dados Standard-16. Este banco de dados inclui sequências do RefSeq de arqueias, bactérias, vírus, plasmídeos, sequências humanas e UniVec\_Core, atualizado até 12 de janeiro de 2024 (<https://benlangmead.github.io/aws-indexes/k2>).

A presença de plasmídeos nas amostras foi detectada usando o PlasClass (PELLOW; MIZRAHI; SHAMIR, 2020), e o DeepVirFinder (REN et al., 2020) foi utilizado para a detecção de sequências de fagos, ambos com parâmetros padrão. As Figuras foram confeccionadas utilizando os pacotes tidyverse (v. 1.3.1) (WICKHAM et al., 2019), patchwork (v. 1.1.1) (PEDERSEN, 2020), ggplot2 (v. 3.3.5) (WICKHAM, 2016), e pheatmap (v. 1.0.12) (KOLDE, 2019) do programa R (v. 4.1.2) (<https://www.R-project.org/>).

Figura 2 – Fluxograma das análises de bioinformáticas.



Fonte: elaborado pela autora.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. METAGENÔMICA DE AMOSTRAS DE CAMA DE AVIÁRIO

#### 4.1.1. Sequenciamento e pré-processamento das amostras

O sequenciamento Illumina NovaSeq 6000 gerou mais de 30 GB de dados, com uma média de ~56 milhões de sequências por amostra. Na etapa de controle de qualidade foram removidos em média 1,41% das sequências. Aproximadamente 0,57% das sequências mapearam em genomas que poderiam estar no ambiente, como resultado da criação das aves, das plantas utilizadas na alimentação das mesmas e do material em que é confeccionada as camas. Resultando em uma média de ~55 milhões de sequências que foram para as análises subsequentes (sequências efetivas). Os resultados de sequenciamento estão resumidos na Tabela 1.

Tabela 1 – Pré-processamento das amostras de camas de aviário.

Amostras	Total	Controle qualidade <sup>1</sup>	Aves <sup>2</sup>	Plantas <sup>3</sup>	Sequências efetivas <sup>4</sup>	Efetivo (%)
Cama 01	51.436.388	49.927.386	211.059	33.941	49.682.386	96,59
Cama 02	30.537.136	30.094.604	658.779	34.907	29.400.918	96,28
Cama 03	64.295.674	63.498.526	106.620	33.961	63.357.945	98,54
Cama 04	49.992.834	49.441.764	153.920	39.288	49.248.556	98,51
Cama 06	75.289.826	74.390.658	40.580	16.242	74.333.836	98,73
Cama 09	64.517.792	63.829.226	24.622	10.069	63.794.535	98,88
Cama 12	64.051.202	63.308.786	34.536	9.017	63.265.233	98,77
Cama orgânica	50.373.122	49.815.880	56.810	443.230	49.315.840	97,90
<b>Média</b>	56.311.747	55.538.354	160.866	77.582	55.299.906	
<b>Desvio padrão</b>	13.703.204	13.610.261	211.540	148.235	13.823.219	

Fonte: elaborado pela autora.

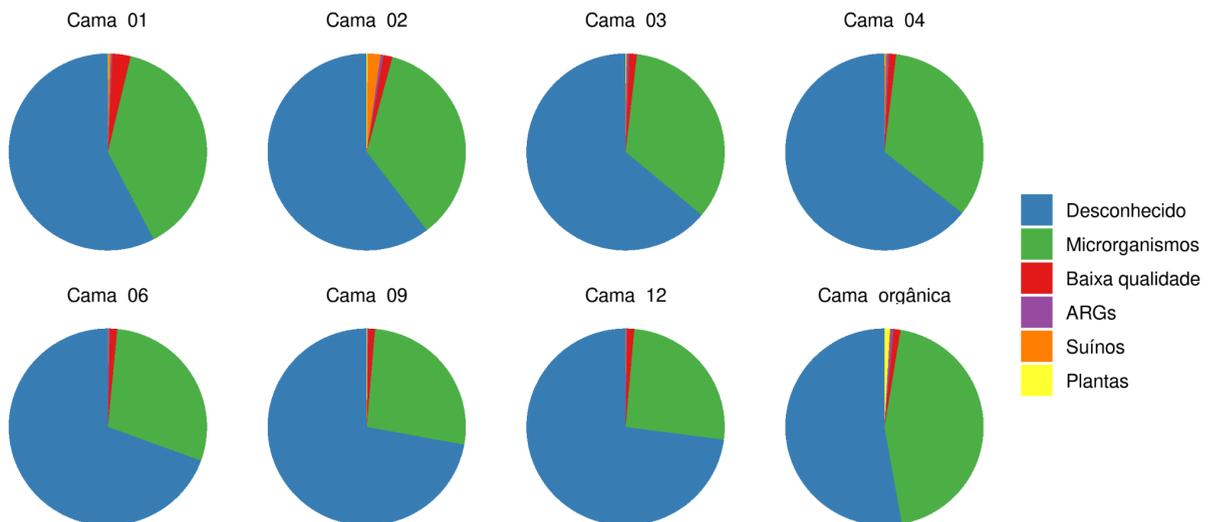
Legenda: Os números de 01 a 12 correspondem ao número de lotes de animais que passaram pela respectiva cama, e a criação orgânica é uma amostra proveniente de uma granja que não utiliza antimicrobianos. <sup>1</sup>Sequências após remoção dos adaptadores e de bases com baixa qualidade.

<sup>2</sup>Sequências mapeados no genoma de *Gallus gallus domesticus* (número de acesso do GenBank:

GCA\_016699485.1). <sup>3</sup>Sequências mapeados nos genomas das plantas: eucalipto (*Eucalyptus grandis* - GCF\_016545825.1), milho (*Zea mays* - GCF\_902167145.1), soja (*Glycine max* - GCF\_000004515.6), trigo (*Triticum aestivum* - GCF\_018294505.1) e sorgo (*Sorghum bicolor* - GCF\_000003195.3). <sup>4</sup>Sequências efetivas são as que restaram após as etapas de pré-processamento (após exclusão das sequências com baixa qualidade e remoção das sequências que mapearam com o genoma das aves e plantas).

Na Figura 3, observamos que apesar das diferentes estratégias para identificação das sequências presentes nas amostras, muitas ainda são desconhecidas, aumentando de forma gradual da passagem 1 (cama 1) para 12 passagens de animais (cama 12) (~57-73%), e a amostra oriunda da cama de criação em sistema orgânico apresentou ~53%.

Figura 3 – Composição das amostras de camas de aviário.



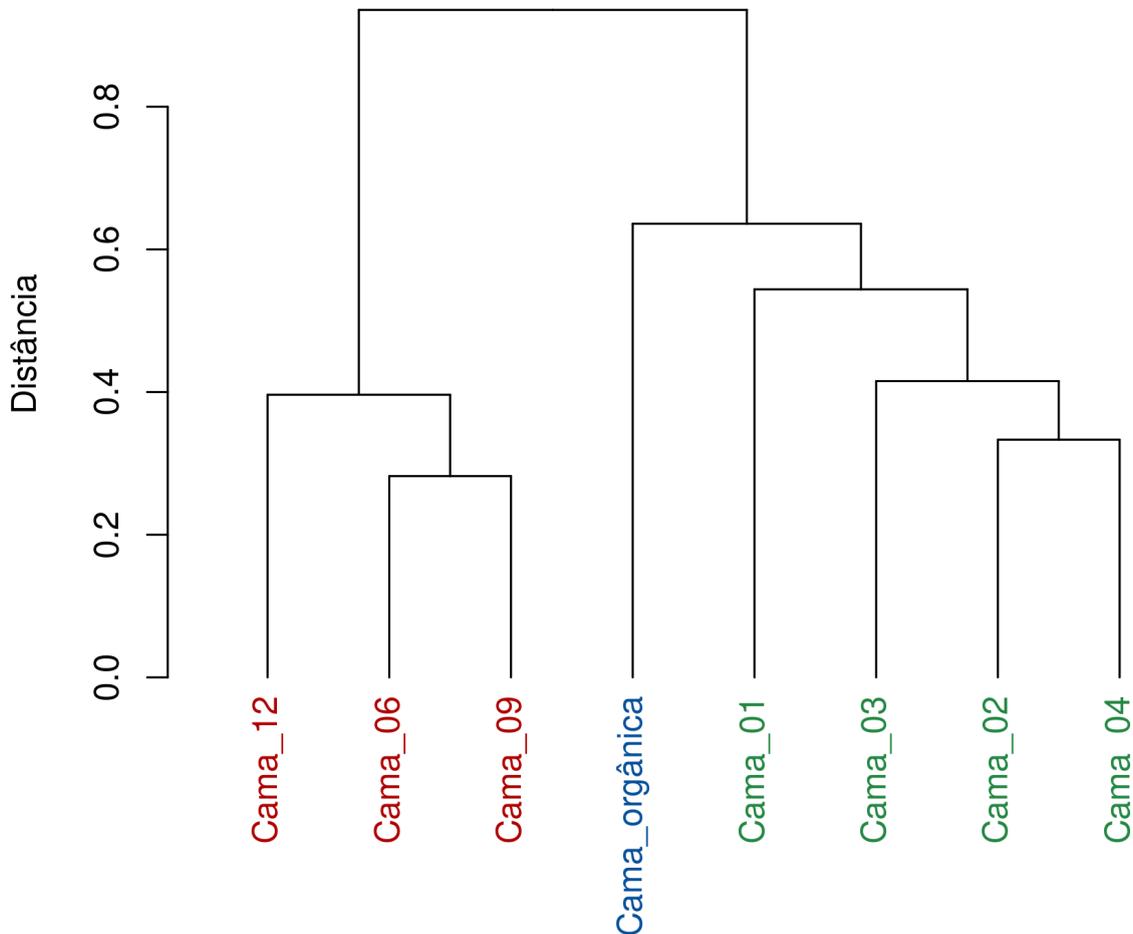
Fonte: elaborado pela autora.

Legenda: Os números de 01 a 12 correspondem ao número de lotes de animais que passaram pela respectiva cama, e a criação orgânica é uma amostra proveniente de uma granja que não utiliza antimicrobianos.

#### 4.1.2. Diversidade microbiana

Para compreender a dinâmica das sucessivas passagens de lotes de animais nas camas, agrupamos as amostras em duas categorias: de 1 a 4 passagens (n=4) e de 6 a 12 (n=3), denominadas como Cama\_1-4 e Cama\_6-12, respectivamente, esse agrupamento foi realizado baseado no clustering hierárquico (Figura 4).

Figura 4 – Dendrograma resultante do agrupamento das amostras utilizando clustering hierárquico.



Fonte: elaborado pela autora.

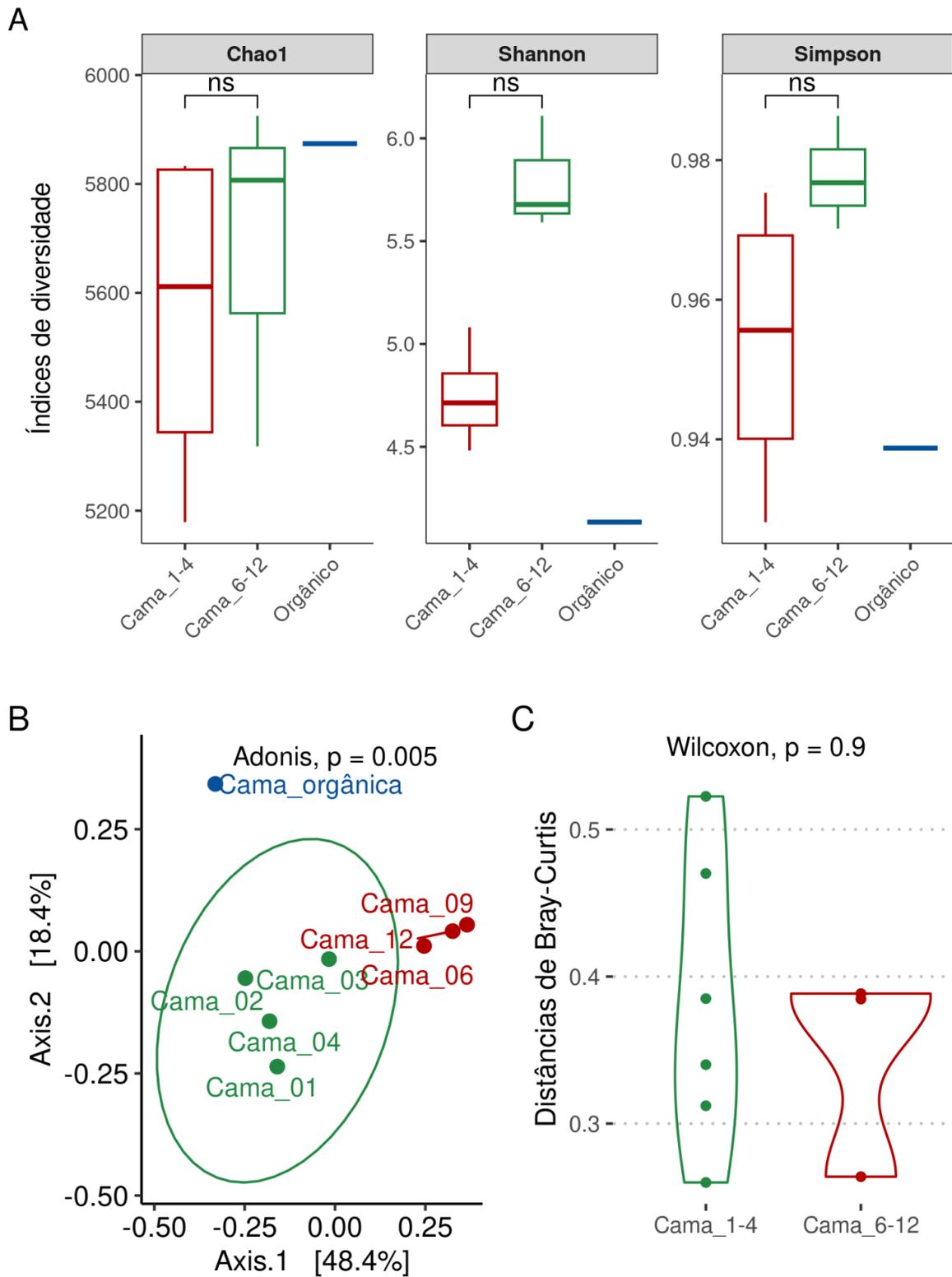
Legenda: O dendrograma foi dividido em 3 grupos, sendo que no grupo verde ficou as amostras Cama\_1-4, no vermelho as amostras Cama\_6-12 e no azul a amostra orgânica. Os números de 01 a 12 correspondem ao número de lotes de animais que passaram pela respectiva cama, e a criação orgânica é uma amostra proveniente de uma granja que não utiliza antimicrobianos.

Foram calculados os valores de alfa e beta diversidade conforme ilustrado na Figura 5. Na Figura 5A, foram observados três índices de diversidade alfa. Embora as diferenças observadas entre os índices não tenham sido estatisticamente significantes, apresentaram uma tendência que é discutida a seguir. O índice Chao1 avalia a riqueza de espécies presentes nas amostras, enquanto o índice de Shannon tem como base o conceito de incerteza, quanto maior a diversidade, maior a incerteza associada à probabilidade de selecionar um organismo específico ao amostrar aleatoriamente uma determinada amostra. Em amostras com um índice de Shannon baixo, a probabilidade de acertar os organismos presentes é maior. Por sua vez, o índice de Simpson sugere que uma comunidade de espécies mais

diversificadas apresentará uma menor dominância. Notamos que a mediana do grupo Cama\_1-4 é inferior ao grupo Cama\_6-12 para os três índices calculados, indicando uma menor diversidade nessas amostras.

Na Figura 5B, observamos a diversidade beta por meio de um gráfico de PCoA, que reduz a matriz de distância de Bray-Curtis em duas dimensões. A diferença encontrada nesta análise foi significativa (teste Adonis,  $p = 0,005$ ), indicando uma distinção entre as espécies encontradas nos grupos Cama\_1-4 e Cama\_6-12. Na Figura 5C, são apresentadas as distâncias de Bray-Curtis em cada grupo de amostras, complementando as observações do PCoA. Embora a diferença não seja estatisticamente significativa, há uma tendência em que o grupo de amostras Cama\_6-12 apresenta maior similaridade entre si do que o grupo Cama\_1-4. Vale ressaltar que as distâncias de Bray-Curtis variam entre 0 e 1, representando respectivamente uma alta similaridade e uma completa dissimilaridade entre as amostras. As distâncias exibidas na Figura 5C foram calculadas a partir da mesma matriz de distâncias utilizada na Figura 5B, proporcionando uma análise consistente e comparativa entre os grupos de amostras.

Figura 5 – Diversidade nas amostras de camas de aviário baseada na diversidade de espécies encontradas.



Fonte: elaborado pela autora.

Legenda: (A) Alfa diversidade com os índices de Alpha (Riqueza), Shannon e Simpson. (B) Gráfico de PCoA utilizando a distância de Bray-Curtis e (C) diferenças nas distâncias de Bray-Curtis entre as

amostras. Os números de 01 a 12 correspondem ao número de lotes de animais que passaram pela respectiva cama, e a criação orgânica é uma amostra proveniente de uma granja que não utiliza antimicrobianos. ns – não significativo.

#### 4.1.3. Composição taxonômica

A classificação taxonômica dos dados metagenômicos utilizando uma abordagem baseada nas sequências mostrou que a maioria dos microrganismos nas amostras eram bactérias variando de 94,6% a 99,7% das sequências classificadas como microrganismos. Eukaryota, Viruses e Archaea representaram uma média de 0,78%, 0,30% e 0,10% dos microbiomas das camas, respectivamente (Figura 6A). A abundância de Viruses foi maior na cama com 2 passagens de lotes (0,94%), enquanto a Eukaryota foi na amostra de passagem de 1 lote de aves (4,91%).

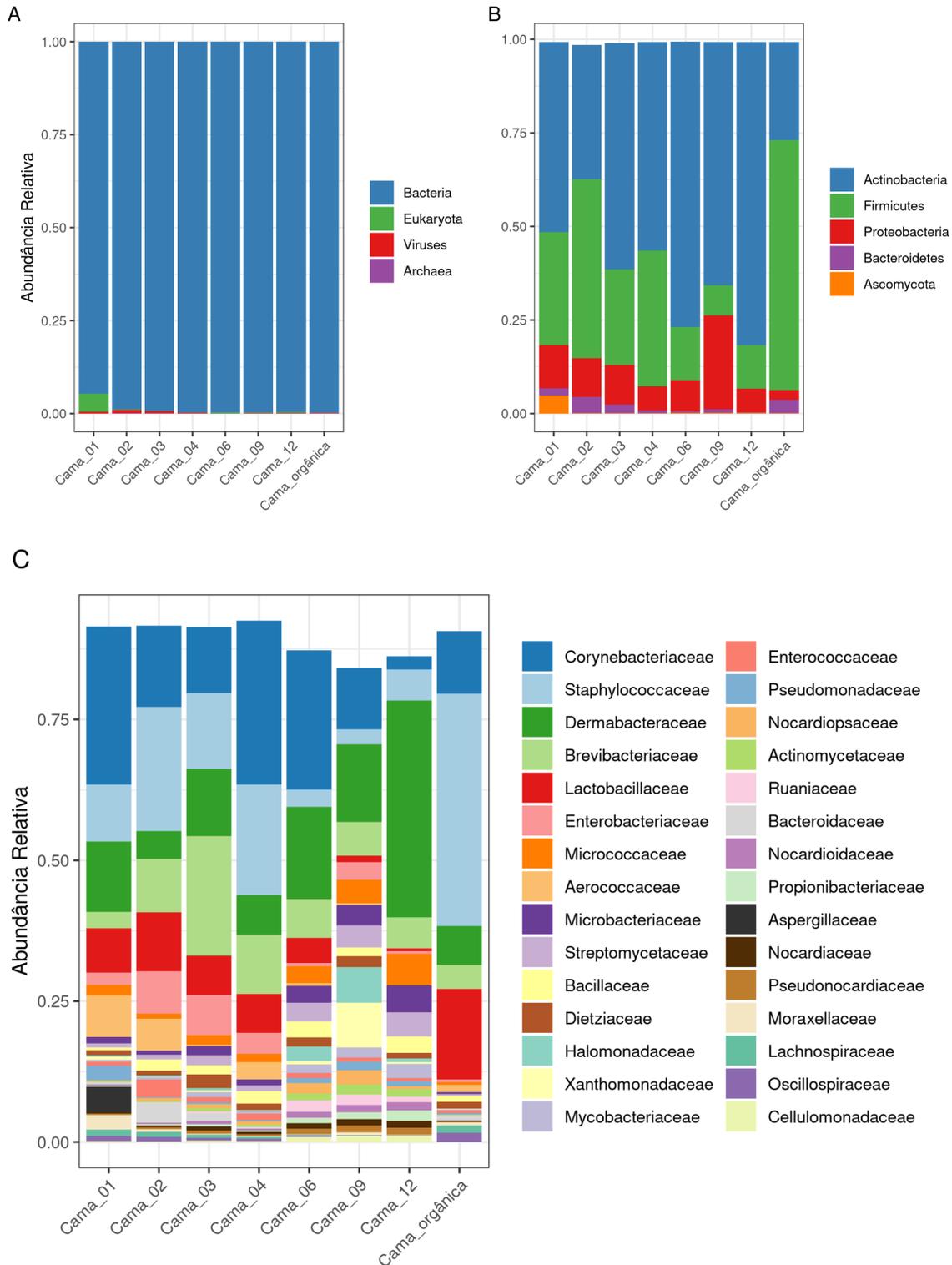
Na Figura 6B, observamos que o Filo predominante nas camas é Actinobacteria com uma média de 56,44% das sequências, seguido pelo Firmicutes (30,06%) e Proteobacteria (10,13%). Na amostra de criação orgânica há um predomínio de Firmicutes (66,74%), seguida por Actinobacteria (26,23%). Observamos na Figura 6C que as famílias encontradas na amostra de criação orgânica têm um perfil parecido com o encontrado nas camas de criação convencional, onde há predomínio principal de quatro famílias (Staphylococcaceae, Lactobacillaceae, Corynebacteriaceae e Dermabacteraceae). Alguns gêneros de bactérias potencialmente patogênicas foram encontrados, como *Eschechiria*, *Staphylococcus* e *Enterococcus* (Figura 7).

Resultados similares foram encontrados por Gupta et al. (2021) investigando os efeitos da administração do antimicrobiano promotor de crescimento (bacitracina) e terapêutico (enrofloxacina) nas aves, eles encontraram as famílias Corynebacteriaceae, Dermabacteraceae, Lactobacillaceae, e Staphylococcaceae como as mais abundantes nas camas de aviário. Outros trabalhos que se utilizaram da técnica de sequenciamento de genes 16S rRNA também encontraram um perfil parecido de microbiota nas camas de aviário (BINDARI et al., 2021; VALERIS-CHACIN et al., 2021), com exceção do Bucher et al. (2020) em que as famílias mais abundantes foram Bacillaceae e Nocardiodaceae que analisou camas de aviário em reuso, essas famílias são encontradas em nossas amostras, porém não são as mais abundantes.

Os microrganismos do Domínio Eukaria encontrados na cama de aviário com uma passagem de animais (Cama 01) é pertencente à família Aspergillaceae (Figura 6C), sendo que a maioria das sequências foi atribuída ao gênero *Aspergillus* (Figura 7) e à espécie *Aspergillus glaucus* (Figura 8). Esta espécie é um fungo filamentoso conhecido por ter uma ampla distribuição ambiental devido à sua resistência fisiológica em condições mais extremas (CAI et al., 2012; HUBKA et al., 2013). Como muitos outros fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus*, podem ser patogênicos, mas têm várias aplicações potenciais úteis na medicina e na produção de alimentos (CAI et al., 2012).

Quanto à cama orgânica, os gêneros mais abundantes na amostra foram *Staphylococcus*, *Lactobacillus* e *Mammaliicoccus*. *Mammaliicoccus*, pertencente à família Staphylococcaceae, destaca-se como um potencial membro na transmissão de ARGs entre os organismos dessa família (ALEXYUK et al., 2023; LIENEN et al., 2022). A espécie *Mammaliicoccus lentus* foi identificada colonizando a pele e ambientes de diversas espécies de animais de fazenda, como aves, cavalos e gado leiteiro (ALEXYUK et al., 2023; HUBER et al., 2011; LIENEN et al., 2022; ZHANG; AGIDI; LEJEUNE, 2009). Estudos indicam que os membros do gênero *Mammaliicoccus* atuam como reservatórios de ARGs e VFs, além de representarem potenciais fontes de HGT (LIENEN et al., 2022; SARAIVA et al., 2021).

