



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DAS ÁGUAS
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

ANDRESA KRISLANY FERREIRA

**DIVERSIDADE E PERFIL DE RESISTÊNCIA DE CEPAS BACTERIANAS
HETEROTRÓFICAS ISOLADAS DE SOLO CONTAMINADO POR REJEITO DE
MANDIOCA**

**SANTARÉM-PA
2023**

ANDRESA KRISLANY FERREIRA

**DIVERSIDADE E PERFIL DE RESISTÊNCIA DE CEPAS BACTERIANAS
HETEROTRÓFICAS ISOLADAS DE SOLO CONTAMINADO POR REJEITO DE
MANDIOCA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como
requisito para obtenção de grau de Bacharel em Ciências
Biológicas pela Universidade Federal do Oeste do Pará.
Instituto de Ciências e Tecnologia das Águas.
Orientadora: Profa. Dra. Graciene do Socorro Taveira
Fernandes

**SANTARÉM-PA
2023**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/UFOPA

F383d Ferreira, Andresa Krislany

Diversidade e perfil de resistência de cepas bacterianas heterotróficas isoladas de solo contaminado por rejeito de mandioca / Andresa Krislany Ferreira – Santarém, 2023.

51 p. : il.

Inclui bibliografias.

Orientadora: Graciene do Socorro Taveira Fernandes

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Instituto de Ciências e Tecnologia das Águas, Bacharelado em Ciências Biológicas.

1. Microrganismos do solo. 2. Manipueira. 3. Impactos ambientais. 4. Antibióticos. I. Fernandes, Graciene do Socorro Taveira, *orient.* II. Título.

CDD: 23 ed. 571.638

Bibliotecária - Documentalista: Mary Caroline Santos Ribeiro – CRB/2 566

ANDRESA KRISLANY FERREIRA

**DIVERSIDADE E PERFIL DE RESISTÊNCIA DE CEPAS BACTERIANAS
HETEROTRÓFICAS ISOALDAS DE SOLO CONTAMINADO COM REJEITO DE
MANDIOCA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito para obtenção de grau de Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Oeste do Pará. Área de concentração: Microbiologia com ênfase em Bacteriologia.

Conceito: Aprovada

Santarém/PA, 04 de Janeiro de 2023.

Presidente/orientador(a): G. Fernandes

Membro: Thais Ferreira de S. F.

Membro: Marco Dionis Feneiro Janfana.

*Aos meus familiares, professores e cônjuge, pelo
apoio, carinho e incentivo.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que me deu forças e coragem para chegar até aqui e a Nossa Senhora de Fátima minha protetora e Mãe do Céu.

A minha Orientadora e mãe científica, Profa. Dra. Graciene do Socorro Taveira Fernandes, que me aceitou como voluntária em seu laboratório de pesquisa, em seguida me direcionando como orientadora e amiga, agregando conhecimento durante meu trajeto na vida acadêmica.

Aos meus colegas do Labac (Laboratório de Bacteriologia), que sempre se colocaram à disposição de ajudar a finalizar minhas tarefas em dias corridos, e que sempre alegraram meus dias mesmo nos momentos mais difíceis.

Aos professores que aceitaram a compor a banca avaliadora, Prof. Dr. Marcos Diones Ferreira Santana e Prof. Dr. Thalís Ferreira dos Santos, minha total gratidão pelas contribuições construtivas neste trabalho.

A Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), pelos anos de contribuição, acolhimento e oportunidades que vivenciei todos esses anos, a qual tenho orgulho imenso em dizer que sou Federal.

A todos os professores do Curso de Ciências Biológicas que ajudaram nessa árdua caminhada de formação, muito obrigada por cada ensinamento.

A Fundação Amazônia de Amparo à Pesquisa e Estudos (FAPESPA) pelo apoio para a realização deste trabalho.

E por fim, a minha família que me amparou e me sustentou para que eu pudesse me dedicar inteiramente a minha vida acadêmica.

Aos meus amigos da Paróquia Nossa Senhora de Fátima que foram minha segunda família e meu porto seguro em muitos momentos.

Ao meu esposo Rômulo de Sousa Martins que sempre me deu suporte, apoiou, e me incentivou mesmo nas vezes em que achava que não conseguiria, e que aceitou o desafio de me esperar esses anos todos com muita paciência amor e carinho. Te amo.

“Só se pode alcançar um grande êxito quando nos mantemos fiéis a nós mesmos”

Friedrich Nietzsche

RESUMO

A produção da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) fornece subprodutos alimentícios, como a farinha de mandioca, por exemplo, de grande importância para as populações da Amazônia brasileira. O líquido extraído da prensagem da mandioca para a produção desse subproduto é chamado de manipueira, que quando descartado de forma irregular, causa prejuízos ambientais devido ao alto teor de toxidade e compostos nocivos, como o ácido cianídrico, impactando negativamente os microrganismos presentes no solo. O presente trabalho foi dividido em dois capítulos e teve como objetivo avaliar a diversidade e a resistência bacteriana presente no solo impactado com manipueira. O solo utilizado nesta pesquisa foi coletado em uma área localizada na Universidade Federal do Oeste do Pará, campus Tapa. Após a coleta o solo foi armazenado em dois recipientes com capacidade de 20L, contendo furos na sua base, e que foram denominados de tratamento M1 e M2. Em seguida, o tratamento M2 foi submetido ao resíduo de 5 litros da manipueira, e ao atingir o fundo, o mesmo foi filtrado pelos furos do recipiente. Os recipientes foram acondicionados em local aberto, expostos as condições naturais do ambiente. Amostras de 25 g de cada recipiente foram coletadas a cada 15 dias por um período de 45 dias, submetidas a diluições seriadas até a 10^{-5} da qual foram retirados 200 μ l e inoculados, em duplicata, em meio de cultura Plate Count Ágar (PCA) utilizando a técnica *spread plate*. Após, realizou-se a leitura de Gram para a identificação morfológica e pureza dos isolados, a identificação bioquímica foi realizada com auxílio da chave de Bergey e seleção de bactérias com base no perfil de resistência a partir da técnica de difusão em disco as quais foram submetidas a testes para 11 antibióticos distribuídos entre espectros de ação. Observou-se no primeiro capítulo que a diversidade de bactérias no tratamento M2 prevaleceu em comparação ao tratamento M1, e através da análise estatística os resultados de diversidade não foram significados. Houve prevalência de bactérias Gram positivas do gênero *Clostridium* spp. nos dois tratamentos. Destaca-se a presença do gênero *Staphylococcus aureus* apenas no tratamento M1 e de *Bacillus* spp. apenas no tratamento M2. No segundo capítulo, bactérias Gram positivas do gênero *Clostridium* spp. apresentou resistência ao antibiótico Oxacilina e Penicilina nas coletas, enquanto Gram negativas dos gêneros *Pseudomonas* spp, *Aeromonas* spp. seguidos da espécie *Klebsiella pneumoniae* apresentaram resistência para o antibiótico Ampicilina. Os antibióticos que apresentaram maior perfil de resistência são da classe dos β -lactâmicos, capazes de inibir as ações de bactérias produtoras de β -lactamases. Com isso, a microbiota bacteriana se mostrou tolerante aos compostos nocivos da manipueira, embora outros estudos apontem uma problemática acerca do resíduo contaminante. Cepas resistentes