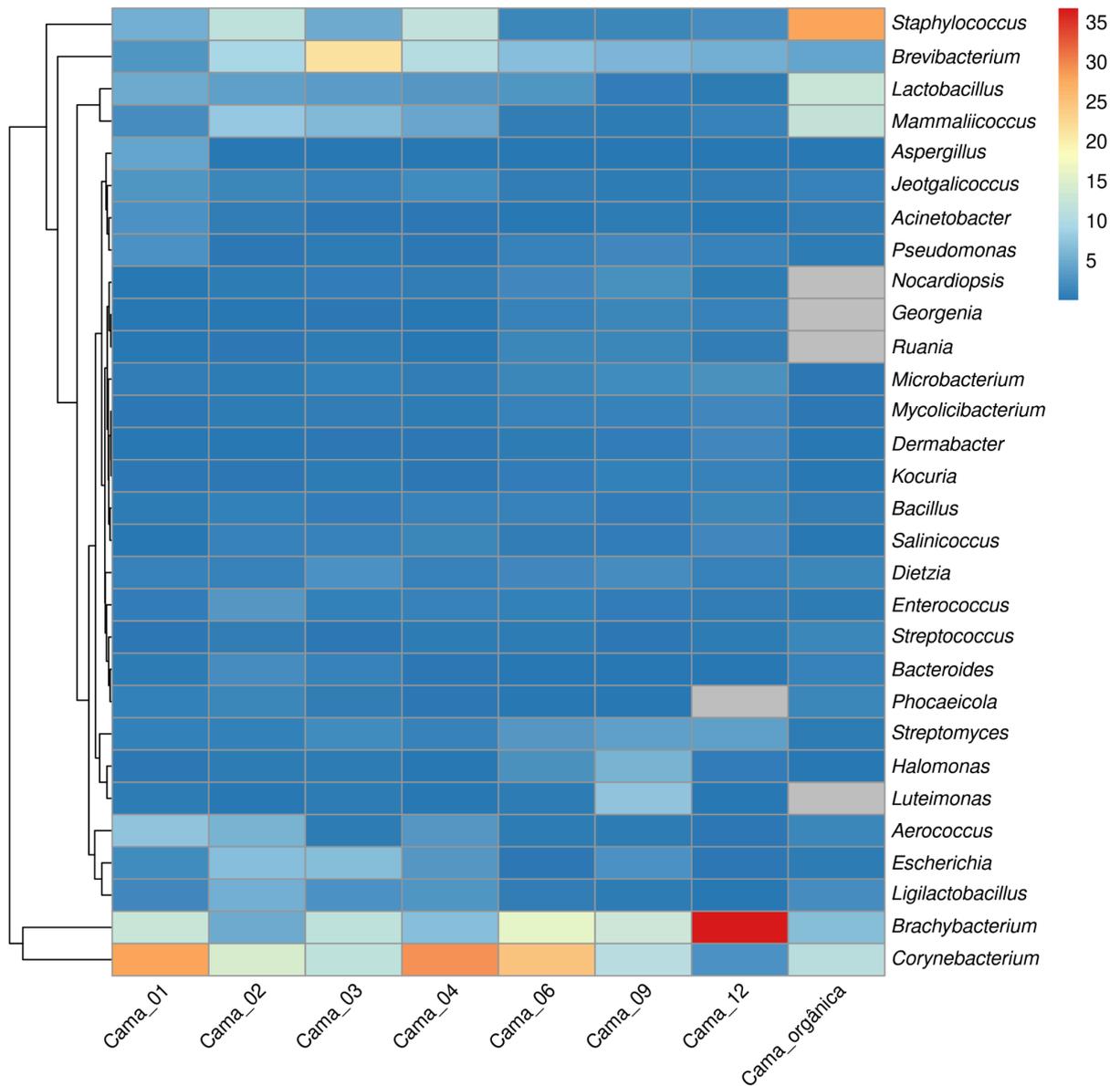
Figura 6 – Taxonomia ao nível de (A) domínio, (B) Filo e (C) família encontradas nas camas de aviário.



Fonte: elaborado pela autora.

Legenda: Apresentados os taxa com mais de 1% de abundância. Os números de 01 a 12 correspondem ao número de lotes de animais que passaram pela respectiva cama, e a criação orgânica é uma amostra proveniente de uma granja que não utiliza antimicrobianos.

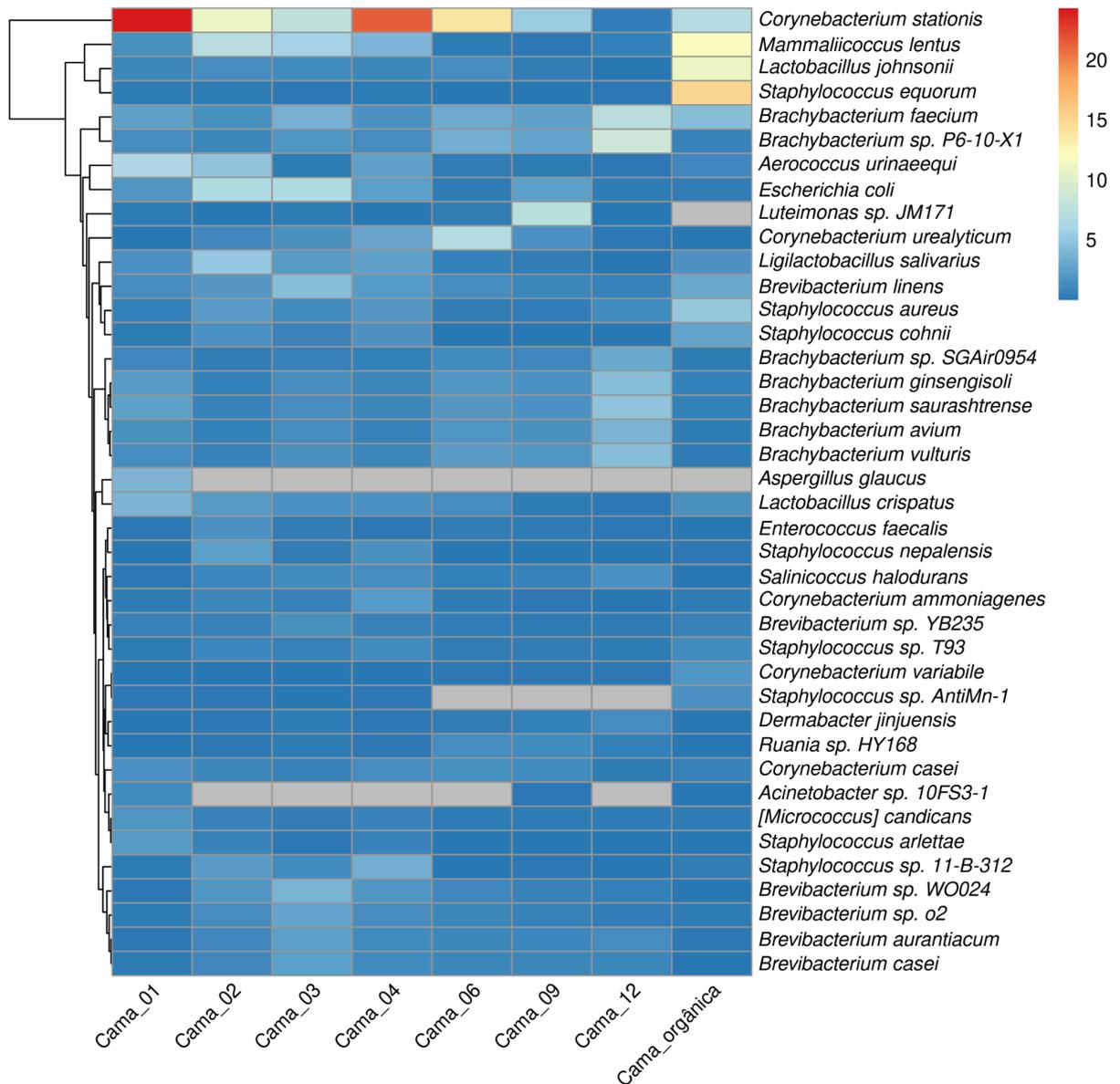
Figura 7 – Os 28 gêneros mais abundantes encontrados nas camas de aviário.



Fonte: elaborado pela autora.

Legenda: Os números de 01 a 12 correspondem ao número de lotes de animais que passaram pela respectiva cama, e a criação orgânica é uma amostra proveniente de uma granja que não utiliza antimicrobianos.

Figura 8 – As 40 espécies mais abundantes encontradas nas camas de aviário.



Fonte: elaborado pela autora.

Legenda: Os números de 01 a 12 correspondem ao número de lotes de animais que passaram pela respectiva cama, e a criação orgânica é uma amostra proveniente de uma granja que não utiliza antimicrobianos.

#### 4.1.4. Caracterização do resistoma

Utilizando uma abordagem baseada nas sequências efetivas e comparando com o banco de dados do MEGARes identificamos um total de 332 genes que conferem resistência microbiana, pertencentes a 40 classes de antimicrobianos nas camas de aviário. Na Figura 9 são apresentadas as classes de antimicrobianos mais abundantes. Os valores de abundância são apresentados em abundância relativa,

ou seja, a porcentagem do total e o número de sequências encontradas. Observamos que determinantes de ARGs mais abundantes foram relacionados às classes MLS (macrolídeos, lincosamidas e estreptogramina), Aminoglicosídeos, Oxazolidinona, Tetraciclinas e Sulfonamidas.

As tetraciclinas são usadas como agentes clínicos desde a década de 40. Com alta eficácia sobre as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas têm sido muito utilizadas tanto na clínica humana quanto animal, especialmente como indutor do crescimento de suínos e aves (ANGELAKIS, 2017; OTSUKA, 2020). Além disso, estudos apontam que a maioria dos genes de resistência às tetraciclinas encontram-se em MGEs, facilitando sua disseminação entre bactérias (BERGLUND et al., 2020; HE et al., 2019; POIREL et al., 2018; SUN et al., 2019). Estudos apontam os microrganismos ambientais como reservatório dos genes de resistência às tetraciclinas, bem como por ser a principal origem da resistência a essa classe (BERGLUND et al., 2020). O alto uso e a presença ubíqua em diferentes ambientes têm levado ao aumento da AMR em bactérias entéricas, como *Aeromonas*, *Enterobacter*, *Salmonella* e espécies de *Klebsiella* (ZHUANG et al., 2021). Além disso, bactérias Gram-positivas como *Streptomyces aureofaciens* contribuem para a produção de tetraciclinas, frequentemente usadas como probióticos em animais, especialmente como indutoras do crescimento de suínos e frangos de corte (ANGELAKIS, 2017; OTSUKA, 2020).

O amplo uso de aminoglicosídeos na medicina veterinária, frequentemente empregados para prevenir e tratar infecções respiratórias e entéricas causadas por bactérias Gram-negativas (VAN DUIJKEREN et al., 2019), contribui para a disseminação de genes de resistência em ambientes diversos (KHOSRAVI; JENABI; MONTAZERI, 2017; NAYME et al., 2019), esses genes foram encontrados em todas as amostras de camas de aviário. Estudos relatam a presença de genes de resistência aos aminoglicosídeos em grande abundância em isolados clínicos e ambientais (KHOSRAVI; JENABI; MONTAZERI, 2017; NAYME et al., 2019). Além disso, podem estar frequentemente associados a outros genes como *ESBLs* (Beta-lactamases de Espectro Estendido) ou que conferem resistência a fluoroquinolonas (KRAUSE et al., 2016). Esses antimicrobianos, eficazes contra várias bactérias gram-negativas, são agentes cruciais no combate a infecções

bacterianas, incluindo aquelas causadas por *E. coli*, *Salmonella*, e *Pseudomonas aeruginosa* (VAN DUIJKEREN et al., 2019).

Os microrganismos com fenótipo MLS, ou seja, microrganismos que apresentam resistência aos macrolídeos, lincosamida e estreptogramina, são associados à família gênica *erm*, essa família gênica está presente em todas as amostras de cama de aviário. Fessler et al. (2018) estudando mobiloma de espécies de *Staphylococcus* mostram a forte ligação desses genes com os MGEs como plasmídeos e transposons.

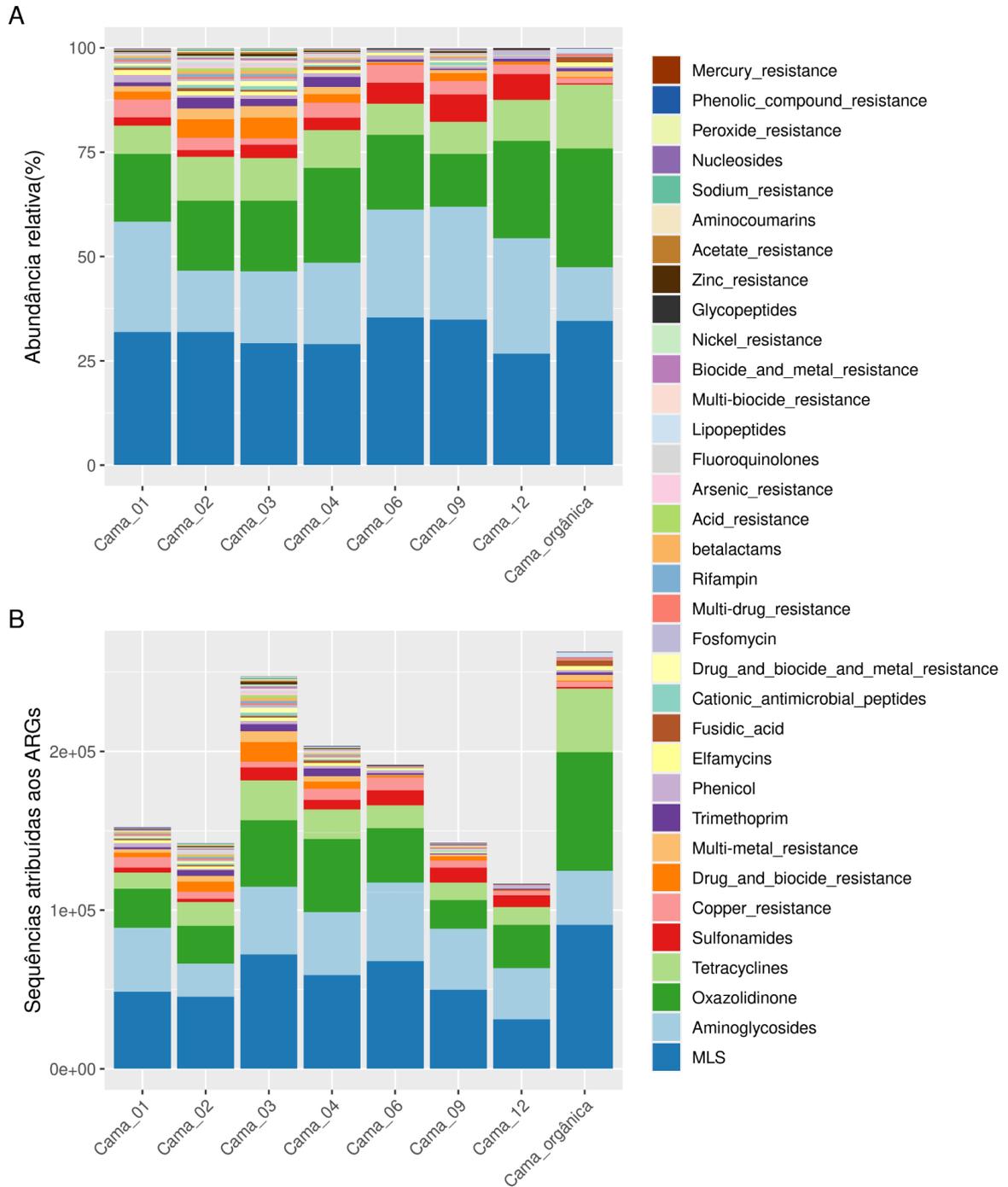
Na Figura 10, são apresentados os 30 genes mais abundantes, juntamente com seus mecanismos de ação, conforme a classe. Observa-se a predominância de 4 genes: *ermC* e *MLS23S*, que conferem resistência à classe MLS; *A16S*, à classe aminoglicosídeos; e *O23S*, à classe Oxazolidinona (Figura 10). O gene *ermC*, juntamente com a família *erm*, são os principais responsáveis pela resistência de MLS em MRSA. Um estudo encontrou o gene *ermC* em pequenos plasmídeos transmissíveis em todas as linhagens de MRSA resistentes à clindamicina estudadas (WANG et al., 2021). Além disso, o gene *ermC* foi o mais comum entre os isolados de *Staphylococcus aureus* com resistência induzível à clindamicina (GHANBARI et al., 2016). Outro estudo demonstrou que cepas de *S. aureus* resistentes isoladas de aves podem ser transmitidas para isolados clínicos, e que o gene *ermC*, localizado em plasmídeos, foi transferido por meio de transformação (KHAN et al., 2000).

Na Figura 11, os dados mostram as diversidades alfa e beta calculadas com base nos ARGs encontrados nas amostras de camas de aviário. Na Figura 11A, não foram observadas diferenças significativas nos três índices de diversidade alfa. No entanto, notou-se que, para os três índices de diversidade alfa calculados, o grupo Cama\_1-4 exibiu uma maior diversidade de ARGs em comparação com o grupo Cama\_6-12. Uma diferença significativa foi encontrada no índice de diversidade beta, conforme testado na matriz de distâncias de Bray-Curtis utilizando o teste de Adonis ( $p = 0,024$ ) (Figura 11B). Além disso, na Figura 11C, foi observado que as amostras do grupo Cama\_6-12 são mais similares entre si do que as amostras de Cama\_1-4.

Os resultados para as amostras de camas de aviário indicam uma tendência interessante, conforme aumenta a passagem de lotes de animais, há uma tendência

de aumento na diversidade microbiana, como evidenciado pelos índices de diversidade alfa e beta. Essa maior diversidade pode ser atribuída à introdução de diferentes populações microbianas ao longo do tempo, resultando em um ambiente mais rico em espécies. Esse incremento na diversidade pode ser atribuído à introdução de distintas populações microbianas com o reuso das camas, como pelas próprias aves, pela alimentação, pelo ambiente circundante e até mesmo pelos funcionários da granja. Por outro lado, há uma diminuição na presença de ARGs à medida que os lotes de animais passam. Essa tendência pode ser explicada pela possível competição entre os microrganismos presentes, levando a uma redução na prevalência de ARGs. Outra explicação possível é que as práticas de manejo aplicadas estão sendo adequadas, como a limpeza e desinfecção das instalações e camas entre lotes de animais, contribuindo para a diminuição da carga microbiana portadora de ARGs. Esses resultados destacam uma dinâmica complexa entre a diversidade microbiana e a resistência antimicrobiana nas camas de aviário. Além disso, é importante observar que, apesar do índice de diversidade beta ser significativo e mostrar que há diferenças entre os dois grupos, os índices de diversidade alfa não foram estatisticamente significantes, e o tamanho reduzido de amostras em cada grupo reforça a necessidade de estudos com uma abordagem mais ampla, envolvendo mais amostras e granjas, para confirmar se essa tendência se mantém consistentemente.

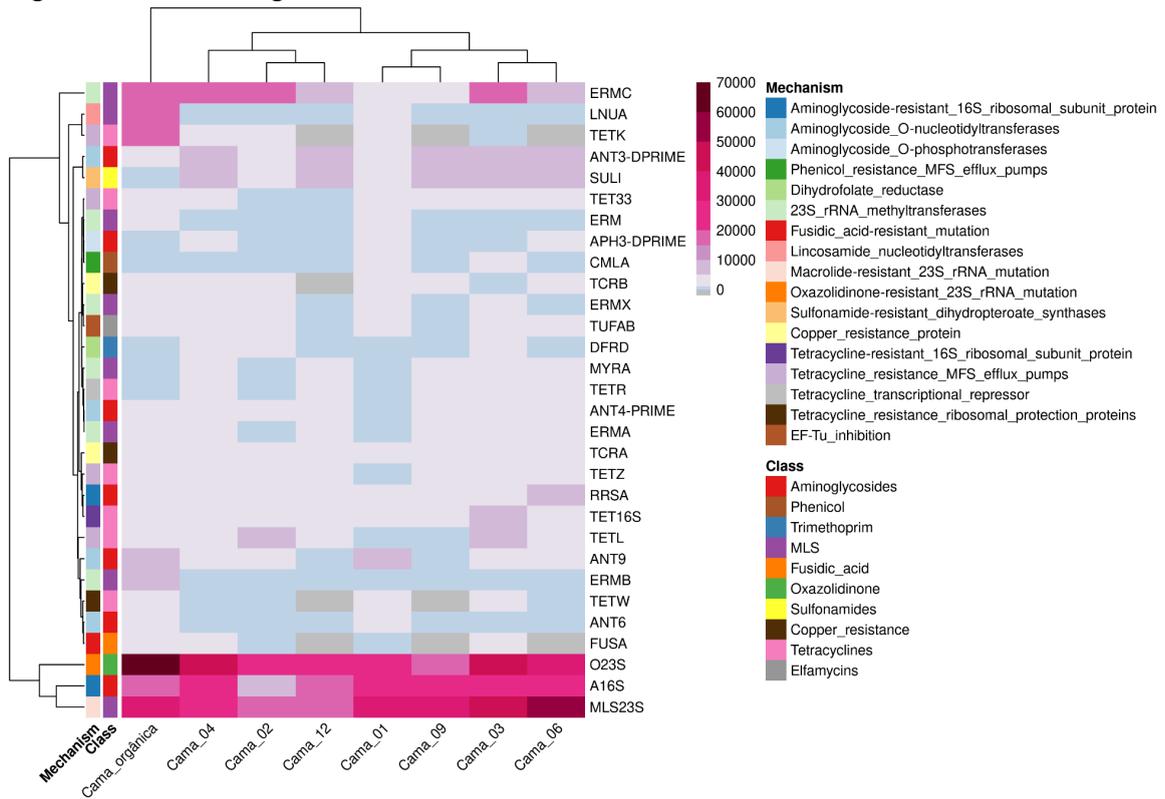
Figura 9 – Classes de antimicrobianos para os quais foram identificados ARGs nas amostras de camas de aviário.



Fonte: elaborado pela autora.

Legenda: Foi utilizado o banco de dados do MEGARes e uma abordagem baseada nas sequências. (A) Abundância relativa dos ARGs. (B) Número de sequências atribuídas àqueles ARGs. Os números de 01 a 12 correspondem ao número de lotes de animais que passaram pela respectiva cama, e a criação orgânica é uma amostra proveniente de uma granja que não utiliza antimicrobianos.

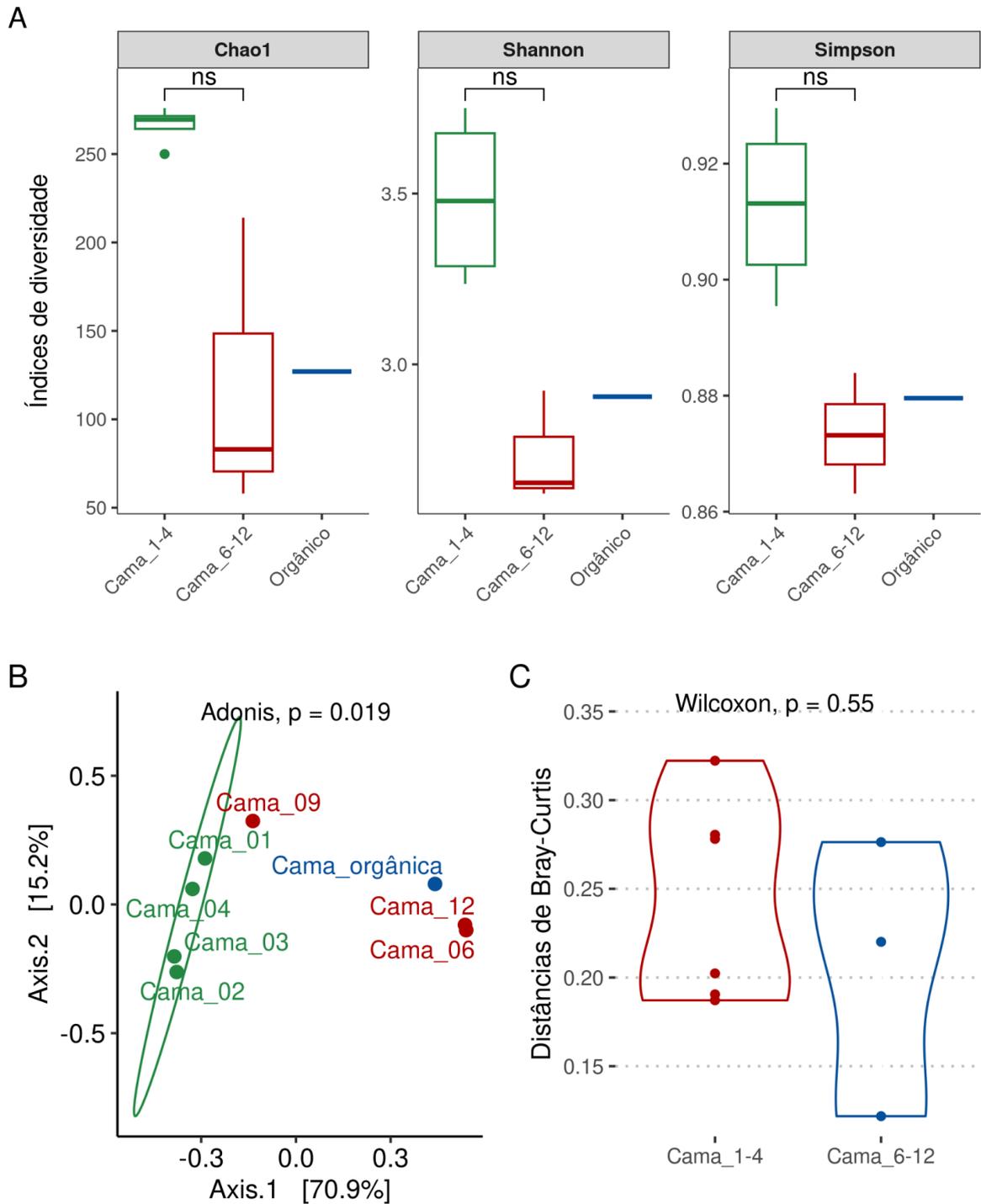
Figura 10 – Os 30 genes de resistência aos antimicrobianos mais abundantes.



Fonte: elaborado pela autora.

Legenda: São apresentadas as classes e mecanismos de ações correspondentes aos genes encontrados nas amostras de camas de aviário utilizando o banco de dados do MEGARes e uma abordagem baseada nas sequências. Os números de 01 a 12 correspondem ao número de lotes de animais que passaram pela respectiva cama, e a criação orgânica é uma amostra proveniente de uma granja que não utiliza antimicrobianos.

Figura 11 – Diversidade nas amostras de camas de aviário baseada nos genes de resistência antimicrobiana (ARGs) encontrados.



Fonte: elaborado pela autora.

Legenda: (A) Alfa diversidade com os índices de Alpha (Riqueza), Shannon e Simpson. (B) Gráfico PCoA utilizando a distância de Bray-Curtis e (C) diferenças nas distâncias de Bray-Curtis entre as amostras. Os números de 01 a 12 correspondem ao número de lotes de animais que passaram pela respectiva cama, e a criação orgânica é uma amostra proveniente de uma granja que não utiliza antimicrobianos. ns = não significativo.

## 4.2. METAGENÔMICA DE AMOSTRAS DE ENTRADA E SAÍDA DE BIODIGESTORES SUINÍCOLAS

### 4.2.1. Sequenciamento e pré-processamento das amostras

Aproximadamente 70 GB de dados foram gerados pelo sequenciamento Illumina NovaSeq 6000, com uma média de 61 milhões de sequências por amostra. Um pouco mais de 2% das sequências foram removidas na etapa de controle de qualidade por estarem com baixa qualidade. Aproximadamente 0,17% das sequências mapearam em genomas que poderiam estar no ambiente, como resultado da criação de suínos e da alimentação dos mesmos. Resultando em uma média de ~60 milhões de sequências que foram para as análises subsequentes, o que foi chamado sequências efetivas (Tabela 4).

Observamos na tabela 2 que as amostras E15, S15 e E17 apresentaram profundidade de sequenciamento baixo (< 30 milhões de sequências), em comparação com as demais amostras. Houve uma dificuldade na extração de DNA das amostras de dejetos de suinocultura, essas amostras são ricas em compostos orgânicos o que ocasionou uma contaminação e apresentou a proporção A280/A230 ruim, com baixa concentração de DNA.

Observamos na Figura 12 que apesar das diferentes estratégias para identificação das sequências presentes nas amostras muitas ainda são desconhecidas, variando de 35,4% na entrada do biodigestor em 2019 (E19) até 95,3% na entrada de 2015 (E15). Observamos que as amostras com menor sequências atribuídas aos microrganismos são as mesmas três que tiveram uma menor profundidade de sequenciamento (E15 com 3,47%, S15 com 6,88% e E17 com 4,92%), o que pode acarretar um viés nas análises subsequentes. Assim, as amostras de 2015 e 2017 foram excluídas das análises estatísticas, e apresentadas a título de caracterização qualitativa.

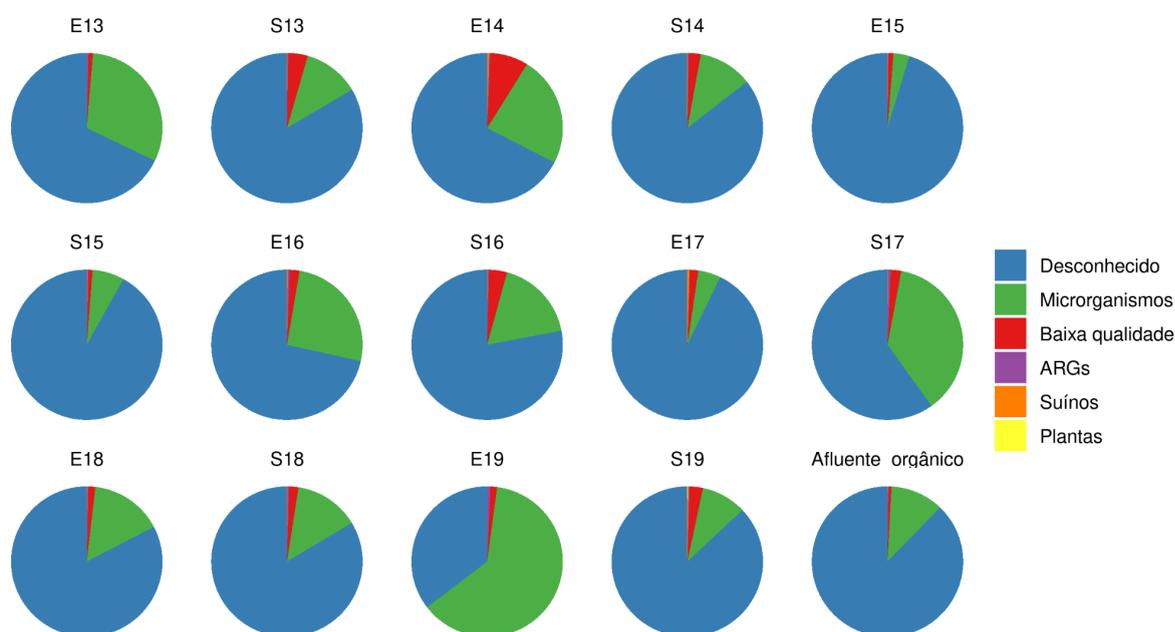
Tabela 2 – Pré-processamento das amostras de entrada (E) e saída (S) dos biodigestores de dejetos de suinocultura.

Amostras	Total	Controle qualidade <sup>1</sup>	Suínos <sup>2</sup>	Planta <sup>3</sup>	Sequências efetivas <sup>4</sup>	Efetivo (%)
E13	140.247.184	138.997.044	92.065	21.190	138.883.789	99,03%
S13	76.483.028	73.292.064	50.096	8.101	73.233.867	95,75%
E14	73.459.528	67.472.732	291.501	11.321	67.169.910	91,44%
S14	77.322.738	75.353.438	62.942	11.161	75.279.335	97,36%
E15	20.459.602	20.239.502	26.052	1.713	20.211.737	98,79%
S15	26.784.016	26.546.696	44.527	2.158	26.500.011	98,94%
E16	46.346.684	45.388.622	74.890	9.530	45.304.202	97,75%
S16	44.169.078	42.470.354	46.415	9.225	42.414.714	96,03%
E17	17.906.172	17.581.694	82.206	1.491	17.497.997	97,72%
S17	66.703.740	65.248.750	52.877	16.595	65.179.278	97,71%
E18	64.846.512	63.881.906	87.122	6.668	63.788.116	98,37%
S18	93.488.498	91.610.668	62.732	12.714	91.535.222	97,91%
E19	74.445.548	73.390.650	42.686	14.109	73.333.855	98,51%
S19	61.003.500	59.294.012	152.947	11.802	59.129.263	96,93%
Afluente orgânico	39.960.926	39.701.816	20.651	3.460	39.677.705	99,29%
<b>Média</b>	61.575.117	60.031.330	79.314	9.416	59.942.600	
<b>Desvio padrão</b>	31.432.628	30.894.473	66.925	5.701	30.876.226	

Fonte: elaborado pela autora.

Legenda: Os números de 13 ao 19 correspondem ao ano da coleta, e o afluente orgânico é uma amostra proveniente de uma granja que não utiliza antimicrobianos. <sup>1</sup> Sequências após remoção dos adaptadores e de bases com baixa qualidade. <sup>2</sup> Sequências mapeadas no genoma de *Sus scrofa* (número de acesso do Refseq: GCF\_000003025.6) <sup>3</sup> Sequências mapeadas nos genomas das plantas: eucalipto (*Eucalyptus grandis* - GCF\_016545825.1), milho (*Zea mays* - GCF\_902167145.1), soja (*Glycine max* - GCF\_000004515.6), trigo (*Triticum aestivum* - GCF\_018294505.1) e sorgo (*Sorghum bicolor* - GCF\_000003195.3). <sup>4</sup> Sequências efetivas são os que restaram após as etapas de pré-processamento (após exclusão das sequências com baixa qualidade e remoção das sequências que mapearam com o genoma dos suínos e plantas).

Figura 12 – Composição das amostras de entrada (E) e saída (S) dos biodigestores de dejetos de suinocultura.



Fonte: elaborado pela autora.

Legenda: Os números de 13 a 19 correspondem ao ano da coleta, e o afluente orgânico é uma amostra proveniente de uma granja que não utiliza antimicrobianos.

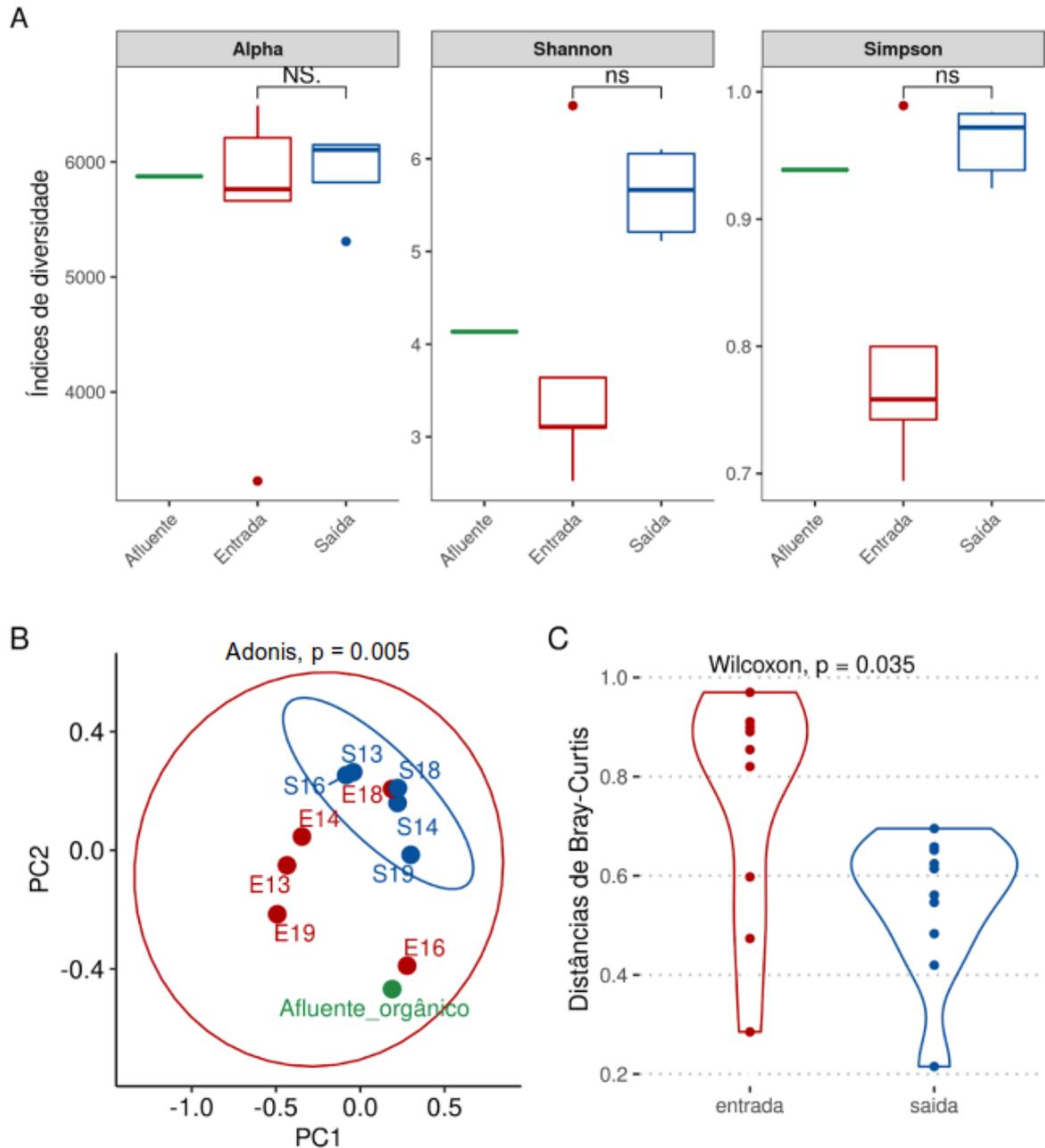
#### 4.2.2. Diversidade microbiana

Na Figura 13, as diversidades alfa e beta são apresentadas. Na Figura 13A, foram observados três índices de diversidade alfa, e as diferenças encontradas pelos três índices não foram significativas. No entanto, a tendência encontrada pode ser discutida da seguinte forma: o índice Alpha, representando a riqueza, mostra que a mediana das amostras de saída é maior que a de entrada, indicando uma maior riqueza nessas amostras. Quanto aos índices de Shannon e de Simpson, notamos que as amostras de entrada têm uma diversidade menor em comparação com as amostras de saída, com exceção da amostra (E18). O índice de Simpson sugere que as amostras de saída possuem uma menor dominância de espécies do que as amostras de entrada.

Na Figura 13B, observamos o gráfico de PCoA, em que houve diferença estatística nesta análise (Adonis,  $p = 0,005$ ), mostrando que existe uma diferença entre as espécies encontradas na entrada e saída dos biodigestores de dejetos da

suinocultura. Na Figura 13C, mostra em conjunto com o PCoA que as amostras de saída dos biodigestores são mais parecidas que as amostras de entrada.

Figura 13 – Diversidade nas amostras de entrada (E) e saída (S) dos biodigestores de dejetos de suinocultura baseada na diversidade de espécies encontradas.



Fonte: elaborado pela autora.

Legenda: (A) Alfa diversidade com os índices de Alpha (Riqueza), Shannon e Simpson. (B) Gráfico de PCoA utilizando a distância de Bray-Curtis e (C) diferenças nas distâncias de Bray-Curtis entre as amostras. Os números de 13 a 19 correspondem ao ano da coleta, e o afluente orgânico é uma amostra proveniente de uma granja que não utiliza antimicrobianos. ns – não significativo.

### 4.2.3. Composição taxonômica

A maioria dos microrganismos encontrados nas amostras eram bactérias variando de aproximadamente 85,5% na amostra de saída do biodigestor de 2015 (S15), a 99,6% na amostra de entrada do biodigestor de 2019 (E19). Archaea, Viruses e Eukaryota representaram uma média de 2,22%, 0,62% e 0,56% da microbiota dos dejetos suínolas, respectivamente (Figura 14A). A abundância de Archaea foi maior na saída do biodigestor em 2015 (S15) (12,64%), enquanto Víruses foi nas amostras de entrada de 2015 (E15) e de 2017 (E17), com 3,89% e 3,56%, respectivamente. Sendo que esses últimos resultados podem estar enviesados pelo baixo rendimento das sequências nestas amostras.

Na Figura 14B, observamos que os Filos predominantes nos dejetos suínolas foram Proteobacteria (49,94%) e Firmicutes (33,34%), seguidos pelo Bacteroidetes (8,73%). As famílias mais abundantes foram Moraxellaceae com um média de 29,33% e Lactobacillaceae com 10,79%. As famílias mais abundantes nas amostra de afluyente suínola de criação orgânica foram Flavobacteriaceae e Pseudomonadaceae com 15,48% e 11,09% das sequências atribuídas à esses microrganismos (Figura 14C). Entre os gêneros mais abundantes, os que se destacam são o *Acinetobacter*, seguido pelo *Lactobacillus* e pelo gênero *Jeotgalibaca* (Figura 15).

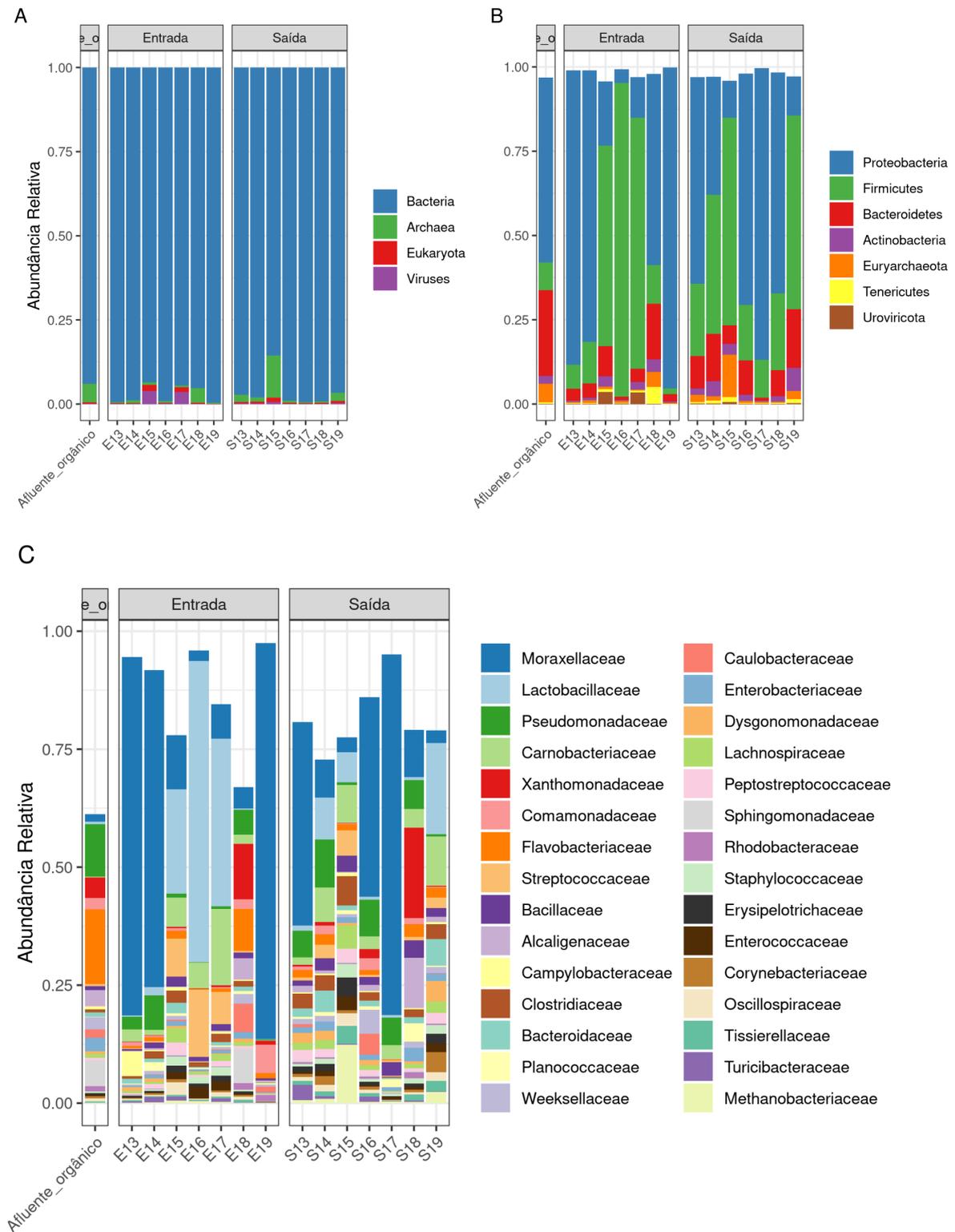
As vias metabólicas microbiológicas dentro do biodigestor de dejetos de suinocultura podem ser classificadas em quatro etapas sucessivas: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese (TÁPPARO et al., 2020). Jiang et al. (2019), mostrou que membros do gênero *Acinetobacter* são responsáveis pela hidrólise e acidificação obtendo como principais produtos o acetato e butirato em sistemas de codigestão seca de estrume de suinocultura. Embora não significativa, é possível observar uma tendência de aumento de arqueias nas amostras de saída dos biodigestores (Figura 14A). Entre os gêneros de arqueias metanogênicas identificadas, destaca-se os *Methanosarcina*, *Methanobrevibacter* e *Methanotrix* (Figuras 15 e 16).

As sequências de Archaea detectadas na amostra de afluyente orgânico eram metanogênicas, também, pertencente à família Methanomicrobiaceae (Figura 14C), sendo a maioria dessas sequências atribuídas ao gênero *Methanoculleus*

(Figura 15) e à espécie *Methanoculleus bourgensis*. Esta espécie é metanogênica hidrogenotrófica que utiliza hidrogênio, dióxido de carbono ou formiato como substrato para a síntese de metano, sendo o acetato um componente necessário para o seu crescimento (ASAKAWA; NAGAOKA, 2003; MAUS et al., 2012). Este gênero é comumente isolado de sistemas de reatores de produção de biogás alimentados com produtos primários renováveis (MAUS et al., 2012), e já foi encontrado em sedimentos marinhos (ANDERSON et al., 2009).

Na Figura 16 são apresentadas 22 espécies diferencialmente abundantes entre a entrada e saída dos biodigestores. Sendo que a *Corynebacterium maris* e *Flaviflexus* sp. H23T48 são mais abundantes na saída e as outras 20 na entrada, sendo *Arcobacter* o gênero que mais se destaca, com 13 espécies diferencialmente abundantes. *Arcobacter* é um patógeno zoonótico emergente (GOBBI et al., 2018) e sua via mais importante de transmissão para humanos é a ingestão de alimentos e água contaminados (HAMILL; NEILL; MADDEN, 2008). Membros do gênero *Arcobacter* estão comumente presentes em alimentos de origem animal, com maior prevalência em aves, seguidas de suínos e bovinos (RIVAS; FEGAN; VANDERLINDE, 2004). Estudos mostram que a contaminação de produtos cárneos por *Arcobacter* ocorre principalmente através da contaminação fecal direta das carcaças durante o processo de abate (AYDIN et al., 2007). Dessa forma, o tratamento de dejetos da suinocultura a partir de biodigestores mostrou-se eficiente para reduzir esse gênero com potencial impacto na saúde humana.