podem ser observadas no presente trabalho, o que reflete na capacidade dessas bactérias em resistir sob condições extremas, como o caso do solo contaminado pela manipueira caracterizada pelos seus compostos tóxicos.

Palavras-Chave: Microrganismos do solo. Manipueira. Impactos ambientais. Antibiótico.

ABSTRACT

The production of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) provides food by-products, such as cassava flour, for example, of great importance for the populations of the Brazilian Amazon. The liquid extracted from cassava pressing for the production of this by-product is called manipueira, which, when discarded irregularly, causes environmental damage due to the high level of toxicity and harmful compounds, such as hydrocyanic acid, negatively impacting the microorganisms present in the soil. The present work was divided into two chapters and aimed to evaluate the diversity and bacterial resistance present in the soil impacted with cassava. The soil used in this research was collected in an area located at the Universidade Federal do Oeste do Pará, Tapajós campus, which has the characteristics of being terra preta, and the place having a smaller flow of people circulating, although the presence of animals is constant. After collection, the soil was stored in two containers with a capacity of 20L, containing holes at its base, where it was poured until it reached the maximum capacity of the container, which were called treatment M1 and M2. It was then subjected to the residue of 5 liters of manipueira, which were poured so that the soil was soaked, and when it reached the bottom, it was filtered through the holes in the container. They were placed in an open place, exposed to the natural conditions of the environment, and the collection period is considered rainy in the region. 25 g samples from each container were collected every 15 days for a period of 45 days, submitted to serial dilution up to 10^{-5} , from which 200 μl were removed and inoculated, in duplicate, in Plate Count Agar (PCA) using the spread plate technique to obtain bacterial growth. Afterwards, the Gram reading was performed for the morphological identification and purity of the isolates, the biochemical identification was performed with the aid of the Bergey key and selection of bacteria based on the resistance profile from the disk diffusion technique, which were submitted to tests for 11 antibiotics distributed between spectrums of action. It was observed in the first chapter that the diversity of bacteria in the M2 treatment prevailed in comparison to the M1 treatment, however through the statistical analysis the results were not significant. There was a prevalence of Gram positive bacteria of the genus *Clostridium* spp. in both treatments, and in the 4 collection times. It is noteworthy the presence of the genus *Staphylococcus aureus* only in treatment M1 and *Bacillus* spp. only in treatment M2. In the second chapter, Gram positive bacteria of the genus *Clostridium* spp. showed resistance to the antibiotic Oxacillin and Penicillin in the collections, while Gram negative bacteria of the genus *Pseudomonas* spp, *Aeromonas* spp. followed by the species *Klebsiella pneumoniae* showed resistance to the antibiotic Ampicillin. The antibiotics with the highest resistance profile belong

to the β -lactam class, capable of inhibiting the actions of bacteria that produce β -lactamases. As a result, the bacterial microbiota proved to be tolerant to the harmful compounds of manipueira, although other studies point to a problem regarding the contaminating residue. Resistant strains can be observed in the present work, which reflects on the ability of these bacteria to resist under extreme conditions, such as the case of soil contaminated by manipueira characterized by its toxic compounds.

Key-words: Soil microorganisms. Manipueira. Environmental impacts. Antibiotic.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

Figura 1 - Solo utilizado para o preparo do ensaio biológico.....	18
Figura 2 - Coleta da amostra de solo... ..	19
Figura 3 - Processos metodológicos a partir de amostras de solo.	20
Figura 4 - Frequência absoluta de bactérias heterotróficas isoladas de solo contaminado por manípua (M2) em comparação com solo não contaminado (M1).	22
Figura 5 - Ocorrência dos táxons identificados no tratamento M1 e M2 em todos os tempos amostrais.....	23

CAPÍTULO 2

Fluxograma 1 - Processos metodológicos para realização do teste de Antibiograma.....	32
Figura 1 - Resistência da cepa <i>Clostridium</i> spp. aos antibióticos Oxacilina e Penicilina.....	35
Figura 2 – Perfil de resistência e sensibilidade dos isolados Gram positivos de solo Amazônico dos tratamentos M1 e M2 submetidos ao antibiograma.....	36
Figura 3 – Resistência da cepa <i>Klebsiella pneumoniae</i> ao antibiótico Ampicilina.....	38
Figura 4 – Porcentagem de Perfil de resistência e sensibilidade dos isolados Gram negativos submetidos aos antibióticos.....	39

LISTAS DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1 - Caracterização dos agentes antimicrobianos e padrões interpretativos para análise de resistência dos isolados através do teste de difusão em disco.....	32
Tabela 2 – Classificação do alo de inibição das cepas bacterianas Gram positivas das amostras de solo do tratamento M1 e M2 aos antibióticos.....	33
Tabela 3 - Classificação do alo de inibição das cepas bacterianas Gram negativas das amostras de solo do tratamento M1 e M2 aos antibióticos.....	37