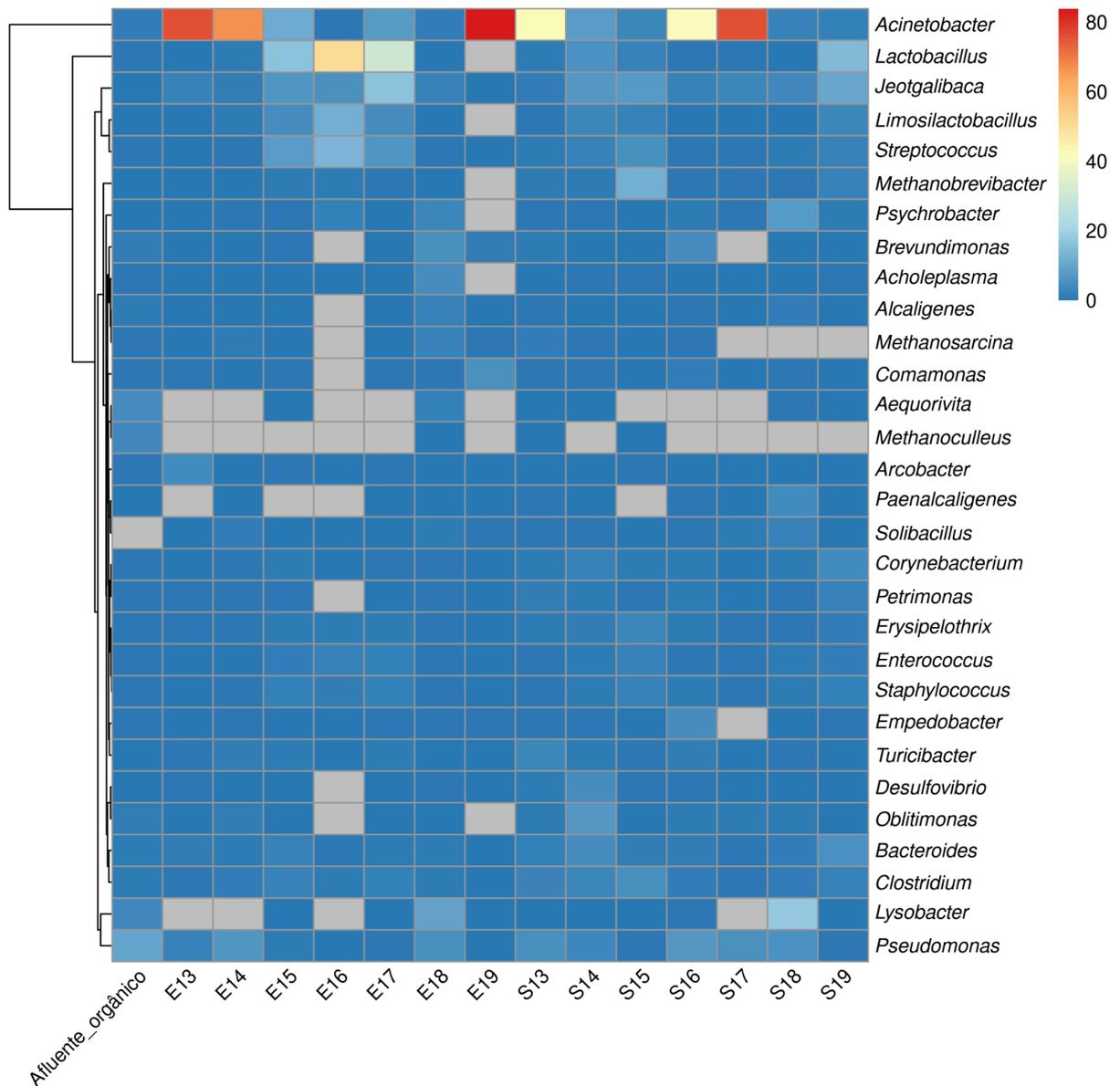
Figura 14 – Taxonomia ao nível de (A) domínio, (B) Filo e (C) família encontradas nas amostras de entrada (E) e saída (S) dos biodigestores de dejetos de suinocultura.



Fonte: elaborado pela autora.

Legenda: Apresentados os taxa com mais de 1% de abundância. Os números de 13 a 19 correspondem ao ano da coleta, e o afluente orgânico é uma amostra proveniente de uma granja que não utiliza antimicrobianos.

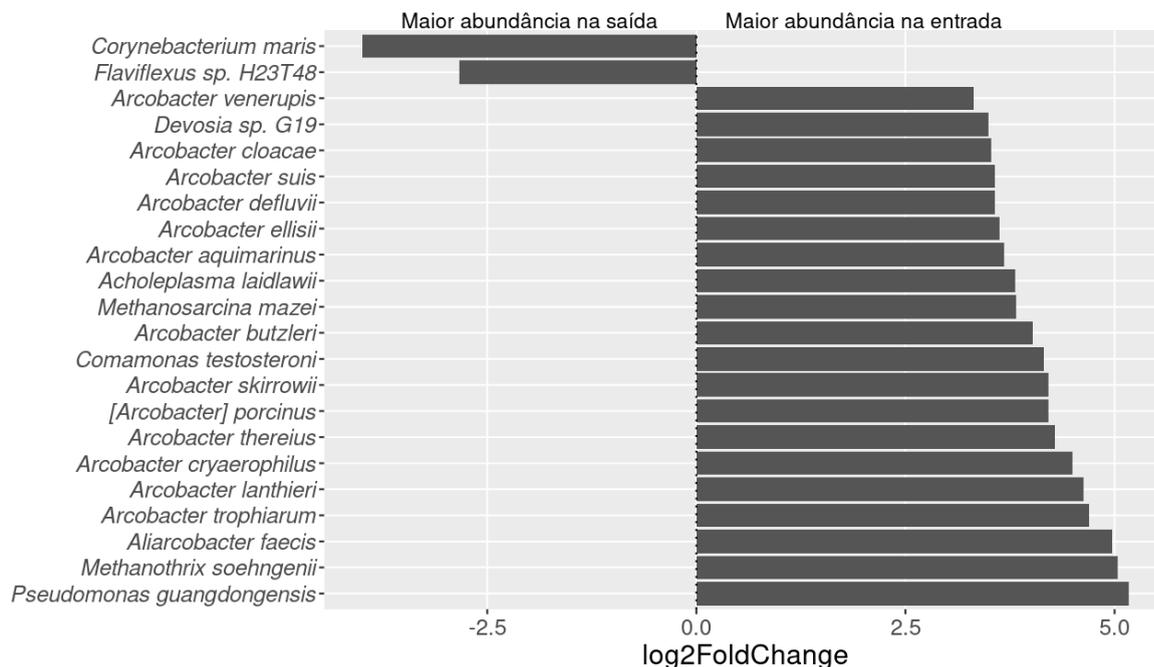
Figura 15 – Os 30 gêneros mais abundantes encontrados nas amostras de entrada (E) e saída (S) dos biodigestores de dejetos de suinocultura.



Fonte: elaborado pela autora.

Legenda: Os números de 13 a 19 correspondem ao ano da coleta, e o afluente orgânico é uma amostra proveniente de uma granja que não utiliza antimicrobianos.

Figura 16 – Espécies diferencialmente abundantes entre as amostras de entrada e saída dos biodigestores de dejetos da suinocultura.



Fonte: elaborado pela autora.

#### 4.2.4. Caracterização do resistoma

No total foram identificados 153 genes que conferem resistência pertencentes a 21 classes de antimicrobianos nas amostras de entrada e saída dos biodigestores (Tabela S1). Na Figura 17 são apresentadas as classes antimicrobianas encontradas nas amostras. Observamos que as classes mais abundantes foram o MLS (macrolídeos, lincosamidas e estreptogramina), Aminoglicosídeos, Tetraciclina, Oxazolidinona e Fenicol. Sendo os genes mais predominantes o da classe de MLS, *MLS23S*, o *A16S* da classe aminoglicosídeos, e o *O23S* da classe Oxazolidinona (Figura 18).

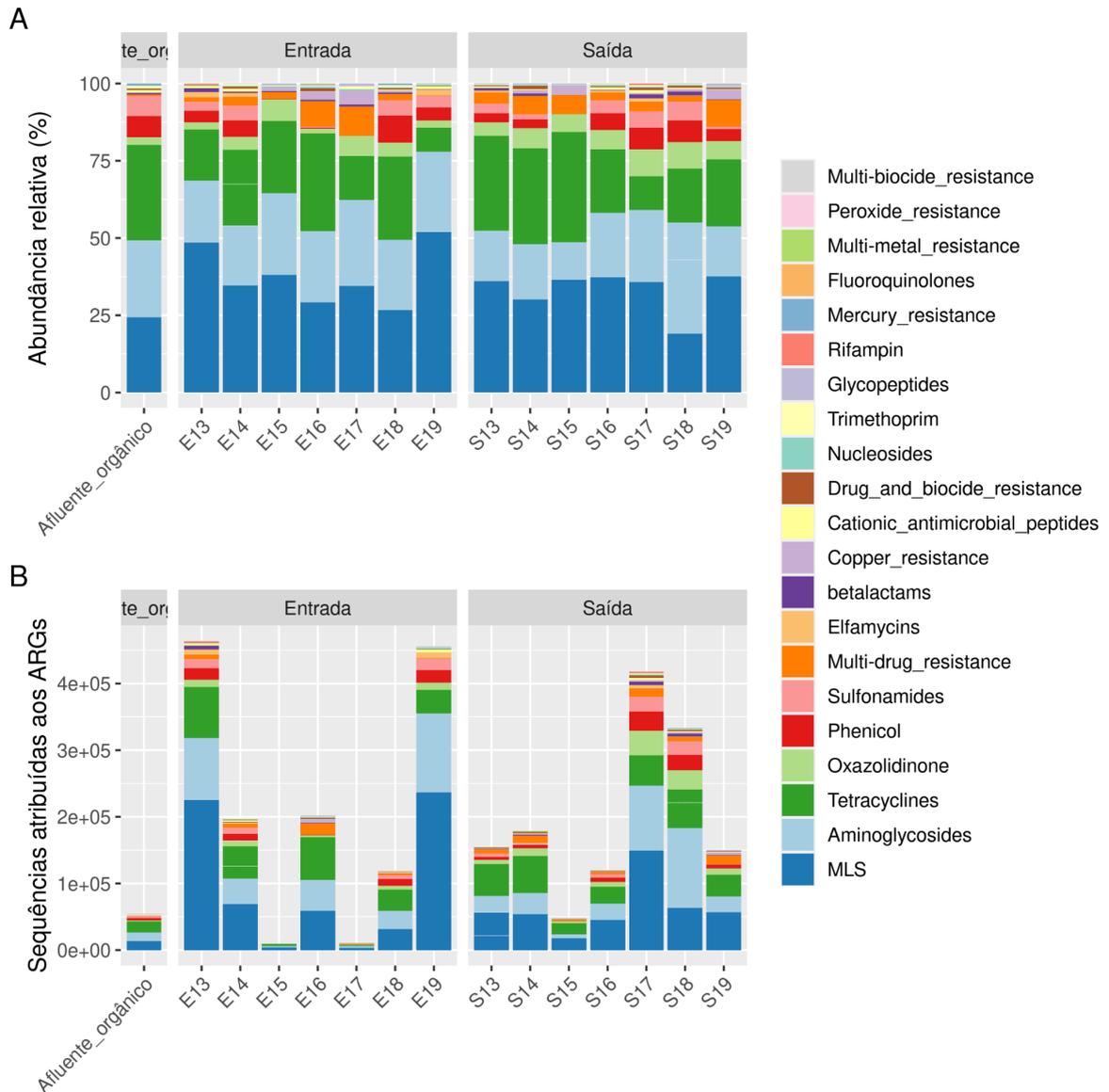
Sete genes móveis de resistência à oxazolidinona, incluindo *cfr*, *cfr(B)*, *cfr(C)*, *cfr(D)*, *cfr(E)*, *optrA* e *poxtA*, foram identificados até o momento. Os genes *cfr* codificam para 23S rRNA metilases, que conferem um fenótipo de multirresistência que inclui resistência a fenicóis, lincosamidas, oxazolidinonas, pleuromutilinas e compostos de estreptogramina A, esse gene foi encontrado em todas as amostras de dejetos suinícolas (Figura 18). O gene *optrA* codifica proteínas ABC-F que protegem os ribossomos bacterianos dos efeitos inibitórios das oxazolidinonas

(SCHWARZ et al., 2021). O gene *optrA* confere resistência a oxazolidinonas e fenicois, esse gene foi encontrado em todas as amostras com exceção da E15. Esses genes de resistência à oxazolidinona são mais frequentemente encontrados em plasmídeos, mas também estão localizados em transposons, elementos integrativos e conjugativos (ICEs), ilhas genômicas e profagos (SCHWARZ et al., 2021).

A florfenicol, um antimicrobiano da classe fenicol, tem sido aplicado gradualmente em todo o mundo desde que foi lançado no Japão em 1990. É amplamente utilizado em clínicas veterinárias, como medicamento veterinário e aditivo alimentar, por sua boa eficácia terapêutica em doenças bacterianas de suínos, bovinos, aves, e peixes (LI et al., 2020). Recentemente, muitas bactérias resistentes ao florfenicol e genes de resistência relacionados foram isolados de vários animais (LI et al., 2020). O gene *floR* foi detectado nos plasmídeos e nos cromossomos de *E. coli* de bovinos, aves e suínos (ARCANGIOLI et al., 1999; BOLTON et al., 1999), e em isolados de *E. coli* de origem humana (FERNÁNDEZ-ALARCÓN; SINGER; JOHNSON, 2011). O gene *floR* nesse trabalho só não foi identificado nas amostras S15, E15 e E17, que pode ser um viés da profundidade de sequenciamento. Li et al. (2020) sugerem que os MGEs desempenham um papel importante na replicação de genes de resistência e na transferência horizontal de genes (HGT) de resistência à florfenicol.

Na Figura 19 são apresentadas as diversidades alfa e beta calculadas utilizando os ARGs encontrados. Na Figura 19A, observamos que para os três índices de diversidade alfa não foram encontradas diferenças significativas. Entretanto, observamos uma riqueza maior na amostra oriunda de afluentes de criação orgânica (Alpha). Não houve diferença significativa no índice de diversidade beta testado na matriz de distâncias de Bray-Curtis utilizando o teste de Adonis ( $p > 0,05$ ) (Figura 19 B). Porém, na Figura 19C, observamos que as amostras de saída dos biodigestores são mais similares entre si que as amostras de entrada.

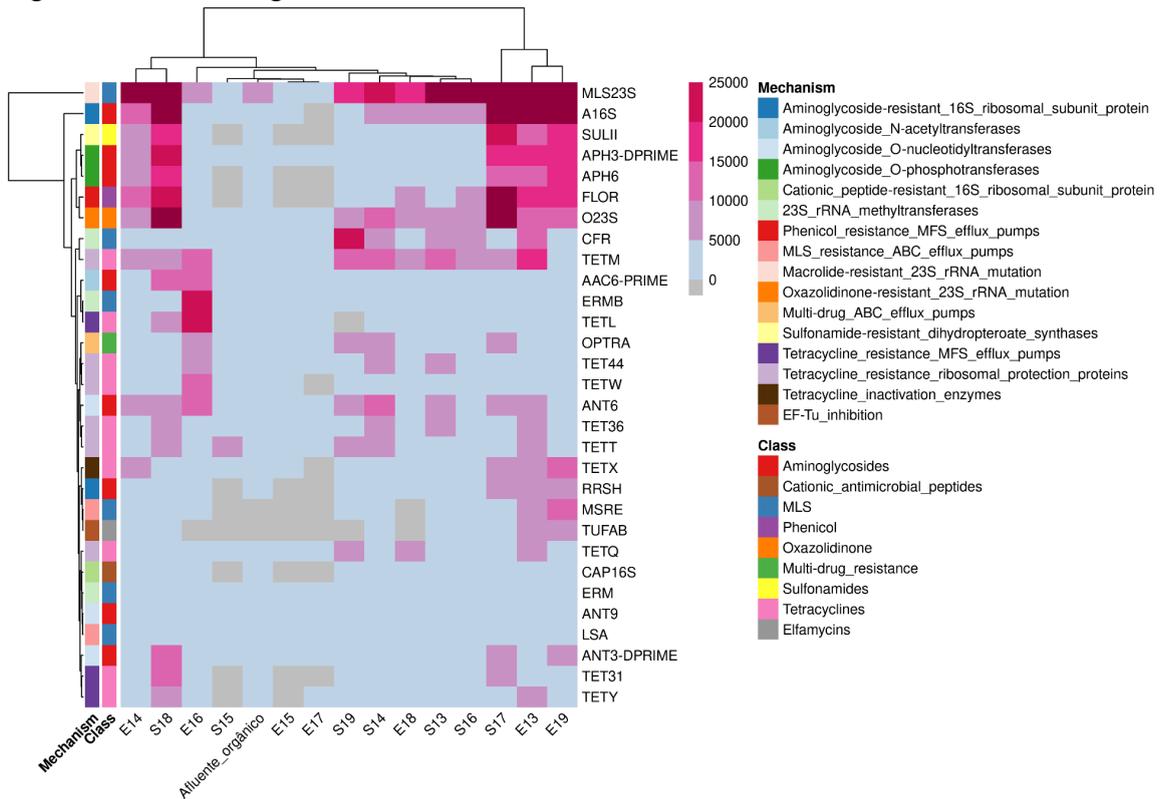
Figura 17 – Classes de antimicrobianos para os quais foram identificados ARGs nas amostras de entrada (E) e saída (S) dos biodigestores de dejetos de suinocultura.



Fonte: elaborado pela autora.

Legenda: (A) Abundância relativa dos ARGs. (B) Número de sequências atribuídas àqueles ARGs. Os números de 13 a 19 correspondem ao ano da coleta, e o afluente orgânico é uma amostra proveniente de uma granja que não utiliza antimicrobianos.

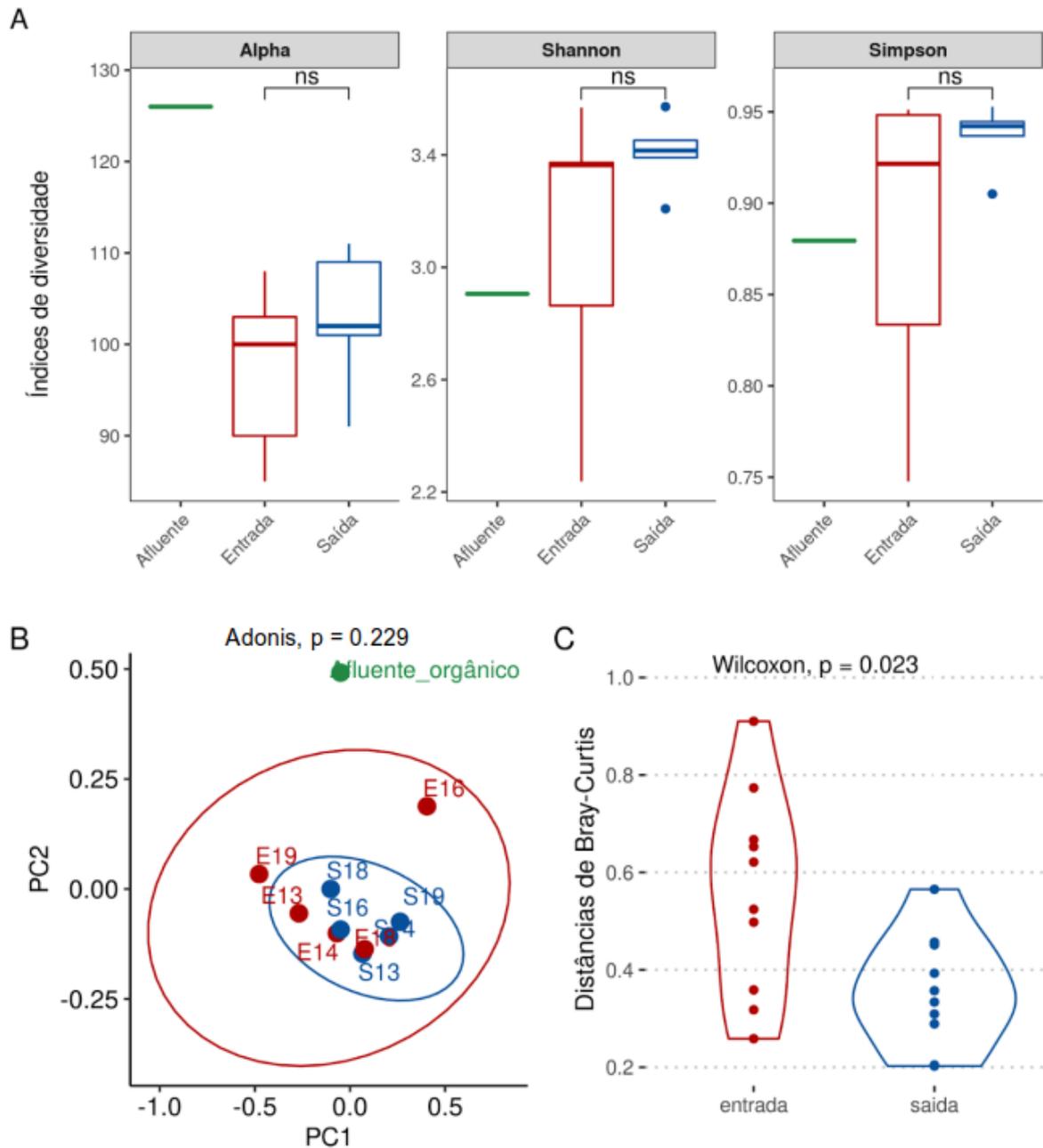
Figura 18 – Os 30 genes de resistência aos antimicrobianos mais abundantes.



Fonte: elaborado pela autora.

Legenda: Genes identificados com suas classes e mecanismos de ações correspondentes encontrados nas amostras de entrada (E) e saída (S) dos biodigestores de dejetos de suinocultura. Os números de 13 a 19 correspondem ao ano da coleta, e o afluentes orgânico é uma amostra proveniente de uma granja que não utiliza antimicrobianos.

Figura 19 – Diversidade nas amostras de entrada (E) e saída (S) dos biodigestores de dejetos de suinocultura baseada nos genes de resistência antimicrobiana (ARGs) encontrados.



Fonte: elaborado pela autora.

Legenda: (A) Alfa diversidade com os índices de Alpha (Riqueza), Shannon e Simpson. (B) Gráfico de PCoA utilizando a distância de Bray-Curtis e (C) diferenças nas distâncias de Bray-Curtis entre as amostras. Os números de 13 a 19 correspondem ao ano da coleta, e o afluente orgânico é uma amostra proveniente de uma granja que não utiliza antimicrobianos. ns = não significativo.

### 4.3. COMPARANDO OS GENES DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS E FATORES DE VIRULÊNCIA ENTRE AS AMOSTRAS DE DEJETOS DOS SISTEMAS DE PRODUÇÃO ANIMAL AVÍCOLA E SUINÍCOLA

#### 4.3.1. Resistoma e VFs nas amostras de dejetos de aves e suínos

Usando o banco de dados CARD, foram detectados ARGs em todos os locais amostrados, totalizando 1.697 contigs contendo ARGs, com contagens variando de 23 (E17) a 117 (Cama\_03). Esses ARGs conferiram potencialmente resistência a vinte classes farmacológicas de antimicrobianos, sendo que aminoglicosídeos (21,86%), multirresistência (17,80%), tetraciclina (15,55%) e MLS (14,14%) foram as classes de ARGs mais prevalentes entre todas as amostras de dejetos analisadas. Em seguida, também foram observados ARGs de lincosamida (6,01%), diaminopirimidina (5,66%) e fenicol (5,60%) (Figura 20). Um total de 231 ARGs únicos foi identificado em todas as amostras, com *ermA* (MLS), *inuD* e *inuC* (lincosamida), *aph(3')-IIIa* (aminoglicosídeo), *erm(35)*, *ermB* e *ermG* (MLS), e *sul2* (sulfonamida) sendo os genes mais frequentemente detectados.

A análise revelou uma predominância de genes que conferem resistência a aminoglicosídeos e tetraciclinas, além da presença de genes associados a múltiplas classes de antimicrobianos em todas as amostras. Esses resultados corroboram com os apresentados anteriormente, com os dados baseados na abordagem de análise por sequências. Achados semelhantes foram documentados em diversas regiões, incluindo o Brasil (BELTRAME et al., 2022), os Estados Unidos (ECKSTROM; BARLOW, 2019), e a China (QIAN et al., 2018; QIU et al., 2022).

Do banco de dados VFDB, foram detectados 309 contigs contendo VFs em todas as amostras de dejetos, abrangendo 133 genes diferentes, categorizados em 39 classes com base em suas funções de virulência (Figura 21). O VF predominante identificado foi um *acyl carrier protein encoded* (gene *acpX*), correspondendo a 3,88% de todos os VFs identificados. Foram identificados vários genes de adesão e colonização associados aos *Type IV pili*, *Type 1 fimbriae*, *K88 pili/F4 fimbriae* e *Extracellular Polysaccharides (ECP)*. Estes incluíram *pilG* (3,24%), *yagZ/ebpA* (1,94%), *fimE* (1,62%), *fimF* (1,62%), *fimH* (1,62%) e *fimI* (1,62%). Além disso, foram

detectados genes envolvidos na aquisição de nutrientes ligados ao *Enterobactin* e *Aerobactin*, como *entA* (1,62%), *fes* (1,62%), *entC* (1,30%), *entD* (1,30%), *entE* (1,30%), *entS* (1,30%), *fepC* (1,30%) e *iucD* (0,65%). Adicionalmente, foram identificados sistemas de secreção, incluindo *T2SS*, *LEE encoded T3SS* e *TTSS*, correspondendo a 15,53% dos VFs totais.

Neste estudo, identificamos uma ampla variedade de VFs associados à patogenicidade bacteriana, sugerindo capacidade de invasão, adesão, sobrevivência e multiplicação. Vale destacar os fatores de adesão e colonização como *Type 1 fimbriae* (CONNELL et al., 1996), *Type IV pili* (MELVILLE; CRAIG, 2013) e *Ebp pili* (LEANTI LA ROSA et al., 2016), que permitem a sobrevivência e multiplicação de microrganismos em células hospedeiras. Além disso, detectamos sistemas de secreção como *T2SS* (KOROTKOV; SANDKVIST; HOL, 2012) e *TTSS* (TANG; XIAO; ZHOU, 2006), indicativos da capacidade das bactérias em liberar toxinas e proteínas efetoras diretamente nas células hospedeiras. Fatores envolvidos na aquisição de nutrientes, como *enterobactin* e *salmochelin*, destacam estratégias bacterianas para sobrevivência e proliferação em ambientes hospedeiros. Além disso, componentes associados à formação de biofilme, adesão celular, como flagelos, pili e cápsulas, podem contribuir para um ambiente propício à troca de genes plasmidiais (BORGES et al., 2018; DEBLAIS et al., 2018; OLADEINDE et al., 2019). Esses fatores, juntamente com a identificação de AMR como quinolonas e  $\beta$ -lactâmicos, intensificam o desafio no tratamento de infecções (MONTE et al., 2019).

Quanto às diferenças observadas entre os grupos, conforme ilustrado na Figura 22A, encontramos 81 ARGs exclusivos nas amostras de aves, enquanto nos suínos havia 66, com outros 84 compartilhados entre os grupos. Em relação às classes de resistência, identificamos 6 exclusivamente encontradas nas aves: ácido fusídico, corante acridina, nitroimidazol, peptídeo, fosfomicina e aminocumarina (Figura 23). Quanto aos VFs encontrados entre os grupos, observamos serem menos abundantes e menos diversos em suínos em comparação com as aves (Figura 21). Na Figura 22B, foi observado que havia 14 VFs exclusivos em suínos em comparação com 112 nas aves, com apenas 7 compartilhados entre os grupos, a saber: *acpXL*, *flgG*, *fliG*, *fliP*, *pilG*, *pilH* e *pilT*.

Observamos diferenças significativas entre as amostras de aves e suínos quanto à presença de ARGs. Enquanto certas classes de resistência foram exclusivamente detectadas nas aves, o cenário oposto não foi observado. Esses achados estão alinhados com pesquisas anteriores que indicam que o dejetos de aves abriga uma maior abundância de ARGs em comparação com suínos (QIAN et al., 2018; QIU et al., 2022). Além disso, um estudo examinando diversas fontes de dejetos animais revelou perfis de ARGs agrupados por espécies de animais (QIAN et al., 2018), com outro estudo demonstrando o agrupamento de genes específicos em aves (QIU et al., 2022), corroborando nossos achados. Embora essa segregação não tenha sido observada em nosso estudo, uma dinâmica semelhante pode estar ocorrendo nas amostras de aves.

Além disso, identificamos uma diversidade e abundância maior de VFs em camas de aviário em comparação com dejetos de suínos. Essas diferenças podem ser atribuídas a uma variedade de fatores, incluindo variações na microbiota intestinal dos animais, práticas de manejo distintas em granjas de aves e suínos, e uso de doses diferentes de antimicrobianos para cada criação. Geralmente, as aves recebem doses mais altas de antimicrobianos devido à sua maior densidade de criação e período de comercialização mais curto, refletido na concentração elevada de ARGs nas camas de aviário em comparação com os dejetos de suínos (ZHAO; DONG; WANG, 2010). Outro manejo que tem uma diferença significativa entre as duas criações é o reuso da cama de aviário, enquanto as baias suínas são lavadas diariamente. Estudos indicam que falhas na sanitização com agentes comumente usados na avicultura podem permitir a proliferação de microrganismos portadores de resistência (DENG et al., 2018; YANG et al., 2020). Entre os principais saneantes usados na avicultura estão os compostos de amônio quaternário e o hipoclorito de sódio. Estima-se que o uso excessivo desses produtos pode promover AMR por meio de mecanismos de co-seleção e resistência cruzada (BEZEK et al., 2023; MUSTAFA et al., 2021).

Figura 20 – Abundâncias relativas de ARGs (A) e número de contigs (B) por amostras de dejetos avícolas e suínícolas.

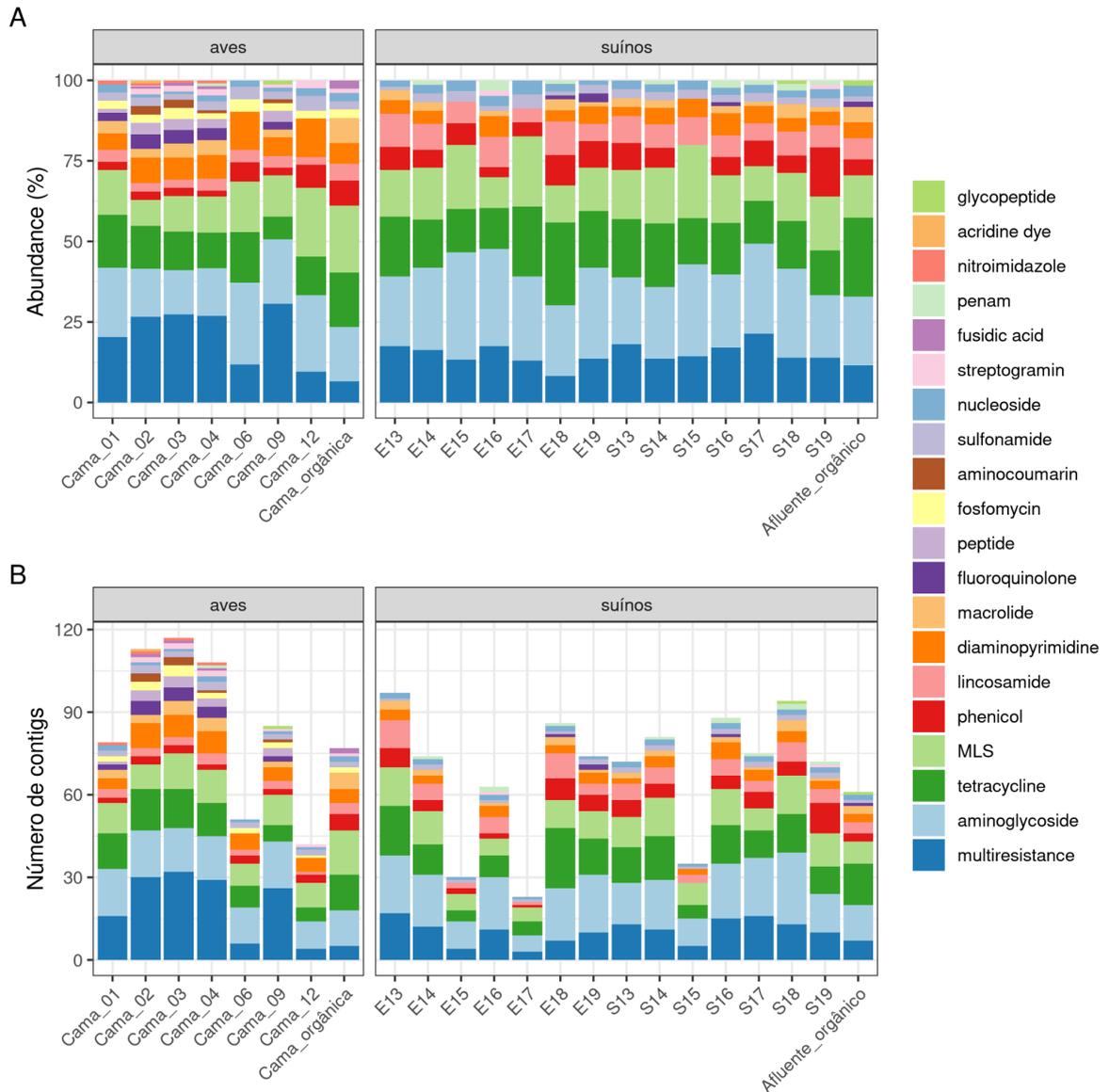
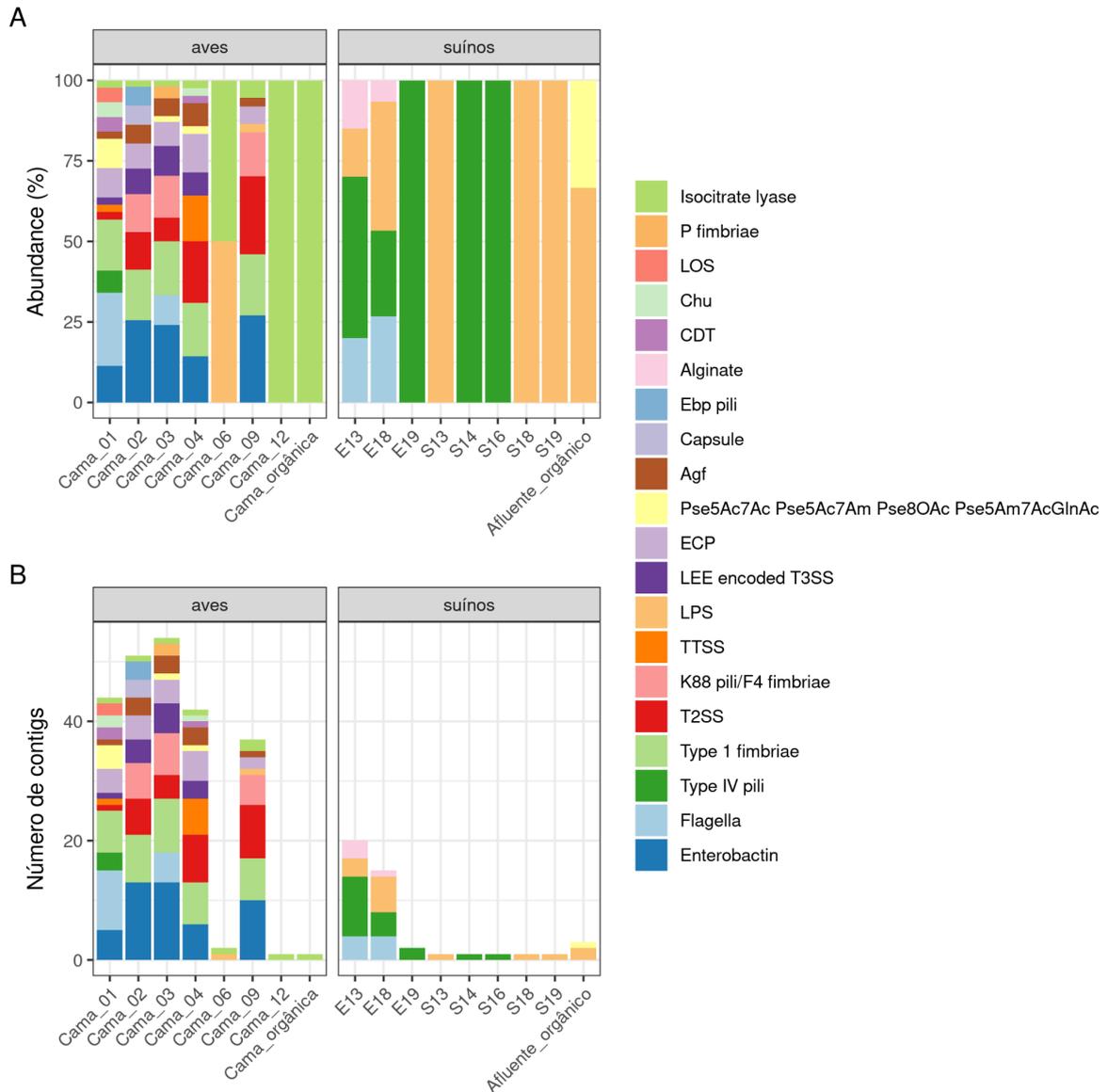


Figura 21 – Abundâncias relativas de VFs (A) e número de contigs (B) por amostras de dejetos avícolas e suínos.

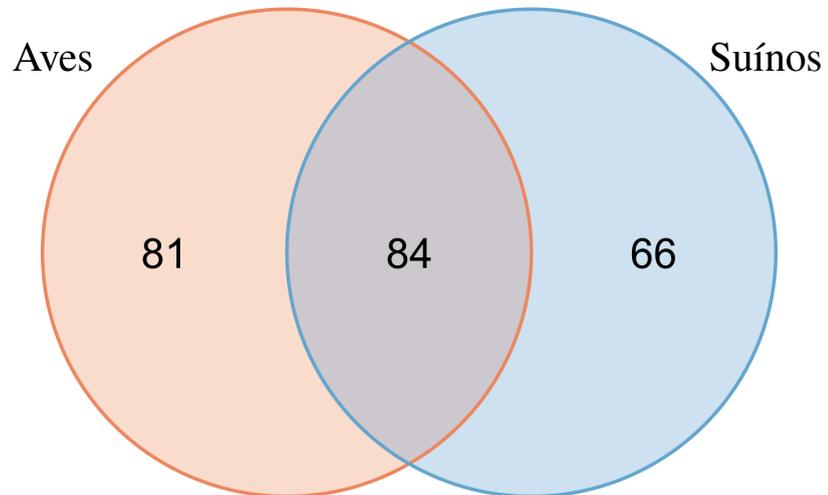


Fonte: elaborado pela autora.

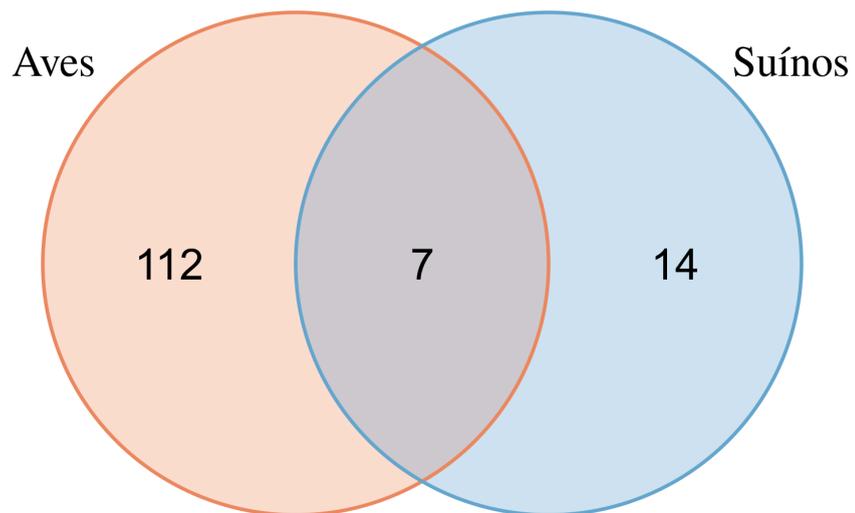
Legenda: (A) Abundâncias relativas de VFs identificados em amostras de cama de aviário e de dejetos de suínos, coloridos por categoria de resistência conforme indicado na legenda. (B) Número de contigs de VFs identificados nas amostras de cama de aviário e de dejetos de suínos, coloridos por categoria de resistência conforme indicado na legenda.

Figura 22 – Diagrama de Venn representando genes comuns e exclusivos dentro do grupos para (A) ARGs e (B) VFs.

A

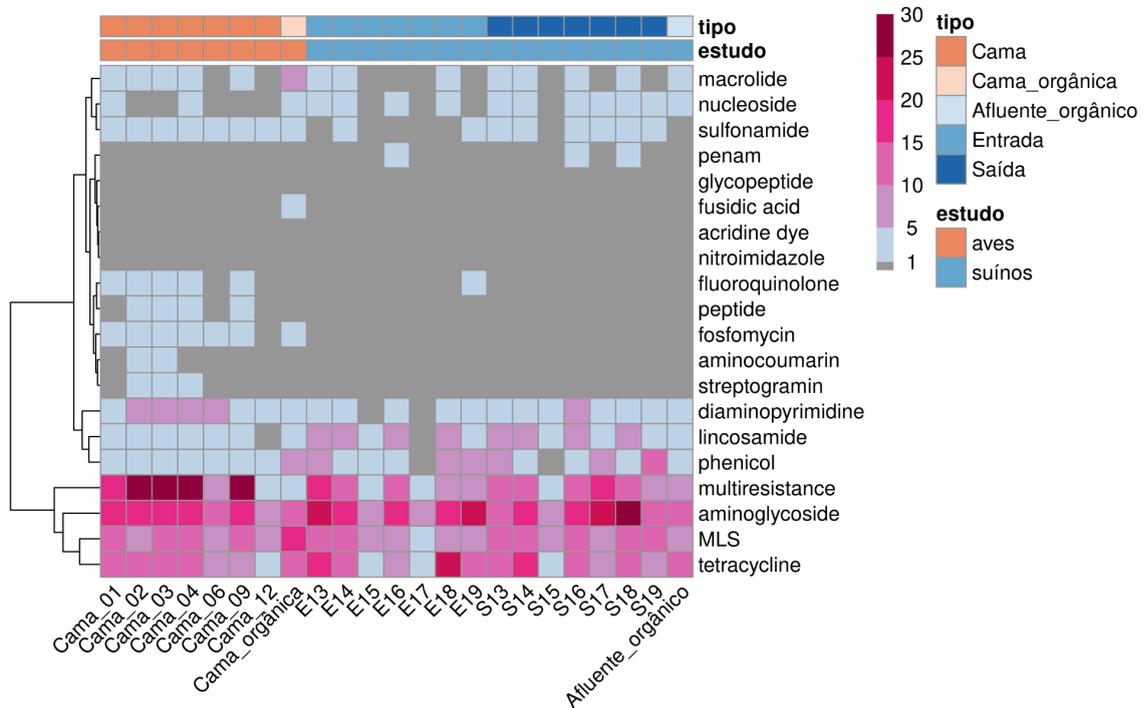


B



Fonte: elaborado pela autora.

Figura 23 – Heatmap com a frequência das classes de antimicrobianos para os quais foram identificados ARGs nas amostras de dejetos avícolas e suínícolas.



Fonte: elaborado pela autora.

Legenda: O espectro de cores denota a alta frequência (rosa) para baixa frequência (azul) de ARGs coloridos por categoria de resistência. O cinza indica a ausência de ocorrência de ARGs na amostra.

#### 4.3.2. Taxonomia do resistoma e dos VFs das camas de aviário e dos dejetos de suínos

Na Figura 24, os resultados da anotação taxonômica dos ARGs mostram que nas camas de aviário, as taxa mais abundantes foram *Escherichia*, com uma abundância média de 22,85%, seguido por *Staphylococcus* (12,24%), Gammaproteobacteria (8,10%) e *Enterococcus* (5,54%). Por outro lado, nos dejetos de suínos, as taxa mais prevalentes associados aos ARGs foram Gammaproteobacteria (9,56%), Pseudomonadota (4,80%), *Staphylococcus* (4,46%) e *Enterococcus* (4,47%). Em relação aos VFs, os resultados mostraram que nas camas de aviário, *Escherichia* (178 scaffolds), Enterobacteriaceae (32) e *Campylobacter* (22) foram as taxa predominantes, enquanto em suínos, o táxon dominante foi *Pseudomonas* (30) (Figura 25).

O gênero mais prevalente e abundante relacionado à ARGs e VFs na cama de aviário foi *Escherichia*. *E. coli* patogênica aviária (APEC) representa uma

preocupação significativa na produção de aves, pois é responsável pela colibacilose, uma doença oportunista com manifestações locais ou sistêmicas (OVI et al., 2023). Essa doença está distribuída globalmente e tem um impacto econômico substancial, especialmente na indústria de frangos de corte, resultando em mortalidade, morbidade, não uniformidade do plantel, produção reduzida e aumento da condenação durante o abate (MAK et al., 2022; NOLAN et al., 2020). Simultaneamente, foram identificados VFs, incluindo adesinas (*type 1*, *curli* e *P fimbriae*), flagelos, aerobactina, salmochelina, proteína de membrana externa, sendo descritos como preditores de virulência da APEC (JOHNSON et al., 2008; LA RAGIONE; WOODWARD, 2002).

Outros taxa associados à ARGs encontrados em todas as amostras, tanto de cama de aviário quanto de dejetos de suínos, foram *Staphylococcus* e Gammaproteobacteria. O *Staphylococcus* está amplamente distribuído na natureza e pode causar infecções tanto leves quanto graves em animais e humanos (MAK et al., 2022). Outro estudo identificou *Staphylococcus* em dejetos animais, transportando genes de resistência a aminoglicosídeos e MLS em aves, suínos e esterco bovino (QIU et al., 2022). Gammaproteobacteria é uma classe comumente encontrada no intestino de animais como aves e suínos. Um estudo constatou que Gammaproteobacteria estava positivamente correlacionada com a maioria dos ARGs identificados, incluindo *tet(W)*, em solo com aplicação de dejetos (MACEDO et al., 2020). Esses achados destacam o papel de *Staphylococcus* e Gammaproteobacteria como reservatórios de AMR em diversos ambientes agrícolas, destacando os potenciais caminhos de transmissão de genes de resistência entre animais e ambientes.



### 4.3.3. Elementos móveis na disseminação de ARGs e VFs

MGEs foram preditos nos metagenomas estudados, revelando um total de 542.152 (42,5%) contigs associadas a plasmídeos e 290.614 (22,8%) com fagos. Na Figura 26, são apresentados os resultados referentes à ARGs e VFs, nos quais foram identificados 617 genes de resistência em plasmídeos, sendo 573 associados à ARGs e 44 a VFs. Enquanto 97 ARGs estavam ligados a fagos e 156 ARGs foram detectados em sequências preditas como sendo tanto fago quanto plasmídeo. Dessa forma, os ARGs estão principalmente associados a plasmídeos (33,77%), enquanto aqueles associados a fagos representam uma proporção menor (5,72%). Além disso, os resultados indicam que apenas uma pequena parcela do total de VFs está vinculada a elementos móveis, como evidenciado pelo fato de que 14,24% dos VFs estão associados a plasmídeos. Em relação aos MGEs nas aves, foram detectados ARGs apenas em plasmídeos, enquanto em suínos, foram encontrados ARGs em plasmídeos, fagos e sequências preditas como sendo tanto de fago quanto de plasmídeo (Figura 26).