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	13
CAPÍTULO 1 – DIVERSIDADE BACTERIANA HETEROTRÓFICA DE SOLO CONTAMINADO POR RESÍDUO DE MANDIOCA	15
1.1 Introdução	15
1.2 Objetivos	17
1.2.1 Geral	17
1.2.2 Específico	17
1.3 Metodologia	18
1.3.1 Preparo dos tratamentos.....	18
1.3.2 Amostragem do solo	19
1.3.3 Processamento e análises das amostras de solo	19
1.3.4 Análise estatística	20
1.4 Resultados e Discussão	22
CAPÍTULO 2 - PERFIL DE RESISTÊNCIA DE BACTÉRIAS DE SOLO CONTAMINADO COM MANIPUEIRA.	28
2.1 Introdução	28
2.2 Objetivos	30
2.2.1 Geral	30
2.2.2 Específico	30
2.3 Metodologia	31
2.3.1 Obtenção dos isolados	31
2.3.2 Teste de resistência a antimicrobianos	31
2.4 Resultados e Discussão	33
CONSIDERAÇÕES FINAIS	41
REFERÊNCIAS	42

INTRODUÇÃO GERAL

O solo Amazônico contém uma grande diversidade de microrganismos, e são caracterizados por baixa fertilidade e alta acidez, quando utilizados para fins agrícolas é indispensável a adubação e a correção para que se alcance uma produção desejada (WASTOWSKI et al., 2010). No entanto, a comunidade microbiana presente no solo pode estar vulnerável aos impactos ambientais causados pela contaminação do solo, principalmente as de alto teor tóxico (CARVALHO et al., 2011).

Segundo MATOS E BEZERRA (2003) o cultivo de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) tem papel importante, garantido produção de alimento e fonte de renda principalmente de pequenos produtores. No entanto, a produção de farinha ou a extração da fécula através da prensagem da mandioca, gera efluentes líquidos, comumente chamados de manipueira (AVANCINI et al., 2007), a qual apresenta potencial de aproveitamento seja como fonte de bioenergia ou como fertilizante (SARAIVA et al., 2007; MARINI; MARINHO, 2011) e é considerada uma fonte renovável, de baixo custo e disponível para a produção de compostos de interesse comercial, a partir do conceito de biorrefinaria, como é o caso do ácido láctico (ZHANG et al., 2016). Porém, segundo MAGALHÃES et al. (2013), na maioria das vezes, quando a manipueira é descartada no meio ambiente de forma indiscriminada constitui um sério problema ambiental, assim como sua disposição no solo prejudica o equilíbrio entre os microrganismos, altera o pH e aumenta a salinidade (OSUNBITAN, 2009; DUARTE et al., 2013; IZONFUO et al., 2013).

A toxicidade da manipueira, contém compostos nocivos em sua composição decorrente de um glicosídeo cianogênico, denominado linamarina (SANTOS, 2008). Além disso, a manipueira pode influenciar nas atividades da microbiota do solo apresentando consequências positivas ou negativas (PINHO, 2007), assim como selecionar as bactérias mais resistentes devido as pressões no ambiente que podem ocasionar na seleção de cepas mais adaptadas.

A resistência de bactérias vem sendo bastante discutida por ser considerada um problema de saúde pública, ela pode ocorrer de forma intrínseca ou à pressão seletiva gerada pelos agentes antimicrobianos (AZEVEDO, 2005), e sua capacidade de resistência pode estar relacionada com a produção do ácido láctico por algumas bactérias. CARVALHO et al. (1996) relataram que 80,6% dos microrganismos presentes nas amostras retiradas dos tanques fermentação na produção de polvilho azedo eram bactérias produtoras de ácido láctico e que constitui 60% da acidez total na fermentação do amido de mandioca.

Com isso, compreender o comportamento dos microrganismos do solo impactado

ajuda a avaliar as práticas de uso que mantém e/ou melhoram a qualidade deste ao longo do tempo, pois mudanças na atividade microbiana e na composição das comunidades microbianas podem influenciar diretamente em sua fertilidade, bem como no crescimento das plantas (CRECCHIO et al., 2007) e seleção de cepas resistentes no ambiente. FERREIRA et al. (2001) afirmaram que o emprego da manipueira como adubo poderá minimizar os impactos causados pelo despejo do resíduo, sendo um benefício a ser utilizado pela agricultura, até mesmo na plantação da mandioca, possibilitando um melhor desempenho de produtividade. Além de estratégias para combater a resistência a antibióticos. Por isso é preciso entender este problema não apenas como uma questão de saúde pública, mas principalmente ambiental (VIKESLAND et al. 2017).

Este trabalho teve como objetivo isolar e identificar cepas bacterianas de solo impactado pela manipueira em diferentes períodos e testar a resistência das mesmas a antibióticos.

CAPÍTULO 1 – DIVERSIDADE BACTERIANA HETEROTRÓFICA DE SOLO CONTAMINADO POR RESÍDUO DE MANDIOCA.

1.1 Introdução

O solo é um habitat singular quando comparado com outros ambientes devido a sua natureza heterogênea bastante complexa. Essas características permitem que os microrganismos com diferentes metabolismos possam conviver em harmonia de equilíbrio dinâmico. Quanto maior a complexidade da comunidade biológica, maior é sua estabilidade (MOREIRA et al., 2022). As atividades antrópicas, além dos eventos naturais, resultam em mudanças climáticas, através das atividades humanas que estão crescendo significativamente, afetando em última instância as atividades metabólicas dos microrganismos, contudo as mudanças globais de origem natural e/ou antropogênicas podem alterar o equilíbrio da biosfera, assim como os grupos funcionais de microrganismos que podem ser alterados, o que resultará em mudanças nos processos dos ecossistemas (GHINI, 2006).

O aumento das atividades antrópicas tem afetado o uso sustentável dos recursos naturais, especialmente do solo e da água, o que tem provocado interesse no assunto, considerando que a manutenção da qualidade desses recursos é essencial (SRINIVASAN et al., 2009). A agricultura tem se intensificado nos últimos anos, com efeitos significativos sobre o solo e a microfauna que ele abriga, uma delas é a cultura da mandioca que ocorre majoritariamente por pequenos agricultores familiares devido, entre outros fatores, ao uso de baixa aplicação tecnológica, característica favorecida considerando sua grande capacidade adaptativa aos mais diferentes climas do Brasil, obtendo desempenho satisfatórios em solos ácidos e de baixa fertilidade (FIALHO et al., 2009; SILVA, 2014).

Da família Euphorbiaceae, a mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é a raiz tuberosa mais importante das regiões tropicais e subtropicais do mundo, com uso no processamento industrial e na alimentação humana (CENÓZ et al., 2007), sendo um dos seis alimentos básicos no mundo (HOWELER et al., 2013). Trata-se de uma das principais culturas alimentares atualmente, ocupando o oitavo lugar na produção estimada global e consumida por mais 800 milhões de pessoas no mundo no ano de 2007 (FAO, 2007). Dentre os países onde a mandioca é produzida, destacam-se como principais produtores a Nigéria, Tailândia, Indonésia, Congo, Gana e Brasil (CONAB, 2019), onde segue bem adaptada às áreas marginais com solos pobres e ácidos, como na Amazônia, produzida de forma eficiente mesmo em pequena escala, com baixos insumos e sem mecanização (HOWELER et al., 2013).

Porém, o processamento industrial ou artesanal da mandioca causa sérios problemas

ambientais, pois mesmo as pequenas unidades fabris, como as casas de farinha e polvilheiras, podem gerar quantidades significativas de resíduos sólidos (casca, entrecasca e bagaço) e líquidos (manipueira e água vegetal) (CAMARGO et al., 2008). Esses resíduos causam sérios problemas à natureza pelo seu descarte inadequado (VILHALVA et al., 2011).

A manipueira é um resíduo líquido leitoso amarelo claro resultante do processo de prensagem da mandioca, quando esta é ralada e lavada para a obtenção da farinha (COSTA, 2018), e em diversos estudos destaca-se a presença de espécies de bactérias promotoras de crescimento vegetal neste resíduo, destas destacam-se: *Bacillus subtilis*, *B. pumulus*, *B. licheiformis* e *B. cereus* (ELIJAH et al., 2014), além de conter açúcares, amidos, proteínas, linamarina, compostos glicosídeos cianogênico, sais e outras substâncias (CEREDA, 2001). Porém, a toxicidade da manipueira no solo pode estar associada a linamarina (DUARTE et al., 2012) e lotaustralina que quando hidrolisadas por ação enzimática, geram o Ácido Cianídrico (HCN), composto químico altamente tóxico (ARAÚJO et al., 2015).

Além disso, os microrganismos são bastante versáteis em se adaptar em diferentes condições ambientais como as limitações físicas de umidade, aeração, porosidade e limitações químicas tais como, disponibilidade de nutrientes e toxicidade de elementos de metais pesados que podem acometer o solo, porém muitas espécies são capazes de se adaptar a essas condições (MOREIRA et al., 2022).

Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar a diversidade microbiana em solo impactado pela manipueira em diferentes períodos de tempos.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 GERAL

Avaliar a diversidade microbiana em solo impactado pela manipueira em diferentes períodos de tempo.

1.2.2 ESPECÍFICO

Isolar e identificar as bactérias ao menor nível taxonômico;

Analisar a diversidade bacteriana cultivável em amostras de solo contaminado pela manipueira em diferentes períodos de tempo.

1.3 METODOLOGIA

1.3.1 Preparo dos tratamentos

O solo utilizado para o preparo do ensaio biológico foi proveniente de uma área da Universidade Federal do Oeste do Pará, Unidade Tapajós, onde se destaca algumas características como: cor preta, e onde há presença de muitas raízes que pode ter sido retirado juntamente com o solo e acumulado no local (Figura 1). Foram utilizados dois recipientes plásticos com furos na base para filtração e com capacidade de 20L, onde se armazenou o solo coletado até que atingisse a capacidade adequada para que a coleta no recipiente fosse realizada a 20 cm de profundidade da superfície do solo com o auxílio de uma colher estéril, e a manipeira utilizada nesse estudo foi obtida junto a produtores de farinha locais.

Figura 1 - Solo utilizado para o preparo do ensaio biológico.



Fonte: AUTORA (2022)

Um dos recipientes foi mantido até o final do experimento na ausência do resíduo de mandioca denominado tratamento M1 (sem resíduo), e o segundo recipiente foi denominado de tratamento M2, a qual foi adicionado 5 L de manipeira, de modo a deixar o tratamento encharcado (M2 = com resíduo). Os furos na base dos recipientes garantiram que o resíduo fosse filtrado, a fim de não deixar que o acúmulo exagerado fosse fermentado pelo tempo de exposição. Durante o período do experimento, os tratamentos foram mantidos em local aberto, em condições de temperatura ambiente podendo estar expostos ao sol e chuva, porém, cercado com tela ao redor dos recipientes para que não permitisse interferência de animais e/ou pessoas, exceto as pessoas da equipe, em área próxima ao Laboratório de Bacteriologia (Labac) na

UFOPA, Unidade Tapajós, onde o processamento e as análises microbiológicas foram realizados.

1.3.2 Amostragem do solo

As amostragens foram feitas nos dois tratamentos em quatro escalas de tempo sendo T0 (1º dia), T1 (15 dias), T2 (30 dias) e T3 (45 dias) sendo que no T0 do tratamento M2, foi coletado a amostra antes da deposição da manipueira, para se obter uma amostra controle. A amostra T0, assim denominada, consistiu a amostra colhida no 1º dia, tanto de M1 quanto de M2, sendo estabelecida uma escala de tempo máximo de 45 dias para obter o conjunto de amostras, com coleta e análise dos dois tratamentos a cada 15 dias, totalizando oito amostras.

Cada amostra foi constituída de 25g de solo coletada a uma profundidade de cerca de 20 cm da superfície, com colher estéril e condicionadas em um saco plástico estéril (Figura 2), e transportadas para o Laboratório de Bacteriologia (Labac/ICTA/Ufopa) para o preparo do inóculo e análises microbiológicas.

Figura 2 - Coleta da amostra de solo.



Fonte: AUTORA (2022)

1.3.3 Processamento e análises das amostras de solo

A amostra de solo coletada foi transferida para um bécker de 500 mL de capacidade

contendo 225 mL de peptona 0,1%. Após a agitação e homogeneização, foi retirado 1mL do homogenato configurado como diluição 10^{-1} e transferido para um tubo de ensaio contendo 9 mL de peptona 0,1%, a partir deste foram obtidas as diluições seriadas até 10^{-5} (Figura 3).