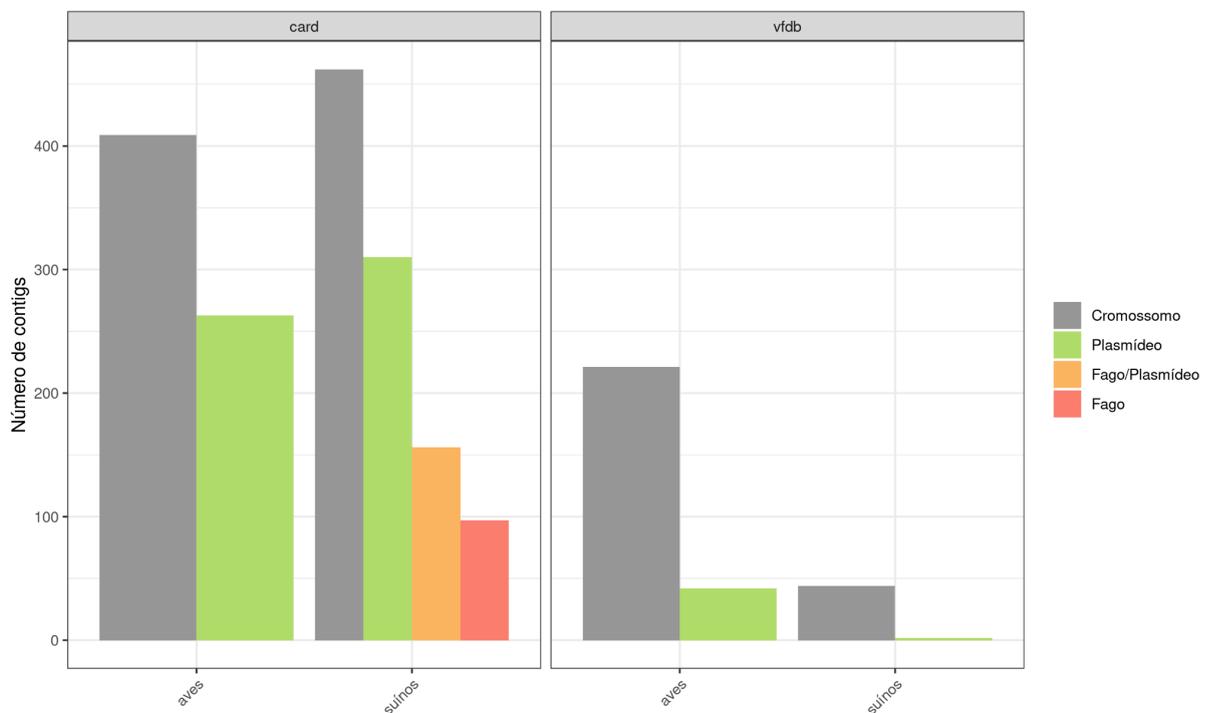
Os resultados revelaram uma distribuição significativa de ARGs em diferentes MGEs, com a maioria dos ARGs associados a plasmídeos, especialmente nas camas de aviário. Essa predominância de ARGs em plasmídeos sugere um alto potencial de disseminação horizontal de AMR entre comunidades bacterianas. Além disso, estudos mostram que dejetos provenientes da pecuária intensiva atua como um reservatório para plasmídeos multirresistentes com amplo espectro de hospedeiros, aumentando o risco de disseminação de resistência a múltiplos fármacos para outras cepas bacterianas por meio de mecanismos de HGT (BINH et al., 2008; YANG et al., 2017).

Adicionalmente, a detecção de ARGs em sequências preditas tanto como fagos quanto plasmídeos destaca a complexidade das interações entre esses elementos móveis na transferência de resistência. Embora esses achados possam ser potencialmente atribuídos a erros ou artefatos de análise, já que não realizamos análises adicionais usando métodos alternativos para confirmação dos resultados, existem estudos na literatura que relatam fagos-plasmídeos em *Salmonella enterica* carregando *blaCTX-M-15* (GREIG et al., 2022). Outro estudo identificou 60 fagos-plasmídeos contendo 184 ARGs, demonstrando sua capacidade de infectar e

converter outras cepas (PFEIFER; BONNIN; ROCHA, 2022). Além disso, os fagos-plasmídeos podem desempenhar um papel fundamental na transferência de genes entre elementos móveis dentro de seus hospedeiros, servindo como intermediários na conversão de um tipo de elemento em outro (PFEIFER; ROCHA, 2024).

A variação nos elementos móveis relacionados à distribuição de ARGs entre aves e suínos sugere diferenças potenciais na dinâmica da AMR entre as espécies, conforme mencionado acima. Compreender essas diferenças é essencial para o desenvolvimento de estratégias eficazes para controlar a AMR em sistemas de produção animal. Além disso, a presença de ARGs em amostras de suínos associadas a uma variedade de MGEs destaca a importância de uma abordagem multifacetada na mitigação do risco de disseminação de resistência. Esses resultados fornecem informações valiosas para o desenvolvimento de políticas e práticas voltadas para a preservação da eficácia dos antimicrobianos na medicina veterinária e humana.

Figura 26 – Abundância de ARGs e VFs em MGEs para as amostras de dejetos avícolas e suinícolas.



Fonte: elaborado pela autora.

## 5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nas amostras de cama de aviário indicam que, conforme as camas são sucessivamente utilizadas pelos lotes de animais, há um aumento na diversidade microbiana, ao passo que a diversidade de ARGs tende a diminuir. Isso sugere que as práticas de manejo adotadas têm se demonstrado efetivas na redução dos ARGs.

Já os resultados das amostras de suínos revelam que, conforme esperado, o tratamento dos dejetos da suinocultura por meio de biodigestores modifica a comunidade microbiana ao longo do processo de biodigestão. As amostras apresentam maior distinção na entrada, e a biodigestão tende a tornar o perfil microbiano mais homogêneo, especialmente reduzindo a presença de espécies do gênero *Arcobacter*, que têm impacto relevante na saúde humana. No entanto, não foi observada diferença significativa no perfil de ARGs entre as amostras de entrada e saída dos biodigestores, demonstrando uma ineficiência na redução destes elementos produzidos pela comunidade microbiana presente no ambiente.

Quando comparamos os diferentes sistemas de produção animal, ressalta uma intrincada interação entre ARGs, VFs e MGEs em amostras de cama de aviário e dejetos de suínos do oeste de Santa Catarina, Brasil. Identificamos uma ampla variedade de ARGs e VFs, destacando a natureza multifacetada da AMR em ambientes agrícolas. A predominância de *Escherichia*, em conjunto com os VFs identificados, sugere uma potencial influência das APEC na produção avícola, adicionalmente com a presença de *Staphylococcus* e Gammaproteobacteria, enfatizando ainda mais seus papéis como reservatórios de resistência. Além disso, a significativa distribuição de genes de resistência em plasmídeos sugere um alto potencial para HGT, destacando a importância do monitoramento e controle de MGEs para mitigar a disseminação da resistência.

Dessa forma, é imperativo que esforços futuros se concentrem na implementação de estratégias abrangentes de vigilância, desenvolvimento de medidas de intervenção direcionadas e promoção de colaborações interdisciplinares para enfrentar o desafio global da AMR de forma eficaz. Integrando epidemiologia molecular, bioinformática e abordagens ecológicas, podemos avançar em nossa

compreensão da dinâmica da AMR e trabalhar para preservar a eficácia dos antimicrobianos tanto na medicina veterinária quanto na humana.

## REFERÊNCIAS

- ABARENKOV, K. et al. The UNITE database for molecular identification and taxonomic communication of fungi and other eukaryotes: sequences, taxa and classifications reconsidered. **Nucleic Acids Research**, v. 52, n. D1, p. D791–D797, 5 jan. 2024.
- ABIA. **Balanço econômico da indústria de alimentos e bebidas**. Disponível em: <[https://www.abia.org.br/vsn/temp/OnePage\\_2024\\_VF\\_VF.pdf](https://www.abia.org.br/vsn/temp/OnePage_2024_VF_VF.pdf)>. Acesso em: 1 maio. 2024.
- ACINAS, S. G. et al. PCR-induced sequence artifacts and bias: insights from comparison of two 16S rRNA clone libraries constructed from the same sample. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 12, p. 8966–8969, dez. 2005.
- ACINAS, S. G. et al. Deep ocean metagenomes provide insight into the metabolic architecture of bathypelagic microbial communities. **Communications Biology**, v. 4, n. 1, p. 1–15, 21 maio 2021.
- AFSHINNEKOO, E. et al. Geospatial Resolution of Human and Bacterial Diversity with City-Scale Metagenomics. **Cell Systems**, v. 1, n. 1, p. 72–87, 29 jul. 2015.
- ALCOCK, B. P. et al. CARD 2020: antibiotic resistome surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. **Nucleic Acids Research**, v. 48, n. D1, p. D517–D525, 8 jan. 2020.
- ALEGBELEYE, O. O.; SANT'ANA, A. S. Manure-borne pathogens as an important source of water contamination: An update on the dynamics of pathogen survival/transport as well as practical risk mitigation strategies. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 227, p. 113524, 1 jun. 2020.
- ALEXYUK, P. et al. Draft genome sequences data of *Mammaliicoccus lentus* isolated from horse farm soil. **Data in Brief**, v. 51, p. 109752, 1 dez. 2023.
- ALLEN, H. K. et al. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 4, p. 251–259, abr. 2010.
- ALNEBERG, J. et al. Binning metagenomic contigs by coverage and composition. **Nature Methods**, v. 11, n. 11, p. 1144–1146, nov. 2014.
- AMIR, A. et al. Deblur Rapidly Resolves Single-Nucleotide Community Sequence Patterns. **mSystems**, v. 2, n. 2, p. e00191-16, 2017.
- ANDERSON, I. et al. Genomic Characterization of Methanomicrobiales Reveals Three Classes of Methanogens. **PLOS ONE**, v. 4, n. 6, p. e5797, 4 jun. 2009.
- ANDERSON, M. J.; WALSH, D. C. I. PERMANOVA, ANOSIM, and the Mantel test in the face of heterogeneous dispersions: What null hypothesis are you testing? **Ecological Monographs**, v. 83, n. 4, p. 557–574, 2013.
- ANGELAKIS, E. Weight gain by gut microbiota manipulation in productive animals. **Microbial Pathogenesis**, v. 106, p. 162–170, maio 2017.
- ANTONOPOULOS, D. A. et al. PATRIC as a unique resource for studying

antimicrobial resistance. **Briefings in Bioinformatics**, v. 20, n. 4, p. 1094–1102, 19 jul. 2019.

ANVISA. **Diretriz Nacional para Elaboração de Programa de Gerenciamento do Uso de Antimicrobianos em Serviços de Saúde**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, , 2017.

ARANGO-ARGOTY, G. et al. DeepARG: a deep learning approach for predicting antibiotic resistance genes from metagenomic data. **Microbiome**, v. 6, n. 1, p. 23, 1 fev. 2018.

ARCANGIOLI, M. A. et al. A new chloramphenicol and florfenicol resistance gene flanked by two integron structures in *Salmonella typhimurium* DT104. **FEMS microbiology letters**, v. 174, n. 2, p. 327–332, 15 maio 1999.

ASAKAWA, S.; NAGAOKA, K. *Methanoculleus bourgensis*, *Methanoculleus olentangyi* and *Methanoculleus oldenburgensis* are subjective synonyms. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, n. 5, p. 1551–1552, 1 set. 2003.

AYDIN, F. et al. Prevalence and distribution of *Arcobacter* species in various sources in Turkey and molecular analysis of isolated strains by ERIC-PCR. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 1, p. 27–35, jul. 2007.

AYLING, M.; CLARK, M. D.; LEGGETT, R. M. New approaches for metagenome assembly with short reads. **Briefings in Bioinformatics**, v. 21, n. 2, p. 584–594, 23 mar. 2020.

AZEVEDO, G. DE S. et al. Produção de Aves em Sistema Orgânico. **Pubvet**, v. 10, n. 04, 2 mar. 2016.

BAND, V. I. et al. Antibiotic failure mediated by a resistant subpopulation in *Enterobacter cloacae*. **Nature Microbiology**, v. 1, n. 6, p. 1–9, 9 maio 2016.

BANKEVICH, A. et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. **Journal of Computational Biology: A Journal of Computational Molecular Cell Biology**, v. 19, n. 5, p. 455–477, maio 2012.

BAQUERO, F. et al. Gene Transmission in the One Health Microbiosphere and the Channels of Antimicrobial Resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 17 dez. 2019.

BEGHINI, F. et al. Integrating taxonomic, functional, and strain-level profiling of diverse microbial communities with bioBakery 3. **eLife**, v. 10, p. e65088, 4 maio 2021.

BELTRAME, L. C. et al. Different Swine Production Systems Can Shape Slurry Resistome at Mechanism and Class Levels Based on Swine Manure Evaluation. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, p. 879656, 2022.

BENGTSSON-PALME, J. et al. Elucidating selection processes for antibiotic resistance in sewage treatment plants using metagenomics. **The Science of the Total Environment**, v. 572, p. 697–712, 1 dez. 2016.

BENN, A. et al. Studying the human oral microbiome: challenges and the evolution of solutions. **Australian Dental Journal**, v. 63, n. 1, p. 14–24, mar. 2018.

BERGLUND, F. et al. Comprehensive screening of genomic and metagenomic data reveals a large diversity of tetracycline resistance genes. **Microbial Genomics**, v. 6, n. 11, p. mgen000455, nov. 2020.

BEZEK, K. et al. Antimicrobial and Antibiofilm Effect of Commonly Used Disinfectants on *Salmonella* *Infantis* Isolates. **Microorganisms**, v. 11, n. 2, p. 301, fev. 2023.

BHARTI, R.; GRIMM, D. G. Current challenges and best-practice protocols for microbiome analysis. **Briefings in Bioinformatics**, v. 22, n. 1, p. 178–193, 18 jan. 2021.

BINDARI, Y. R. et al. Microbial communities of poultry house dust, excreta and litter are partially representative of microbiota of chicken caecum and ileum. **PLoS One**, v. 16, n. 8, p. e0255633, 2021.

BINH, C. T. T. et al. Piggery manure used for soil fertilization is a reservoir for transferable antibiotic resistance plasmids. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 66, n. 1, p. 25–37, 1 out. 2008.

BOLTON, L. F. et al. Detection of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype typhimurium DT104 based on a gene which confers cross-resistance to florfenicol and chloramphenicol. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 5, p. 1348–1351, maio 1999.

BOLYEN, E. et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. **Nature Biotechnology**, v. 37, n. 8, p. 852–857, ago. 2019.

BORGES, K. A. et al. Biofilm formation capacity of *Salmonella* serotypes at different temperature conditions. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, p. 71–76, jan. 2018.

BORTOLAIA, V. et al. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 75, n. 12, p. 3491–3500, 1 dez. 2020.

BRAY, J. R.; CURTIS, J. T. An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin. **Ecological Monographs**, v. 27, n. 4, p. 325–349, 1957.

BREITWIESER, F. P. et al. Human contamination in bacterial genomes has created thousands of spurious proteins. **Genome Research**, v. 29, n. 6, p. 954–960, jun. 2019.

BROGAN, D. M.; MOSSIALOS, E. A critical analysis of the review on antimicrobial resistance report and the infectious disease financing facility. **Globalization and Health**, v. 12, n. 1, p. 8, 22 mar. 2016.

BUCHER, M. G. et al. Reused poultry litter microbiome with competitive exclusion potential against *Salmonella* Heidelberg. **Journal of Environmental Quality**, v. 49, n. 4, p. 869–881, jul. 2020.

BUCHFINK, B.; REUTER, K.; DROST, H.-G. Sensitive protein alignments at

tree-of-life scale using DIAMOND. **Nature Methods**, v. 18, n. 4, p. 366–368, abr. 2021.

CAI, M. et al. An integrated control strategy for the fermentation of the marine-derived fungus *Aspergillus glaucus* for the production of anti-cancer polyketide. **Marine Biotechnology (New York, N.Y.)**, v. 14, n. 6, p. 665–671, dez. 2012.

CALLAHAN, B. J. et al. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nature Methods**, v. 13, n. 7, p. 581–583, jul. 2016.

CALLAHAN, B. J.; MCMURDIE, P. J.; HOLMES, S. P. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. **The ISME Journal**, v. 11, n. 12, p. 2639–2643, dez. 2017.

CAMACHO, C. et al. BLAST+: architecture and applications. **BMC Bioinformatics**, v. 10, n. 1, p. 421, 15 dez. 2009.

CASPI, R. et al. The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes - a 2019 update. **Nucleic Acids Research**, v. 48, n. D1, p. D445–D453, 8 jan. 2020.

CDC. **Antibiotic Use in the United States, 2023 Update: Progress and Opportunities**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/antibiotic-use/hcp/data-research/stewardship-report.html>>. Acesso em: 12 ago. 2024.

CHAO, A. Nonparametric Estimation of the Number of Classes in a Population. **Scandinavian Journal of Statistics**, v. 11, n. 4, p. 265–270, 1984.

CHAUMEIL, P.-A. et al. GTDB-Tk v2: memory friendly classification with the genome taxonomy database. **Bioinformatics**, v. 38, n. 23, p. 5315–5316, 1 dez. 2022.

CHEN, I.-M. A. et al. IMG/M: integrated genome and metagenome comparative data analysis system. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. D1, p. D507–D516, 4 jan. 2017.

CHEN, L. et al. VFDB 2016: hierarchical and refined dataset for big data analysis--10 years on. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D694-697, 4 jan. 2016.

CHEN, Z. et al. Impact of Preservation Method and 16S rRNA Hypervariable Region on Gut Microbiota Profiling. **mSystems**, v. 4, n. 1, p. 10.1128/msystems.00271-18, 26 fev. 2019.

CIMEN, C. et al. Vancomycin-resistant enterococci (VRE) in hospital settings across European borders: a scoping review comparing the epidemiology in the Netherlands and Germany. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 12, n. 1, p. 78, 12 ago. 2023.

CLOONEY, A. G. et al. Comparing Apples and Oranges?: Next Generation Sequencing and Its Impact on Microbiome Analysis. **PLOS ONE**, v. 11, n. 2, p. e0148028, 5 fev. 2016.

COLE, J. R. et al. The Ribosomal Database Project (RDP-II): sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. Database issue, p. D294-296, 1 jan. 2005.

CONNELL, I. et al. Type 1 fimbrial expression enhances Escherichia coli virulence for the urinary tract. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 18, p. 9827–9832, 3 set. 1996.

CONRADS, G.; ABDELBAR, M. M. H. Challenges of next-generation sequencing targeting anaerobes. **Anaerobe**, v. 58, p. 47–52, ago. 2019.

COSTELLO, E. K. et al. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. **Science (New York, N.Y.)**, v. 326, n. 5960, p. 1694–1697, 18 dez. 2009.

DALMOLIN, T. V. et al. Co-occurrence of mcr-1 and blaKPC-2 in a clinical isolate of Escherichia coli in Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 8, p. 2404–2406, 1 ago. 2017.

DANKO, D. et al. A global metagenomic map of urban microbiomes and antimicrobial resistance. **Cell**, v. 184, n. 13, p. 3376–3393.e17, 24 jun. 2021.

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

DAVIES, P. R.; SINGER, R. S. Antimicrobial use in wean to market pigs in the United States assessed via voluntary sharing of proprietary data. **Zoonoses and Public Health**, v. 67 Suppl 1, p. 6–21, nov. 2020.

D’COSTA, V. M. et al. Sampling the antibiotic resistome. **Science (New York, N.Y.)**, v. 311, n. 5759, p. 374–377, 20 jan. 2006.

DE OLIVEIRA, D. M. P. et al. Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 33, n. 3, p. 10.1128/cmr.00181-19, 13 maio 2020.

DEBLAIS, L. et al. Comparative Genomic Studies of Salmonella Heidelberg Isolated From Chicken- and Turkey-Associated Farm Environmental Samples. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1841, 2018.

DELGADO-BAQUERIZO, M. et al. The proportion of soil-borne pathogens increases with warming at the global scale. **Nature Climate Change**, v. 10, n. 6, p. 550–554, jun. 2020.

DENG, W. et al. Antibiotic Resistance in Salmonella from Retail Foods of Animal Origin and Its Association with Disinfectant and Heavy Metal Resistance. **Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)**, v. 24, n. 6, p. 782–791, 2018.

DESANTIS, T. Z. et al. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 7, p. 5069–5072, jul. 2006.

DIDELLOT, X. et al. Transforming clinical microbiology with bacterial genome sequencing. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, n. 9, p. 601–612, set. 2012.

DOMINGUEZ DEL ANGEL, V. et al. Ten steps to get started in Genome Assembly and Annotation. **F1000Research**, v. 7, p. ELIXIR-148, 5 fev. 2018.

DOMÍNGUEZ-BEGINES, J. et al. Soil-borne pathogens as determinants of regeneration patterns at community level in Mediterranean forests. **New Phytologist**, v. 227, n. 2, p. 588–600, 2020.

DOSTER, E. et al. MEGARes 2.0: a database for classification of antimicrobial drug, biocide and metal resistance determinants in metagenomic sequence data. **Nucleic Acids Research**, v. 48, n. D1, p. D561–D569, 8 jan. 2020.

DOUGLAS, G. M. et al. PICRUSt2 for prediction of metagenome functions. **Nature Biotechnology**, v. 38, n. 6, p. 685–688, jun. 2020.

ECKSTROM, K.; BARLOW, J. W. Resistome metagenomics from plate to farm: The resistome and microbial composition during food waste feeding and composting on a Vermont poultry farm. **PLOS ONE**, v. 14, n. 11, p. e0219807, 21 nov. 2019.

EDGAR, R. C. **UNOISE2: improved error-correction for Illumina 16S and ITS amplicon sequencing**. bioRxiv, , 15 out. 2016. Disponível em: <<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/081257v1>>. Acesso em: 1 maio. 2024

EMBRAPA. **Estatísticas - Central de Inteligência de Aves e Suínos (CIAS) - Portal Embrapa**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/estatisticas>>. Acesso em: 1 maio. 2024.

EPAGRI. **INDICADORES DE DESEMPENHO DA AGROPECUÁRIA E DO AGRONEGÓCIO DE SANTA CATARINA: 2021-2022**. , 2023. Disponível em: <[https://docweb.epagri.sc.gov.br/website\\_cepa/publicacoes/Indicadores\\_Desempenho\\_Agronegocio\\_2022.pdf](https://docweb.epagri.sc.gov.br/website_cepa/publicacoes/Indicadores_Desempenho_Agronegocio_2022.pdf)>

EREN, A. M. et al. Anvi'o: an advanced analysis and visualization platform for 'omics data. **PeerJ**, v. 3, p. e1319, 2015.

ESCOBAR-ZEPEDA, A.; LEÓN, A.; SANCHEZ-FLORES, A. The Road to Metagenomics: From Microbiology to DNA Sequencing Technologies and Bioinformatics. **Frontiers in Genetics**, v. 6, 17 dez. 2015.

ESCUDEIRO, P. et al. Antibiotic Resistance Gene Diversity and Virulence Gene Diversity Are Correlated in Human Gut and Environmental Microbiomes. **mSphere**, v. 4, n. 3, p. e00135-19, 1 maio 2019.

FERNÁNDEZ-ALARCÓN, C.; SINGER, R. S.; JOHNSON, T. J. Comparative genomics of multidrug resistance-encoding IncA/C plasmids from commensal and pathogenic *Escherichia coli* from multiple animal sources. **PloS One**, v. 6, n. 8, p. e23415, 2011.

FERREIRO, J. L. L. et al. *Pseudomonas aeruginosa* urinary tract infections in hospitalized patients: Mortality and prognostic factors. **PLOS ONE**, v. 12, n. 5, p. e0178178, 26 maio 2017.

FESSLER, A. T. et al. Mobile macrolide resistance genes in staphylococci. **Plasmid**, v. 99, p. 2–10, set. 2018.

FINSTAD, K. M. et al. Microbial Community Structure and the Persistence of Cyanobacterial Populations in Salt Crusts of the Hyperarid Atacama Desert from Genome-Resolved Metagenomics. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 28 jul. 2017.