Figura 3 - Processos metodológicos a partir de amostras de solo.



Fonte: AUTORA (2022)

Para avaliar a diversidade bacteriana cultivável, alíquota das diluições da amostra foi inoculada em duplicata, em placa de Petri de 90 mm de diâmetro contendo 18 mL de meio Plate Count Agar (PCA– KASVI®) pela técnica *spread plate*. Após a inoculação, as placas foram incubadas em estufa de cultura por 24h a 35°C. Passado esse período, foi realizada a contagem padrão em placas (CPP) em um período máximo de 48h.

As cepas bacterianas foram isoladas de placas contendo mais que 25 Unidade Formadoras de Colônias (UFC's) utilizando agulha bacteriológica dos diferentes morfotipos e reinoculadas em tubo baquelite inclinado contendo 3 mL de meio Trypticase Soy Ágar (TSA– KASVI®) e incubados por 24h a 35°C. Passado o período de incubação foi realizada a coloração de Gram para a verificação do completo isolamento e constatação de pureza de cultura, juntamente com a identificação da morfologia e do tipo de parede celular por meio de microscopia.

Posteriormente, provas bioquímicas foram realizadas com os isolados de acordo com o grupo bacteriano a qual ele pertence, após cultivo de 24h a 35°C, seguido de estocagem das cepas em microtubos com TSA, para análise posterior. Dentre os testes bioquímicos que foram realizados, incluiu-se o teste de anaerobiose, Ziehl Neelsen, catalase, oxidase, assim também como testes de fermentação de carboidratos, motilidade e formação de gás (BERGEY et al. 2000).

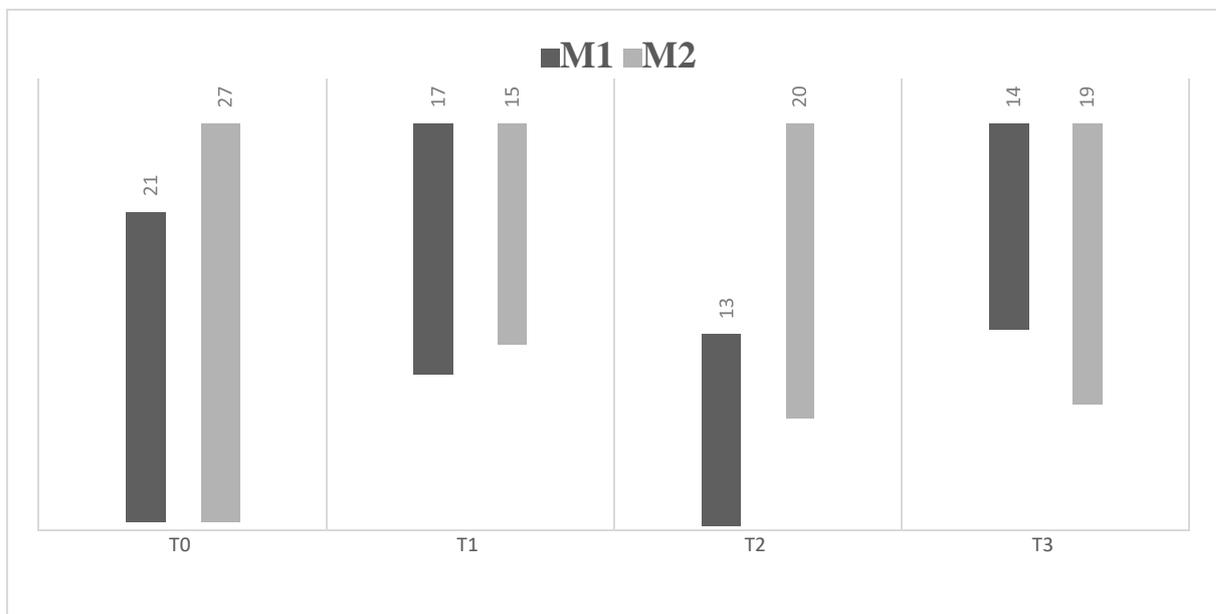
1.3.4 Análise estatística

Os dados foram tabulados em planilhas do Excel e os resultados analisados em pacotes estatísticos como o Índice de Diversidade Recíproco de Simpson ($1/D$) e de ShannonWiener (H'), além do Índice de Similaridade de Jaccard e Bray - Curtis. Paralelamente foi realizado ainda o teste de análise de variância para verificar se o resíduo de manipueira causa interferência na comunidade bacteriana em escala temporal e comparação entre os dois tratamentos.

1.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram isoladas 146 cepas nos dois tratamentos, sendo 65 isolados do tratamento M1 e 81 isolados do M2. De acordo com a Figura 4, foi possível verificar o número absoluto de bactérias que foram encontrados nos dois tratamentos em todos os tempos amostrais. Durante a observação microscópica foi possível observar bactérias Gram positivas e Gram negativas encontradas em duas formas, bacilos e cocos. A bactéria com maior frequência nos tratamentos M1 e M2, foram os bacilos Gram positivos M1 (n=46) e M2 (n=65). Autores indicam que a capacidade de bacilos Gram Positivos, especialmente aqueles com capacidade de esporulações, em sobreviver sob condições extremas pode ser caracterizada por modificações na estrutura de proteínas ou ainda por alterações no DNA (NICOLAUS et al., 2010).

Figura 4 – Frequência absoluta de bactérias heterotróficas isoladas de solo contaminado por manuseio (M2) em comparação com solo não contaminado (M1).



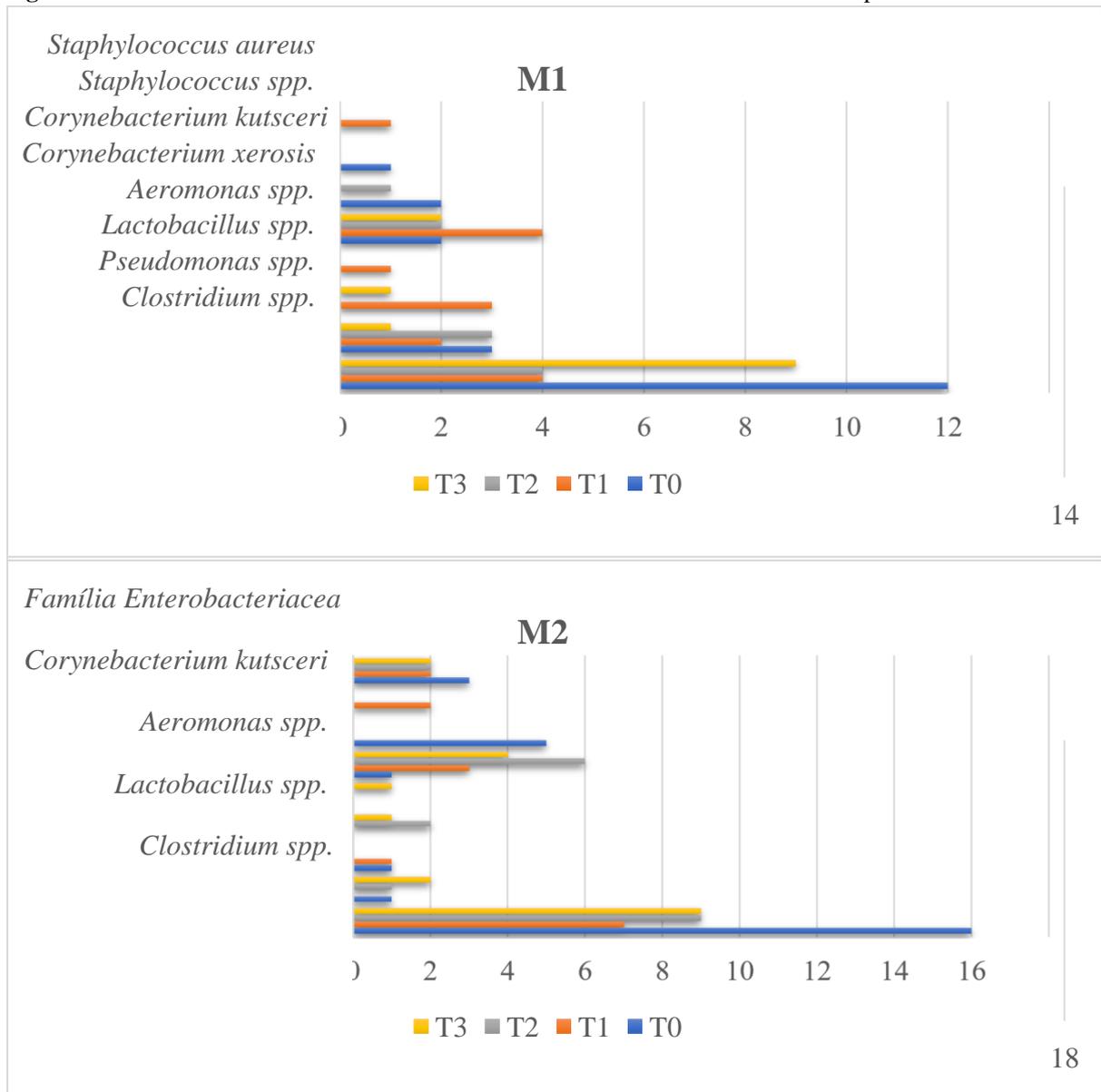
Fonte: AUTORA (2022)

A população bacteriana foi maior no tratamento M2 quando comparado ao tratamento M1, porém as análises estatísticas não apontaram essa diferença considerada significativa.

A identificação bioquímica dos isolados mostrou que a comunidade microbiana cultivável é composta por 10 táxons distribuídos nos dois tratamentos (Figura 5), dentre eles, o mais recorrente nos dois tratamentos foi o gênero *Clostridium* e que em conjunto com o gênero *Bacillus* encontrados apenas no tratamento M2, fazem parte das bactérias anaeróbicas capazes de produzir esporulação. Houve também a abundância do gênero *Clostridium* no tratamento M2

presente em todos os tempos amostrais em comparação aos demais táxons, e a presença da espécie *Staphylococcus aureus* apenas no tratamento M1.

Figura 5 - Ocorrência dos táxons identificados no tratamento M1 e M2 em todos os tempos amostrais.



Fonte: AUTORA (2022)

O gênero *Clostridium* congrega bactérias Gram positivas capazes de esporulação e se apresentam na forma de bastonetes. Muitas espécies de *Clostridium* produzem toxinas que estão associadas ao seu esporo, que mantem sua vitalidade durante muitos anos no solo e com capacidade multirresistente, a qual a sobrevivência do esporo desta bactéria depende das condições físico-químicas no ambiente (PRA et al., 2009). Algumas espécies de *Clostridium* também utilizam da manipueira como fonte de carbono para produção de biocombustíveis. Uma pesquisa desenvolvida por CHOIGI et al., (2020), avaliou que a espécie de *C. beiejrincii* obteve a maior produção de etanol e butanol utilizando o efluente de mandioca como fonte principal

de carbono. Assim também como a capacidade em metabolizar tanto pentoses quanto hexoses, a partir do conteúdo energético desses resíduos (QI et al., 2018).

Seguindo, o gênero *Bacillus*, encontrado apenas no tratamento a qual recebeu o despejo do resíduo da manipueira (M2), são bactérias também com capacidade de esporulação, foi encontrado de forma discreta, apenas 2 isolados em T2 (30 dias) e 1 isolado em T3 (45 dias). São bactérias biosurfactantes consideradas grandes aliadas na biorremediação de solos contaminados (OLIVEIRA, 2014). Esse gênero pode ser encontrado em abundância no solo, assim como em diferentes configurações ambientais em resposta à deficiência de nutrientes e outros estresses ambientais (SONENSHEIN et al., 2002). No entanto, são muito estratégicas nesse aspecto, portanto a ausência destes em T0 e em T1, deva-se ao fato de não haver nessas amostras a forma vegetativa da célula bacteriana. Espécies de *Bacillus* possuem a capacidade de competir com outros microrganismos para produzir moléculas bioativas, que contribuem para sua sobrevivência, quando as culturas mistas são usadas no tratamento de efluentes orgânicos, sendo produzido durante seu metabolismo ácidos orgânicos, com a liberação de hidrogênio (KUMAR ET. AL, 2016).