- FIRMO, E. F. et al. Association of bla<sub>NDM-1</sub> with bla<sub>KPC-2</sub> and aminoglycoside-modifying enzyme genes among *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and *Serratia marcescens* clinical isolates in Brazil. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 21, p. 255–261, 1 jun. 2020.
- FORSBERG, K. J. et al. The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens. **Science (New York, N.Y.)**, v. 337, n. 6098, p. 1107–1111, 31 ago. 2012.
- FORSBERG, K. J. et al. Bacterial phylogeny structures soil resistomes across habitats. **Nature**, v. 509, n. 7502, p. 612–616, maio 2014.
- FRESIA, P. et al. Urban metagenomics uncover antibiotic resistance reservoirs in coastal beach and sewage waters. **Microbiome**, v. 7, n. 1, p. 35, 28 fev. 2019.
- GALPERIN, M. Y. et al. Expanded microbial genome coverage and improved protein family annotation in the COG database. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. Database issue, p. D261-269, jan. 2015.
- GARCÍA-GONZÁLEZ, M. C.; VANOTTI, M. B.; SZOGI, A. A. Recovery of ammonia from anaerobically digested manure using gas-permeable membranes. **Scientia Agricola**, v. 73, n. 5, p. 434–438, out. 2016.
- GHANBARI, F. et al. Distribution of erm genes among *Staphylococcus aureus* isolates with inducible resistance to clindamycin in Isfahan, Iran. **Advanced Biomedical Research**, v. 5, p. 62, 2016.
- GHOSH, A.; MEHTA, A.; KHAN, A. M. Metagenomic Analysis and its Applications. Em: RANGANATHAN, S. et al. (Eds.). **Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology**. Oxford: Academic Press, 2019. p. 184–193.
- GHURYE, J. S.; CEPEDA-ESPINOZA, V.; POP, M. Metagenomic Assembly: Overview, Challenges and Applications. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 89, n. 3, p. 353–362, set. 2016.
- GIBSON, M. K.; FORSBERG, K. J.; DANTAS, G. Improved annotation of antibiotic resistance determinants reveals microbial resistomes cluster by ecology. **The ISME Journal**, v. 9, n. 1, p. 207–216, 1 jan. 2015.
- GIEHL, L.; MONDARDO, M. **Produção de suínos em Santa Catarina: Uma análise da regionalização dos abates (2013-2018) – Epagri/Cepa**. EPAGRI, 9 set. 2019. Disponível em: <<https://cepa.epagri.sc.gov.br/index.php/2019/08/16/producao-de-suinos-em-santa-catarina-uma-analise-da-regionalizacao-dos-abates-2013-2018/>>. Acesso em: 1 maio. 2024
- GLÖCKNER, F. O. et al. 25 years of serving the community with ribosomal RNA gene reference databases and tools. **Journal of Biotechnology**, v. 261, p. 169–176, 10 nov. 2017.
- GOBBI, D. D. S. et al. Isolation and molecular characterization of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* from the pork production chain in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, p. 393–399, mar. 2018.
- GREIG, D. R. et al. Characterization of a P1-bacteriophage-like plasmid

(phage-plasmid) harbouring blaCTX-M-15 in *Salmonella enterica* serovar Typhi. **Microbial Genomics**, v. 8, n. 12, p. 000913, 2022.

GRICE, E. A. et al. Topographical and Temporal Diversity of the Human Skin Microbiome. **Science (New York, N.Y.)**, v. 324, n. 5931, p. 1190–1192, 29 maio 2009.

GRICE, E. A.; SEGRE, J. A. The Human Microbiome: Our Second Genome. **Annual review of genomics and human genetics**, v. 13, p. 151–170, 2012.

GUPTA, C. L. et al. Longitudinal study on the effects of growth-promoting and therapeutic antibiotics on the dynamics of chicken cloacal and litter microbiomes and resistomes. **Microbiome**, v. 9, n. 1, p. 178, 28 ago. 2021.

GUPTA, S. K. et al. ARG-ANNOT, a new bioinformatic tool to discover antibiotic resistance genes in bacterial genomes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 1, p. 212–220, 2014.

HAFT, D. H.; SELENGUT, J. D.; WHITE, O. The TIGRFAMs database of protein families. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 1, p. 371–373, 1 jan. 2003.

HAMILL, S.; NEILL, S. D.; MADDEN, R. H. A comparison of media for the isolation of *Arcobacter* spp. from retail packs of beef. **Journal of Food Protection**, v. 71, n. 4, p. 850–854, abr. 2008.

HANDELSMAN, J. et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemistry & Biology**, v. 5, n. 10, p. R245-249, out. 1998.

HARADA, L. K. et al. Biotechnological applications of bacteriophages: State of the art. **Microbiological Research**, v. 212–213, p. 38–58, 2018.

HE, K. Y.; GE, D.; HE, M. M. Big Data Analytics for Genomic Medicine. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 2, p. 412, 15 fev. 2017.

HE, T. et al. Emergence of plasmid-mediated high-level tigecycline resistance genes in animals and humans. **Nature Microbiology**, v. 4, n. 9, p. 1450–1456, set. 2019.

HERNANDO-AMADO, S. et al. Defining and combating antibiotic resistance from One Health and Global Health perspectives. **Nature Microbiology**, v. 4, n. 9, p. 1432–1442, set. 2019.

HORNER, D. S. et al. Bioinformatics approaches for genomics and post genomics applications of next-generation sequencing. **Briefings in Bioinformatics**, v. 11, n. 2, p. 181–197, mar. 2010.

HOWE, A. C. et al. Tackling soil diversity with the assembly of large, complex metagenomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 13, p. 4904–4909, abr. 2014.

HU, Y. et al. The Bacterial Mobile Resistome Transfer Network Connecting the Animal and Human Microbiomes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 22, p. 6672–6681, 15 nov. 2016.

- HUBER, H. et al. Prevalence and characteristics of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from livestock, chicken carcasses, bulk tank milk, minced meat, and contact persons. **BMC Veterinary Research**, v. 7, n. 1, p. 6, 27 jan. 2011.
- HUBKA, V. et al. Taxonomic revision of Eurotium and transfer of species to Aspergillus. **Mycologia**, v. 105, n. 4, p. 912–937, 2013.
- HUERTA-CEPAS, J. et al. eggNOG 5.0: a hierarchical, functionally and phylogenetically annotated orthology resource based on 5090 organisms and 2502 viruses. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D309–D314, 8 jan. 2019.
- HUGHES, J. B. et al. Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 10, p. 4399–4406, out. 2001.
- HUNTER, S. et al. EBI metagenomics--a new resource for the analysis and archiving of metagenomic data. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. Database issue, p. D600-606, jan. 2014.
- HUSON, D. H. et al. MEGAN analysis of metagenomic data. **Genome Research**, v. 17, n. 3, p. 377–386, mar. 2007.
- HUTTENHOWER, C. et al. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. **Nature**, v. 486, n. 7402, p. 207–214, jun. 2012.
- IBRAHIM, S. et al. Multidrug-resistant Acinetobacter baumannii as an emerging concern in hospitals. **Molecular Biology Reports**, v. 48, n. 10, p. 6987–6998, 1 out. 2021.
- JANSSON, J. K.; HOFMOCKEL, K. S. Soil microbiomes and climate change. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 1, p. 35–46, jan. 2020.
- JIANG, Y. et al. Ammonia inhibition and toxicity in anaerobic digestion: A critical review. **Journal of Water Process Engineering**, v. 32, p. 100899, 1 dez. 2019.
- JOHNSON, T. J. et al. Identification of minimal predictors of avian pathogenic Escherichia coli virulence for use as a rapid diagnostic tool. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 12, p. 3987–3996, dez. 2008.
- KANEHISA, M. et al. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D457-462, 4 jan. 2016.
- KANG, D. D. et al. MetaBAT, an efficient tool for accurately reconstructing single genomes from complex microbial communities. **PeerJ**, v. 3, p. e1165, 2015.
- KEEGAN, K. P.; GLASS, E. M.; MEYER, F. MG-RAST, a Metagenomics Service for Analysis of Microbial Community Structure and Function. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 1399, p. 207–233, 2016.
- KHAN, S. A. et al. Transfer of erythromycin resistance from poultry to human clinical strains of Staphylococcus aureus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 5, p. 1832–1838, maio 2000.

KHOSRAVI, A. D.; JENABI, A.; MONTAZERI, E. A. Distribution of genes encoding resistance to aminoglycoside modifying enzymes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. **The Kaohsiung Journal of Medical Sciences**, v. 33, n. 12, p. 587–593, 1 dez. 2017.

KNIGHT, R. et al. Best practices for analysing microbiomes. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 7, p. 410–422, jul. 2018.

KÖBERL, M. et al. Unraveling the Complexity of Soil Microbiomes in a Large-Scale Study Subjected to Different Agricultural Management in Styria. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 25 maio 2020.

KOLDE, R. **pheatmap: Pretty Heatmaps version 1.0.12 from CRAN**. Disponível em: <<https://rdrr.io/cran/pheatmap/>>. Acesso em: 1 maio. 2024.

KONOPKA, A. What is microbial community ecology? **The ISME Journal**, v. 3, n. 11, p. 1223–1230, nov. 2009.

KOROTKOV, K. V.; SANDKVIST, M.; HOL, W. G. J. The type II secretion system: biogenesis, molecular architecture and mechanism. **Nature reviews. Microbiology**, v. 10, n. 5, p. 336–351, 2 abr. 2012.

KRAUSE, K. M. et al. Aminoglycosides: An Overview. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 6, n. 6, p. a027029, jun. 2016.

KUCZYNSKI, J. et al. Experimental and analytical tools for studying the human microbiome. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, n. 1, p. 47–58, jan. 2012.

KUNZ, A.; MIELE, M.; STEINMETZ, R. L. R. Advanced swine manure treatment and utilization in Brazil. **Bioresource Technology**, OECD Workshop: Livestock Waste Treatment Systems of the Future: A Challenge to Environmental Quality, Food Safety, and Sustainability. v. 100, n. 22, p. 5485–5489, 1 nov. 2009.

LA RAGIONE, R. M.; WOODWARD, M. J. Virulence factors of Escherichia coli serotypes associated with avian colisepticaemia. **Research in Veterinary Science**, v. 73, n. 1, p. 27–35, ago. 2002.

LAHITI, LEO; SHETTY, SUDARSHAN. **Tools for microbiome analysis in R**. Disponível em: <<http://microbiome.github.com/microbiome>>. Acesso em: 2 maio. 2024.

LANGMEAD, B.; SALZBERG, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nature Methods**, v. 9, n. 4, p. 357–359, abr. 2012.

LEANTI LA ROSA, S. et al. Enterococcus faecalis Ebp pili are important for cell-cell aggregation and intraspecies gene transfer. **Microbiology**, v. 162, n. Pt 5, p. 798–802, maio 2016.

LEDERBERG, J.; MCCRAY, A. T. 'Ome Sweet 'Omics-- A Genealogical Treasury of Words. v. 15, n. 7, p. 8, 2001.

LI, D. et al. MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. **Bioinformatics**, v. 31, n. 10, p. 1674–1676, 15 maio 2015.

LI, P. et al. Analysis of Resistance to Florfenicol and the Related Mechanism of Dissemination in Different Animal-Derived Bacteria. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 369, 2020.

LIENEN, T. et al. Mammaliococcus spp. from German Dairy Farms Exhibit a Wide Range of Antimicrobial Resistance Genes and Non-Wildtype Phenotypes to Several Antibiotic Classes. **Biology**, v. 11, n. 2, p. 152, 18 jan. 2022.

LIU, B.; POP, M. ARDB--Antibiotic Resistance Genes Database. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. Database issue, p. D443-447, jan. 2009.

LIU, L. et al. Comparison of next-generation sequencing systems. **Journal of Biomedicine & Biotechnology**, v. 2012, p. 251364, 2012.

LIU, Y.-Y. et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 2, p. 161–168, 1 fev. 2016.

LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biology**, v. 15, n. 12, p. 550, 5 dez. 2014.

MACEDO, G. et al. The impact of manure and soil texture on antimicrobial resistance gene levels in farmlands and adjacent ditches. **Science of The Total Environment**, v. 737, p. 139563, 1 out. 2020.

MAK, P. H. W. et al. Production systems and important antimicrobial resistant-pathogenic bacteria in poultry: a review. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 148, 14 dez. 2022.

MANDAL, S. et al. Analysis of composition of microbiomes: a novel method for studying microbial composition. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 26, p. 27663, 2015.

MAPA. **Atualização sobre Uso Racional de Antimicrobianos e Boas Práticas de Produção**. Disponível em:

<[https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/resistencia-aos-antimicrobianos/publicacoes/Apostila\\_AtualizaosobreUsoRacionaldeAntimicrobianoseBoasPraticasdeProduo.pdf](https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/resistencia-aos-antimicrobianos/publicacoes/Apostila_AtualizaosobreUsoRacionaldeAntimicrobianoseBoasPraticasdeProduo.pdf)>. Acesso em: 14 ago. 2024.

MARCHESI, J. R.; RAVEL, J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. **Microbiome**, v. 3, n. 1, p. 31, 30 jul. 2015.

MARTIN, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. **EMBnet.journal**, v. 17, n. 1, p. 10–12, 2 maio 2011.

MAUS, I. et al. Complete Genome Sequence of the Hydrogenotrophic, Methanogenic Archaeon *Methanoculleus bourgensis* Strain MS2T, Isolated from a Sewage Sludge Digester. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 19, p. 5487–5488, 10 set. 2012.

MCCARTHY, D. J.; CHEN, Y.; SMYTH, G. K. Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 10, p. 4288–4297, maio 2012.

- MCMURDIE, P. J.; HOLMES, S. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. **PLOS ONE**, v. 8, n. 4, p. e61217, 22 abr. 2013.
- MELVILLE, S.; CRAIG, L. Type IV Pili in Gram-Positive Bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR**, v. 77, n. 3, p. 323–341, set. 2013.
- MENZEL, P.; NG, K. L.; KROGH, A. Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju. **Nature Communications**, v. 7, n. 1, p. 11257, 13 abr. 2016.
- METZKER, M. L. Sequencing technologies — the next generation. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 1, p. 31–46, jan. 2010.
- MIKHEENKO, A.; SAVELIEV, V.; GUREVICH, A. MetaQUAST: evaluation of metagenome assemblies. **Bioinformatics**, v. 32, n. 7, p. 1088–1090, 1 abr. 2016.
- MILLER, W. R.; ARIAS, C. A. ESKAPE pathogens: antimicrobial resistance, epidemiology, clinical impact and therapeutics. **Nature Reviews Microbiology**, p. 1–19, 3 jun. 2024.
- MISTRY, J. et al. Challenges in homology search: HMMER3 and convergent evolution of coiled-coil regions. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 12, p. e121, jul. 2013.
- MISTRY, J. et al. Pfam: The protein families database in 2021. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. D1, p. D412–D419, 8 jan. 2021.
- MONIER, J.-M. et al. Metagenomic exploration of antibiotic resistance in soil. **Current Opinion in Microbiology**, v. 14, n. 3, p. 229–235, jun. 2011.
- MONTE, D. F. et al. Genomic Features of High-Priority Salmonella enterica Serovars Circulating in the Food Production Chain, Brazil, 2000–2016. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 11058, 30 jul. 2019.
- MORAES, P. O. et al. Comparison between a commercial blend of functional oils and monensin on the performance and microbiota of coccidiosis-challenged broilers. **Poultry Science**, v. 98, n. 11, p. 5456–5464, 1 nov. 2019.
- MORAN, M. A. The global ocean microbiome. **Science**, v. 350, n. 6266, p. aac8455, 11 dez. 2015.
- MORGAN, X. C.; HUTTENHOWER, C. Chapter 12: Human Microbiome Analysis. **PLOS Computational Biology**, v. 8, n. 12, p. e1002808, 27 dez. 2012.
- MOROZOVA, O.; MARRA, M. A. Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. **Genomics**, v. 92, n. 5, p. 255–264, nov. 2008.
- MUNCK, C. et al. Limited dissemination of the wastewater treatment plant core resistome. **Nature Communications**, v. 6, n. 1, p. 8452, 30 set. 2015.
- MUSTAFA, G. R. et al. Heavy Metal Resistance in Salmonella Typhimurium and Its Association With Disinfectant and Antibiotic Resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 4 ago. 2021.

- NAYFACH, S. et al. Automated and Accurate Estimation of Gene Family Abundance from Shotgun Metagenomes. **PLOS Computational Biology**, v. 11, n. 11, p. e1004573, 13 nov. 2015.
- NAYME, K. et al. Occurrence of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes in *Escherichia coli* isolates from chicken meat. **British Poultry Science**, v. 60, n. 6, p. 798–801, dez. 2019.
- NEARING, J. T. et al. Denoising the Denoisers: an independent evaluation of microbiome sequence error-correction approaches. **PeerJ**, v. 6, p. e5364, 8 ago. 2018.
- NESME, J.; SIMONET, P. The soil resistome: a critical review on antibiotic resistance origins, ecology and dissemination potential in telluric bacteria. **Environmental Microbiology**, v. 17, n. 4, p. 913–930, abr. 2015.
- NIEWOLD, T. A. The nonantibiotic anti-inflammatory effect of antimicrobial growth promoters, the real mode of action? A hypothesis. **Poultry Science**, v. 86, n. 4, p. 605–609, abr. 2007.
- NOGUEIRA, T. et al. Horizontal Gene Transfer of the Secretome Drives the Evolution of Bacterial Cooperation and Virulence. **Current Biology**, v. 19, n. 20, p. 1683–1691, 3 nov. 2009.
- NOGUEIRA, T.; TOUCHON, M.; ROCHA, E. P. C. Rapid Evolution of the Sequences and Gene Repertoires of Secreted Proteins in Bacteria. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, p. e49403, 26 nov. 2012.
- NOLAN, K. A.; CALLAHAN, J. E. Beachcomber Biology: The Shannon-Weiner Species Diversity Index. v. 27, p. 334–338, 2006.
- NOLAN, L. K. et al. Colibacillosis. Em: **Diseases of Poultry**. [s.l.] John Wiley & Sons, Ltd, 2020. p. 770–830.
- NURK, S. et al. metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler. **Genome Research**, v. 27, n. 5, p. 824–834, maio 2017.
- OKSANEN, J. et al. **vegan: Community Ecology Package**. , 11 out. 2022. Disponível em: <<https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/index.html>>. Acesso em: 1 maio. 2024
- OLADEINDE, A. et al. Horizontal Gene Transfer and Acquired Antibiotic Resistance in *Salmonella enterica* Serovar Heidelberg following In Vitro Incubation in Broiler Ceca. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 85, n. 22, p. e01903-19, 30 out. 2019.
- O'LEARY, N. A. et al. Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D733-745, 4 jan. 2016.
- O'NEILL, JIM. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations the review on Antimicrobial Resistance chaired by Jim O'neill. 2016.

OTSUKA, Y. Potent Antibiotics Active against Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 68, n. 3, p. 182–190, 2020.

OVI, F. et al. A compilation of virulence-associated genes that are frequently reported in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) compared to other *E. coli*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 134, n. 3, p. lxad014, 1 mar. 2023.

PACE, N. R. et al. The Analysis of Natural Microbial Populations by Ribosomal RNA Sequences. Em: MARSHALL, K. C. (Ed.). **Advances in Microbial Ecology**. Boston, MA: Springer US, 1986. p. 1–55.

PAL, C. et al. The structure and diversity of human, animal and environmental resistomes. **Microbiome**, v. 4, n. 1, p. 54, 7 out. 2016.

PARKS, D. H. et al. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. **Genome Research**, v. 25, n. 7, p. 1043–1055, jul. 2015.

PARKS, D. H. et al. GTDB: an ongoing census of bacterial and archaeal diversity through a phylogenetically consistent, rank normalized and complete genome-based taxonomy. **Nucleic Acids Research**, v. 50, n. D1, p. D785–D794, 7 jan. 2022.

PAULSON, J. N. et al. Differential abundance analysis for microbial marker-gene surveys. **Nature Methods**, v. 10, n. 12, p. 1200–1202, dez. 2013.

PEDERSEN, T. L. **Patchwork: The Composer of Plots The Composer of Plots**. Disponível em: <<https://patchwork.data-imaginist.com/>>. Acesso em: 1 maio. 2024.

PELLOW, D.; MIZRAHI, I.; SHAMIR, R. PlasClass improves plasmid sequence classification. **PLOS Computational Biology**, v. 16, n. 4, p. e1007781, 3 abr. 2020.

PENG, Z. et al. Utilizing Metagenomic Data and Bioinformatic Tools for Elucidating Antibiotic Resistance Genes in Environment. **Frontiers in Environmental Science**, v. 9, 29 out. 2021.

PERRON, G. G. et al. Functional Characterization of Bacteria Isolated from Ancient Arctic Soil Exposes Diverse Resistance Mechanisms to Modern Antibiotics. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. e0069533, 25 mar. 2015.

PETERSEN, T. N. et al. Meta-genomic analysis of toilet waste from long distance flights; a step towards global surveillance of infectious diseases and antimicrobial resistance. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 11444, 10 jul. 2015.

PETERSON, D. et al. Comparative Analysis of 16S rRNA Gene and Metagenome Sequencing in Pediatric Gut Microbiomes. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 670336, 2021.

PFEIFER, E.; BONNIN, R. A.; ROCHA, E. P. C. Phage-Plasmids Spread Antibiotic Resistance Genes through Infection and Lysogenic Conversion. **mBio**, v. 13, n. 5, p. e01851-22, 26 set. 2022.

PFEIFER, E.; ROCHA, E. P. C. Phage-plasmids promote recombination and emergence of phages and plasmids. **Nature Communications**, v. 15, n. 1, p. 1545, 20 fev. 2024.

- POIREL, L. et al. Antimicrobial Resistance in Escherichia coli. **Microbiology Spectrum**, v. 6, n. 4, jul. 2018.
- POP, M. Genome assembly reborn: recent computational challenges. **Briefings in Bioinformatics**, v. 10, n. 4, p. 354–366, jul. 2009.
- QIAN, X. et al. Diversity, abundance, and persistence of antibiotic resistance genes in various types of animal manure following industrial composting. **Journal of Hazardous Materials**, v. 344, p. 716–722, 15 fev. 2018.
- QIU, T. et al. Metagenomic assembly reveals hosts and mobility of common antibiotic resistome in animal manure and commercial compost. **Environmental Microbiome**, v. 17, n. 1, p. 42, 11 ago. 2022.
- QUINCE, C. et al. Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. **Nature Biotechnology**, v. 35, n. 9, p. 833–844, set. 2017.
- RAPP, J. Z.; SULLIVAN, M. B.; DEMING, J. W. Divergent Genomic Adaptations in the Microbiomes of Arctic Subzero Sea-Ice and Cryopeg Brines. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 22 jul. 2021.
- RARO, O. H. F. et al. Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* From Transplanted Patients in Brazil: Phylogeny, Resistome, Virulome and Mobile Genetic Elements Harboring blaKPC–2 or blaNDM–1. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 15 jul. 2020.
- RAVEL, J. et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108 Suppl 1, n. Suppl 1, p. 4680–4687, 15 mar. 2011.
- REN, J. et al. Identifying viruses from metagenomic data using deep learning. **Quantitative Biology**, v. 8, n. 1, p. 64–77, 2020.
- RHO, M.; TANG, H.; YE, Y. FragGeneScan: predicting genes in short and error-prone reads. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. 20, p. e191, nov. 2010.
- RIVAS, L.; FEGAN, N.; VANDERLINDE, P. Isolation and characterisation of *Arcobacter butzleri* from meat. **International Journal of Food Microbiology**, v. 91, n. 1, p. 31–41, 15 fev. 2004.
- ROBERT, V. et al. MycoBank gearing up for new horizons. **IMA Fungus**, v. 4, n. 2, p. 371–379, dez. 2013.
- ROBINSON, M. D.; MCCARTHY, D. J.; SMYTH, G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 26, n. 1, p. 139–140, 1 jan. 2010.
- ROGOVSKI, P. et al. Salmonella enterica Serovar Enteritidis Control in Poultry Litter Mediated by Lytic Bacteriophage Isolated from Swine Manure. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 16, p. 8862, 23 ago. 2021.
- ROWE, W. et al. Search Engine for Antimicrobial Resistance: A Cloud Compatible Pipeline and Web Interface for Rapidly Detecting Antimicrobial Resistance Genes Directly from Sequence Data. **PLOS ONE**, v. 10, n. 7, p. e0133492, 21 jul. 2015.

RUSCH, D. B. et al. The Sorcerer II Global Ocean Sampling Expedition: Northwest Atlantic through Eastern Tropical Pacific. **PLOS Biology**, v. 5, n. 3, p. e77, 13 mar. 2007.

SALMAN, V. et al. Multiple self-splicing introns in the 16S rRNA genes of giant sulfur bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 11, p. 4203–4208, 13 mar. 2012.

SAMBAZA, S. S.; NAICKER, N. Contribution of wastewater to antimicrobial resistance: A review article. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 34, p. 23–29, 1 set. 2023.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 12, p. 5463–5467, dez. 1977.

SARAIVA, M. DE M. S. et al. Staphylococcus sciuri as a Reservoir of mecA to Staphylococcus aureus in Non-Migratory Seabirds from a Remote Oceanic Island. **Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)**, v. 27, n. 4, p. 553–561, abr. 2021.

SCHOCH, C. L. et al. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. **Database: The Journal of Biological Databases and Curation**, v. 2020, p. baaa062, 1 jan. 2020.

SCHWARZ, S. et al. Mobile Oxazolidinone Resistance Genes in Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 34, n. 3, p. e0018820, 16 jun. 2021.