Bacilos Gram positivos não produtores de esporos foram encontrados nos dois tratamentos e somam um total de 38 isolados que submetidos ao teste de coloração ácida e catalase, 32 são pertencentes ao gênero *Corynebacterium* e que neste trabalho foi identificado duas espécies, de *C. kitcheri* no tratamento M1 (n=3) e no tratamento M2 (n=5) e a espécie de *C. xerosis* no tratamento M1 (n=10) e M2 (n=14) que foi o segundo táxon mais recorrente nos dois tratamentos. Esse gênero está representado por mais de 60 espécies (KHAMIS et al 2005).

Entre os bacilos Gram positivos não esporulados, em ambos os tratamentos foram identificadas seis 6 cepas de *Lactobacillus* spp. O gênero *Lactobacillus* é Gram positivo, incapaz de formar esporos, desprovido de flagelos, apresenta forma bacilar ou cocobacilar, aerotolerante ou anaeróbio, heterotrófico, degrada açúcar para sua sobrevivência, gerando ácido láctico como subproduto (DAMACENO, 2018). As bactérias produtoras de ácido láctico são os principais organismos associados à fermentação espontânea da mandioca. Foi encontrado este gênero nos dois primeiros tempos amostrais do tratamento M2 que estava exposto ao resíduo da manipueira. Um estudo sobre a análise da comunidade microbiana presente na manipueira proveniente da produção de amido fermentado, mostrou prevalência de ácido láctico, especialmente do gênero *Lactobacillus* (AMPE; SIRVENT; ZAKHIA, 2001; LACERDA et al., 2005; AVANCINI et al., 2007; DRESCHKE et al., 2015). Segundo HOFVENDAH e HAHNHAGERDAL (2000), a temperatura e pH do ambiente são os parâmetros que mais influenciam a produção de ácido láctico, no entanto, neste presente trabalho não foi possível avaliar os parâmetros físico-químico da manipueira.

O gênero *Pseudomonas* foi mais frequente no tratamento M1, mas também sendo encontrado cepas no tratamento M2. Neste trabalho, um total de 13 isolados foram identificados como *Pseudomonas* spp.. *Pseudomonas* é o mais abundante e o mais significativo grupo de bactérias do nosso planeta, encontrados na maioria dos principais ecossistemas naturais, terrestres e aquáticos e, também, em íntima associação com algumas plantas e animais (SPIERS et al., 2000). São bactérias consideradas oportunistas e patógenas e capazes de sintetizar produtos de interesses industriais e considerando que a manipueira é rica em carboidratos e minerais, esta pode ser explorada em processos biotecnológicos a partir de cepas de *Pseudomonas* (BEZERRA et al., 2012).

A espécie *Staphylococcus aureus* esteve presente no tratamento M1, sendo apenas uma cepa identificada no tempo T1 e se mostrou ausente no tratamento M2 em todos os tempos amostrais. Essa bactéria se caracteriza como patógenos, estando associada a infecções em humanos e animais (ANNEMÜLLER et al., 1999). A presença de animais abandonados nas dependências da Ufopa, especificamente onde se realizou a coleta inicial do solo utilizado no ensaio biológico estava suscetível as interferências externas, que pode explicar a presença dessa bactéria no T1 da amostra M1. No entanto essa espécie para sua alta propagação necessita de um hospedeiro, e são bastante importantes no ponto de vista clínico.

Entre os bacilos Gram negativos identificados, a família Enterobacteriaceae foi encontrada nos dois tratamentos, sendo um total de 16 dos isolados obtidos, embora tenha sido mais frequentes no tratamento M2. Trata-se de umas das famílias mais abundantes no solo (SILVA; NAHAS, 2002). Enquanto o gênero *Aeromonas* e *Bacillus* se mostraram ser os táxons menos frequentes, sendo que cepas de *Aeromonas* spp. foram encontradas nos tratamentos M1 e M2 e *Bacillus* spp., apenas no tratamento M2 nas amostras T2 e T3.

Aeromonas spp. são bastonetes Gram negativos de vida livre, anaeróbios facultativos (GHENGHESH et al., 2008) e foi identificado no tratamento M1 apenas no T1 com 1 isolado e no tratamento M2 com 1 isolado identificado no T3. Este gênero é fisiologicamente versáteis, o que permite a disseminação e manutenção destes microrganismos em diferentes nichos ecológicos (SESHADRI, 2006). Podem ser isolados de fontes ambientais, incluindo águas, solos, sedimentos e vegetais (BISCARDI et al., 2002; SOLER et al., 2002; DASKALOV, 2006; HUDDLESTON et al., 2006; SCOARIS et al., 2008; PARKER; SHAW, 2011) e existe uma tendência sazonal na incidência de *Aeromonas* spp., com maior frequência de isolamento de fontes ambientais durante os meses de verão (SINHA et al., 2004).

O índice de diversidade recíproco de Simpson (1/D) e de Shannon-Wiener (H'), entre os fatores (tempo e tratamento) não apontaram diferença significativa na diversidade encontrada, onde os resultados dos índices se apresentam da seguinte forma: Teste de Simpson

(1/D) $M1 = 0.7358$ e $M2 = 0.6926$; e teste de Shannon-Wiener (H') $M1 = 1.662$; $M2 = 1.572$. Embora não tenham sido apresentados diferença significativa na diversidade encontrada nos dois tratamentos e nos diferentes tempos, houve diferença na abundância dos indivíduos de cada táxon nos dois tratamentos, onde o tratamento M2 apresentou maior abundância de bactérias em comparação ao tratamento M1, e em relação ao tempo, o T0 do tratamento M2 apresentou maior abundância de indivíduos. Os Índices de Similaridade de Jaccard e Bray Curtis confirmaram os resultados não significativos nos testes anteriores. A análise de Variância aplicada na pesquisa apontou resultados de P maiores que 5, onde as médias de fatores de tratamento e tempo pelo teste F foram consideradas estatisticamente iguais.