SCZYRBA, A. et al. Critical Assessment of Metagenome Interpretation—a benchmark of metagenomics software. **Nature Methods**, v. 14, n. 11, p. 1063–1071, nov. 2017.

SEEMANN, T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 30, n. 14, p. 2068–2069, 15 jul. 2014.

SEEMANN, T. **tseemann/abricate**. , 12 abr. 2024. Disponível em: <<https://github.com/tseemann/abricate>>. Acesso em: 13 abr. 2024

SEGATA, N. et al. PhyloPhlAn is a new method for improved phylogenetic and taxonomic placement of microbes. **Nature Communications**, v. 4, n. 1, p. 2304, 14 ago. 2013.

SHAIBER, A.; EREN, A. M. Composite Metagenome-Assembled Genomes Reduce the Quality of Public Genome Repositories. **mBio**, v. 10, n. 3, p. 10.1128/mbio.00725-19, 4 jun. 2019.

SHANNON, C. E. A Mathematical Theory of Communication. v. 27, p. 379–423, 1948.

SHARIFI, F.; YE, Y. From Gene Annotation to Function Prediction for Metagenomics. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 1611, p. 27–34, 2017.

SIEBER, C. M. K. et al. Recovery of genomes from metagenomes via a dereplication, aggregation and scoring strategy. **Nature Microbiology**, v. 3, n. 7, p.

836–843, jul. 2018.

SILVER, L. L. **Challenges of Antibacterial Discovery | Clinical Microbiology Reviews**. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/cmr.00030-10>>. Acesso em: 12 ago. 2024.

SIMPSON, E. H. Measurement of Diversity. **Nature**, v. 163, n. 4148, p. 688–688, abr. 1949.

SINGER, R. S. et al. Estimates of on-farm antimicrobial usage in broiler chicken production in the United States, 2013–2017. **Zoonoses and Public Health**, v. 67 Suppl 1, p. 22–35, nov. 2020.

SOMMER, M. O. A.; CHURCH, G. M.; DANTAS, G. The human microbiome harbors a diverse reservoir of antibiotic resistance genes. **Virulence**, v. 1, n. 4, p. 299–303, 2010.

SOUZA, D. S. M. et al. Hepatitis E Virus in Manure and Its Removal by Psychrophilic anaerobic Biodigestion in Intensive Production Farms, Santa Catarina, Brazil, 2018–2019. **Microorganisms**, v. 8, n. 12, p. 2045, dez. 2020.

SUN, J. et al. Plasmid-encoded tet(X) genes that confer high-level tigecycline resistance in Escherichia coli. **Nature Microbiology**, v. 4, n. 9, p. 1457–1464, set. 2019.

SURETTE, M. D.; WRIGHT, G. D. Lessons from the Environmental Antibiotic Resistome. **Annual Review of Microbiology**, v. 71, p. 309–329, 8 set. 2017.

SVARA, F.; RANKIN, D. J. The evolution of plasmid-carried antibiotic resistance. **BMC Evolutionary Biology**, v. 11, p. 130, 19 maio 2011.

TANG, X.; XIAO, Y.; ZHOU, J.-M. Regulation of the type III secretion system in phytopathogenic bacteria. **Molecular plant-microbe interactions: MPMI**, v. 19, n. 11, p. 1159–1166, nov. 2006.

TANG, Z.-Z.; CHEN, G.; ALEKSEYENKO, A. V. PERMANOVA-S: association test for microbial community composition that accommodates confounders and multiple distances. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 32, n. 17, p. 2618–2625, 1 set. 2016.

TÁPPARO, D. C. et al. Nutritional, Energy and Sanitary Aspects of Swine Manure and Carcass Co-digestion. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, 29 abr. 2020.

TAVARES, L. S. et al. Strategies and molecular tools to fight antimicrobial resistance: resistome, transcriptome, and antimicrobial peptides. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 412, 31 dez. 2013.

THOMAS, T.; GILBERT, J.; MEYER, F. Metagenomics - a guide from sampling to data analysis. **Microbial Informatics and Experimentation**, v. 2, p. 3, 9 fev. 2012.

THOMPSON, C. C. et al. Diversity of Microbiomes Across a 13,000-Year-Old Amazon Sediment. **Microbial Ecology**, v. 86, n. 3, p. 2202–2209, 1 out. 2023.

TREMBLAY, J. et al. Primer and platform effects on 16S rRNA tag sequencing. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 4 ago. 2015.

TRIVEDI, P. et al. Plant–microbiome interactions: from community assembly to plant health. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 11, p. 607–621, nov. 2020.

TSAFNAT, G.; COPTY, J.; PARTRIDGE, S. R. RAC: Repository of Antibiotic resistance Cassettes. **Database: The Journal of Biological Databases and Curation**, v. 2011, p. bar054, 2011.

VALERIS-CHACIN, R. et al. Association of Broiler Litter Microbiome Composition and *Campylobacter* Isolation. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, p. 654927, 2021.

VAN DUIJKEREN, E. et al. The use of aminoglycosides in animals within the EU: development of resistance in animals and possible impact on human and animal health: a review. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 74, n. 9, p. 2480–2496, 1 set. 2019.

VIANCELLI, A. et al. Performance of two swine manure treatment systems on chemical composition and on the reduction of pathogens. **Chemosphere**, v. 90, n. 4, p. 1539–1544, jan. 2013.

VIEIRA, A. M. et al. Modulation of the intestinal microbiota of broilers supplemented with monensin or functional oils in response to challenge by *Eimeria* spp. **PLOS ONE**, v. 15, n. 8, p. e0237118, 7 ago. 2020.

VIEIRA, A. M. et al. Effect of functional oils or probiotics on performance and microbiota profile of newly weaned piglets. **Scientific Reports**, v. 11, p. 19457, 30 set. 2021.

WANG, H. et al. Distribution of *erm* genes among MRSA isolates with resistance to clindamycin in a Chinese teaching hospital. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 96, p. 105127, 1 dez. 2021.

WEISS, S. et al. Normalization and microbial differential abundance strategies depend upon data characteristics. **Microbiome**, v. 5, n. 1, p. 27, 3 mar. 2017.

WEMHEUER, F. et al. Tax4Fun2: prediction of habitat-specific functional profiles and functional redundancy based on 16S rRNA gene sequences. **Environmental Microbiome**, v. 15, n. 1, p. 11, 18 maio 2020.

WICKHAM, H. **ggplot2: Elegant Graphics for data Analysis**. [s.l.: s.n.].

WICKHAM, H. et al. Welcome to the Tidyverse. **Journal of Open Source Software**, v. 4, n. 43, p. 1686, 21 nov. 2019.

WOESE, C. R.; FOX, G. E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 11, p. 5088–5090, nov. 1977.

WOOD, D. E.; LU, J.; LANGMEAD, B. Improved metagenomic analysis with Kraken 2. **Genome Biology**, v. 20, n. 1, p. 257, 28 nov. 2019.

WRIGHT, G. D. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity.

**Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 3, p. 175–186, mar. 2007.

WU, Y.-W.; SIMMONS, B. A.; SINGER, S. W. MaxBin 2.0: an automated binning algorithm to recover genomes from multiple metagenomic datasets. **Bioinformatics**, v. 32, n. 4, p. 605–607, 1 fev. 2016.

XIAO, L. et al. A reference gene catalogue of the pig gut microbiome. **Nature Microbiology**, v. 1, n. 12, p. 1–6, 19 set. 2016.

YANG, Q. et al. Molecular characterization of antibiotic resistance in cultivable multidrug-resistant bacteria from livestock manure. **Environmental Pollution**, v. 229, p. 188–198, 1 out. 2017.

YANG, S. et al. Presence of heavy metal resistance genes in *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates and analysis of resistance gene structure in *E. coli* E308. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 21, p. 420–426, jun. 2020.

YI, G. F. et al. Impact of glutamine and Oasis hatchling supplement on growth performance, small intestinal morphology, and immune response of broilers vaccinated and challenged with *Eimeria maxima*. **Poultry Science**, v. 84, n. 2, p. 283–293, fev. 2005.

YUAN, W. et al. Distribution of antibiotic resistance genes from human and animal origins to their receiving environments: A regional scale survey of urban settings. **Environmental Pollution**, v. 293, p. 118512, 15 jan. 2022.

ZHANG, L. et al. Effects of selection pressure and genetic association on the relationship between antibiotic resistance and virulence in *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 11, p. 6733–6740, nov. 2015.

ZHANG, Y.; AGIDI, S.; LEJEUNE, J. T. Diversity of staphylococcal cassette chromosome in coagulase-negative staphylococci from animal sources. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, n. 4, p. 1375–1383, 1 out. 2009.

ZHAO, L.; DONG, Y. H.; WANG, H. Residues of veterinary antibiotics in manures from feedlot livestock in eight provinces of China. **The Science of the Total Environment**, v. 408, n. 5, p. 1069–1075, 1 fev. 2010.

ZHOU, Z. et al. METABOLIC: high-throughput profiling of microbial genomes for functional traits, metabolism, biogeochemistry, and community-scale functional networks. **Microbiome**, v. 10, n. 1, p. 33, 16 fev. 2022.

ZHU, W.; LOMSADZE, A.; BORODOVSKY, M. Ab initio gene identification in metagenomic sequences. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. 12, p. e132, jul. 2010.

ZHUANG, M. et al. Distribution of antibiotic resistance genes in the environment. **Environmental Pollution**, v. 285, p. 117402, 15 set. 2021.

## APÊNDICE A – Publicações com análise de dados de microbiota

Durante o meu doutorado, foi estabelecida uma parceria com a Profa. Dra. Priscila de Oliveira Moraes, na qual foram analisados quatro conjuntos de dados de microbiota (16S rRNA), resultando na publicação de três artigos. Estes artigos são apresentados a seguir.

**Apêndice A1** - Vieira et al., 2020. Modulation of the intestinal microbiota of broilers supplemented with monensin or functional oils in response to challenge by *Eimeria* spp.

DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237118>

# PLOS ONE

 OPEN ACCESS  PEER-REVIEWED

RESEARCH ARTICLE

## Modulation of the intestinal microbiota of broilers supplemented with monensin or functional oils in response to challenge by *Eimeria* spp.

Alexandre Maciel Vieira , Tatiany Aparecida Teixeira Soratto , Kátia Maria Cardinal , Glauber Wagner ,  
Lucélia Hauptli , André Luis Ferreira Lima , Fabiano Dahlke , Diego Peres Netto , Priscila de Oliveira Moraes  ,  
Andréa Machado Leal Ribeiro 

Published: August 7, 2020 • <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237118>

**Apêndice A2** - Vieira et al., 2021. Effect of functional oils or probiotics on performance and microbiota profile of newly weaned piglets.

DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-98549-w>

## scientific reports

[Explore content](#) ▾ [About the journal](#) ▾ [Publish with us](#) ▾

[nature](#) > [scientific reports](#) > [articles](#) > [article](#)

Article | [Open access](#) | Published: 30 September 2021

### Effect of functional oils or probiotics on performance and microbiota profile of newly weaned piglets

[Alexandre Maciel Vieira](#), [Amanda Pires Sessin](#), [Tatiany Aparecida Teixeira Soratto](#), [Paula Gabriela da Silva Pires](#), [Kátia Maria Cardinal](#), [Glauber Wagner](#), [Lucélia Hauptli](#), [André Luis Ferreira Lima](#), [Fabiano Dahlke](#), [Diego Peres Netto](#) & [Priscila de Oliveira Moraes](#) 

*Scientific Reports* **11**, Article number: 19457 (2021) | [Cite this article](#)

2107 Accesses | 6 Citations | 1 Altmetric | [Metrics](#)

**Apêndice A3** - Pires et al., 2022. Comparison of functional-oil blend and anticoccidial antibiotics effects on performance and microbiota of broiler chickens challenged by coccidiosis.

DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0270350>

# PLOS ONE

 OPEN ACCESS  PEER-REVIEWED

RESEARCH ARTICLE

## Comparison of functional-oil blend and anticoccidial antibiotics effects on performance and microbiota of broiler chickens challenged by coccidiosis

[Paula Gabriela da Silva Pires](#) , [Pedro Torres](#) , [Tatiany Aparecida Teixeira Soratto](#) , [Vilmar Benetti Filho](#) , [Lucélia Hauptli](#) , [Glauber Wagner](#) , [Douglas Haese](#) , [Carolina D'ávila Pozzatti](#) , [Priscila de Oliveira Moraes](#)  

Published: July 6, 2022 • <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0270350>

## APÊNDICE B – Produções resultantes do doutorado sanduíche no Instituto Karolinska

Durante o estágio doutoral sanduíche realizado no Instituto Karolinska (Estocolmo, Suécia), entre novembro de 2019 e dezembro de 2020, como parte do Programa Institucional de Internacionalização da CAPES (CAPES PrInt) e do Programa Joint Brazilian-Swedish Research Collaboration (STINT), foram produzidos trabalhos sob a orientação do Professor Björn Andersson. Ele lidera um grupo de pesquisa renomado em genômica comparativa sobre a biologia de protozoários e metagenoma de vírus. Durante este período, o foco esteve no aprimoramento profissional em Bioinformática, especialmente em análises de dados genômicos e metagenômicos, bem como no estabelecimento de parcerias entre os laboratórios brasileiro e sueco. Os artigos resultantes dessas atividades são apresentados a seguir.

**Apêndice B1** - Soratto et al., 2020. Four SARS-CoV-2 Genome Sequences from Late April in Stockholm, Sweden, Reveal a Rare Mutation in the Spike Protein.

DOI: <https://doi.org/10.1128/mra.00934-20>



GENOME SEQUENCES

August 2020 Volume 9 Issue 35 10.1128/mra.00934-20  
<https://doi.org/10.1128/mra.00934-20>

### Four SARS-CoV-2 Genome Sequences from Late April in Stockholm, Sweden, Reveal a Rare Mutation in the Spike Protein

Tatiany Aparecida Teixeira Soratto <sup>a,b</sup>, Hamid Darban<sup>a</sup>, Annelie Bjerkner<sup>c</sup>, Maarten Coorens<sup>d</sup>, Jan Albert<sup>c,d</sup>, Tobias Allander<sup>c,d</sup>, Björn Andersson<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Cell and Molecular Biology, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

<sup>b</sup>Department of Microbiology, Immunology, and Parasitology, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

<sup>c</sup>Department of Microbiology, Tumor and Cell Biology, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

<sup>d</sup>Department of Clinical Microbiology, Karolinska University Hospital, Stockholm, Sweden

**Apêndice B2** - Sillanpää et al., 2021. Skin Microbiota and Clinical Associations in Netherton Syndrome.

DOI: [10.1016/j.xjidi.2021.100008](https://doi.org/10.1016/j.xjidi.2021.100008)



[JID Innov.](#) 2021 Jun; 1(2): 100008.

PMCID: PMC8659401

Published online 2021 Mar 5. doi: [10.1016/j.xjidi.2021.100008](https://doi.org/10.1016/j.xjidi.2021.100008)

PMID: [34909712](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34909712/)

### Skin Microbiota and Clinical Associations in Netherton Syndrome

[Veera Sillanpää](#),<sup>1,\*</sup> [Tatiany Aparecida Teixeira Soratto](#),<sup>2,3</sup> [Elina Eränkö](#),<sup>1</sup> [Mauricio Barrientos-Somarribas](#),<sup>2</sup> [Katariina Hannula-Jouppi](#),<sup>1,4</sup> [Björn Andersson](#),<sup>2,5</sup> and [Annamari Ranki](#)<sup>1,5</sup>

► [Author information](#) ► [Article notes](#) ► [Copyright and License information](#) ► [PMC Disclaimer](#)

**Apêndice B3** - Leijonhufvud et al., 2021. Better detection of Torque teno virus in children with leukemia by metagenomic sequencing than by quantitative PCR.

DOI: <https://doi.org/10.1002/jmv.27409>



RESEARCH ARTICLE | [Open Access](#) | CC BY-NC-ND 4.0

### Better detection of Torque teno virus in children with leukemia by metagenomic sequencing than by quantitative PCR

Gustaf Leijonhufvud, Amanj Bajalan, Tatiany Aparecida Teixeira Soratto, Britt Gustafsson, Gordana Bogdanovic, Annelie Bjerckner, Tobias Allander, Gustaf Ljungman, Björn Andersson

First published: 21 October 2021 | <https://doi.org/10.1002/jmv.27409> | Citations: 7

**Apêndice B4** - Artigo submetido para publicação na revista *Pediatrics*. Título: Viruses in the serum of children with newly diagnosed cancer.

*Viruses in the serum of children with newly diagnosed cancer*

Gustaf Leijonhufvud<sup>1,2</sup>, Tatiany Aparecida Teixeira Soratto<sup>3,4</sup>, Gabriel Machado Matos<sup>3</sup>, Amanj Bajalan<sup>7</sup>, Annelie Bjerkner<sup>6</sup>, Claudia Eichler-Jonsson<sup>6</sup>, Britt Gustafsson<sup>2,5</sup>, Gordana Bogdanovic<sup>6</sup>, Tobias Allander<sup>6,7</sup>, Gustaf Ljungman<sup>1,2,\*</sup>, Björn Andersson<sup>3,\*</sup>

<sup>1</sup>*Department of Women's and Children's Health, Uppsala University, SE-75237 Uppsala, Sweden.*

<sup>2</sup>*Department of Pediatric Hematology/Oncology, Children's University Hospital, Se-75185 Uppsala Sweden.*

<sup>3</sup>*Department of Cell and Molecular Biology, Karolinska Institutet, SE-171 77 Stockholm, Sweden.*

<sup>4</sup>*Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil.*

<sup>5</sup>*Department of Clinical Science, Intervention and Technology, CLINTEC, Karolinska Institutet, S-141 86 Stockholm, Sweden.*

<sup>6</sup>*Department of Clinical Microbiology, Karolinska University Hospital, SE-171 76 Stockholm, Sweden.*

<sup>7</sup>*Department of Microbiology, Tumor and Cell Biology, Karolinska Institutet, SE-171 77 Stockholm, Sweden.*

*\*Shared last authorship*

## APÊNDICE C – Outras produções colaborativas no âmbito do Laboratório de Bioinformática

**Apêndice C1** - Padilha et al., 2022. Emergence of Two Distinct SARS-CoV-2 Gamma Variants and the Rapid Spread of P.1-like-II SARS-CoV-2 during the Second Wave of COVID-19 in Santa Catarina, Southern Brazil.

DOI: <https://doi.org/10.3390/v14040695>



Article

### Emergence of Two Distinct SARS-CoV-2 Gamma Variants and the Rapid Spread of P.1-like-II SARS-CoV-2 during the Second Wave of COVID-19 in Santa Catarina, Southern Brazil

Dayane Azevedo Padilha <sup>1</sup>, Vilmar Benetti Filho <sup>1</sup>, Renato Simões Moreira <sup>2</sup>, Tatiany Aparecida Teixeira Soratto <sup>1</sup>, Guilherme Augusto Maia <sup>1</sup>, Ana Paula Christoff <sup>3</sup>, Fernando Hartmann Barazzetti <sup>1</sup>, Marcos André Schörner <sup>1</sup>, Fernanda Luiza Ferrari <sup>1</sup>, Carolina Leite Martins <sup>1</sup>, Eric Kazuo Kawagoe <sup>1</sup>, Julia Kinetz Wachter <sup>1</sup>, Paula Sachet <sup>4</sup>, Antuani Rafael Baptistella <sup>5</sup>, Aline Daiane Schlindwein <sup>6</sup>, Bruna Kellet Coelho <sup>7</sup>, Sandra Bianchini Fernandes <sup>7</sup>, Darcita Buerger Rovaris <sup>7</sup>, Marlei Pickler Debiassi dos Anjos <sup>7</sup>, Fernanda Rosene Melo <sup>8</sup>, Bianca Bittencourt <sup>8</sup>, Sthefani Cunha <sup>9</sup>, Karine Lena Meneghetti <sup>9</sup>, Nestor Wendt <sup>1</sup>, Tâmelá Zamboni Madaloz <sup>1</sup>, Marcus Vinícius Duarte Rodrigues <sup>1</sup>, Doris Sobral Marques Souza <sup>1</sup>, Milene Höehr de Moraes <sup>3</sup>, Rodrigo de Paula Baptista <sup>10</sup>, Guilherme Toledo-Silva <sup>1</sup>, Guilherme Razzera <sup>1</sup>, Edmundo Carlos Grisard <sup>1</sup>, Patrícia Hermes Stoco <sup>1</sup>, Luiz Felipe Valter de Oliveira <sup>3</sup>, Maria Luiza Bazzo <sup>1</sup>, Gislaïne Fongaro <sup>1,\*†</sup> and Glauber Wagner <sup>1,\*†</sup>

**Apêndice C2** - Maia et al., 2022. AnnotaPipeline: An integrated tool to annotate eukaryotic proteins using multi-omics data.

DOI: [10.3389/fgene.2022.1020100](https://doi.org/10.3389/fgene.2022.1020100)

BRIEF RESEARCH REPORT article

Front. Genet., 21 November 2022  
Sec. Computational Genomics  
Volume 13 - 2022 | <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.1020100>

This article is part of the Research Topic  
Insights in Computational Genomics: 2022  
[View all 14 articles >](#)

## AnnotaPipeline: An integrated tool to annotate eukaryotic proteins using multi-omics data

 Guilherme Augusto Maia<sup>1</sup>  Vilmar Benetti Filho<sup>1</sup>  Eric Kazuo Kawagoe<sup>1</sup>

 Tatiany Aparecida Teixeira Soratto<sup>1</sup>  Renato Simões Moreira<sup>1,2</sup>  Edmundo Carlos Grisard<sup>1,3</sup>

 Glauber Wagner<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Bioinformática, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Campus João David Ferreira Lima, Florianópolis, Brazil  
<sup>2</sup> Instituto Federal de Santa Catarina (IFSC), Campus Lages, Lages, Brazil  
<sup>3</sup> Laboratório de Protozoologia, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Campus João David Ferreira Lima, Florianópolis, Brazil

**Apêndice C3** - Moreira et al., 2023. FastProtein – An automated software for *in silico* proteomic analysis.

DOI: [10.1101/2023.12.19.572382](https://doi.org/10.1101/2023.12.19.572382)



**bioRxiv**  
THE PREPRINT SERVER FOR BIOLOGY

HOME

New Results

 [Follow this preprint](#)

### FastProtein – An automated software for *in silico* proteomic analysis

 Renato Simões Moreira,  Vilmar Benetti Filho,  Guilherme Augusto Maia,  
 Tatiany Aparecida Teixeira Soratto,  Eric Kazuo Kawagoe,  Bruna Caroline Russi,  
 Luiz Claudio Miletto,  Glauber Wagner

doi: <https://doi.org/10.1101/2023.12.19.572382>

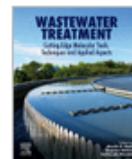
This article is a preprint and has not been certified by peer review [what does this mean?].

**Apêndice C4** - Tápparo et al., 2021. Chapter 12 - Wastewater Treatment for Bioenergy Purposes Using a Metaproteomic Approach.

DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821881-5.00012-X>



**Wastewater Treatment**  
Cutting Edge Molecular Tools, Techniques and Applied Aspects  
2021, Pages 253-278



---

## Chapter 12 - Wastewater Treatment for Bioenergy Purposes Using a Metaproteomic Approach

[Deisi Cristina Tápparo](#)<sup>1</sup>, [David Rodríguez-Lázaro](#)<sup>2</sup>, [Marta Hernández](#)<sup>2</sup>, [Aline Frumi Camargo](#)<sup>3</sup>,  
[Charline Bonatto](#)<sup>3 4</sup>, [Guilherme Maia](#)<sup>5</sup>, [Paula Rogoviski](#)<sup>6</sup>, [Rafael Dorighello Dadamuro](#)<sup>6</sup>,  
[Tatiany Aparecida Teixeira Soratto](#)<sup>5</sup>, [Thamarys Scapini](#)<sup>3</sup>, [Patrícia Hermes Stoco](#)<sup>5</sup>,  
[Glauber Wagner](#)<sup>5</sup>, [Airton Kunz](#)<sup>1 7</sup>, [William Michelin](#)<sup>8</sup>, [Aline Viancelli](#)<sup>8</sup>, [Helen Treichel](#)<sup>3</sup>,  
[Gislaine Fongaro](#)<sup>6</sup>