Diante dos resultados obtidos, pôde-se constatar que o resíduo da manipueira aplicados sobre o solo avaliado não interferiu na comunidade bacteriana de forma significativa. A forma como o solo absorve água pode influenciar na capacidade de retenção do resíduo, de forma que o solo que recebeu a manipueira foi filtrado para que o rejeito não ficasse acumulado no solo, assim também como a exposição a temperaturas ambientes, como o calor pode ter afetado para a evaporação de uma grande parte do resíduo. A textura do solo também é outro fator que tem influência, pois envolve a distribuição do tamanho e continuidade dos poros e tamanho e estabilidade de agregados. Estes fatores alteram a disponibilidade de água do solo, a difusão de gases e o movimento de organismos edáficos (HASSINK; WHITMORE, 1997; MONTEIRO; FRIGHETTO, 2000).

Considerando que os solos da região Amazônica são classificados de forma geral como ácidos, e a manipueira, tem como característica ser um líquido com pH baixo, a comunidade microbiana está adaptada ou tem seu metabolismo alinhado as condições físicoquímicas presentes ali naturalmente. Segundo PANTAROTO (2001), microrganismos presentes em manipueira e água residual de fecularia, assim como em ambientes sujeitos a contínuos descartes destes efluentes líquidos, encontram-se naturalmente adaptados ao conteúdo cianogênico de seu habitat, degradando-o por atividade enzimática ou metabolismo alternativo à cadeia respiratória, podendo assim ser aplicados na destoxificação destes resíduos. Entretanto, considerando a importância do assunto sobretudo para as populações tradicionais que tem a mandioca como um recurso alimentar e econômico, além do caráter cultural que o vegetal representa, se faz necessário para melhor compreensão desse processo que a avaliação físicoquímica da manipueira tivesse sido realizada, para a determinação da concentração dos componentes do resíduo utilizado para o tratamento M2, e assim poder correlacionar de forma mais completa e aprofundada sobre qual destes comprometeu a microbiota do solo, bem como a aplicação de ferramentas moleculares para acessar os táxons bacterianos não cultiváveis.

CAPÍTULO 2 - PERFIL DE RESISTÊNCIA DE BACTÉRIAS DE SOLO CONTAMINADO COM MANIPUEIRA.

2.1 Introdução

A habilidade para resistir aos efeitos de um determinado antibiótico adquirida por um microrganismo para o qual normalmente é sensível é chamada de resistência, e esse fenômeno é descrito para praticamente todas as espécies bacterianas (NASCIMENTO; ARAÚJO, 2014; RAKERS et al., 2010). A resistência das bactérias aos antibióticos constitui um fenômeno genético causado por genes no interior do organismo sensível que codificam diferentes mecanismos bioquímicos ou pela aquisição de genes de resistência, que tem a função de proteger a célula microbiana e previnem a ação destes fármacos (LEVY; MARSHALL, 2004; SCHAİK, 2015; LEISNER; JORGENSEN; MIDDELBOE, 2016).

Na grande maioria das espécies de bactérias, a resistência está contida nos genes de resistência localizados em plasmídeos podendo ser transferidos de uma bactéria a outra e podendo conferir por exemplo, entre outras características a expressão de resistência a antibióticos (RAKERS et al., 2013). Além dos plasmídeos, os transposons - outro elemento genético móvel, frequentemente carregam genes que podem conferir a capacidade de resistência a antibióticos ao microrganismo. Capazes de mover-se de plasmídeos para o cromossomo bacteriano e vice-versa, e de inserir-se em bacteriófagos, assim, os transposons podem dessa forma, aumentar a transferência de genes de resistência entre as células bacterianas (BALASUBRAMANIAN et al., 2012). Determinantes de resistência também podem ser adquiridos no ambiente pela transferência horizontal, de fragmentos de DNA originários de lise de outras células presentes no ambiente (MARINGONI; KURAZAWA, 2002).

A descoberta dos antibióticos proporcionou um grande avanço no tratamento de doenças infecciosas. Os antibióticos são uma classe de fármacos, que diferem entre si quanto as suas propriedades físicas, químicas, farmacológicas, no espectro e mecanismo de ação (BAPTISTA, 2013), podendo ser substâncias naturais ou sintéticas.

Os antibióticos são classificados conforme a estrutura química e seu mecanismo de ação, a exemplo dos β -Lactâmicos agem inibindo a síntese da parede celular. Outros antibióticos como macrolídeos, aminoglicosídeos, tetraciclina inibem a síntese proteica. Já as polimixinas, são responsáveis pela lise das membranas bacterianas e as fluoroquinolonas impedem a produção de DNA e RNA (FERNÁNDEZ; BREIDENSTEIN; HANCOCK, 2011).

As bactérias estão amplamente distribuídas no ambiente, incluindo o solo, e apresentam grande potencial de disseminação (PRUDEN, 2006). Sabe-se que a presença de resistência e multirresistência em bactérias ambientais pode estar relacionada com a presença

de substâncias como metais pesados ou tóxicas advindos de ações antropogênicas (DIXIT et al., 2015). No entanto, o uso indiscriminado de antibióticos está entre outros fatores aquele que maior impacto tem em promover multirresistência bacteriana, podendo causar doenças de difícil tratamento (ORÚS et al., 2015), tornando um problema sério de saúde pública global.

O estudo do perfil de resistência de bactérias a antibióticos tem sido tradicionalmente determinado *in vitro* por meio de métodos qualitativos, como o método de difusão de discos (TAVARES, 2001), descrito por BAUER et al. (1966).

Diante da problemática apresentada neste capítulo, medidas para evitar a resistência bacteriana devem ser seguidas, como o uso racional dos antibióticos, prevenção de infecções bacterianas, controle e prevenção da disseminação de micro-organismos resistentes são essenciais, assim como a busca por novos metabólitos ativos contra diferentes microorganismos patogênicos devem ser contínuas (DUARTE et al., 2009; GUIMARÃES et al., 2010).

Neste capítulo, abordamos os diferentes táxons de bactérias heterotróficas identificados no primeiro capítulo, de amostras de solo Amazônico contaminado por manipueira, a fim de avaliar o perfil de resistência em diferentes tipos de antibióticos.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 GERAL

Avaliar o perfil de resistência de isolados de amostra de solo Amazônico contaminado por resíduo de mandioca em Santarém – PA.

2.2.2 ESPECÍFICO

- Comparar os perfis de resistência aos diferentes antibióticos;
- Relacionar a comunidade de bactérias Gram positivas e Gram Negativas ao efeito dos antibióticos.

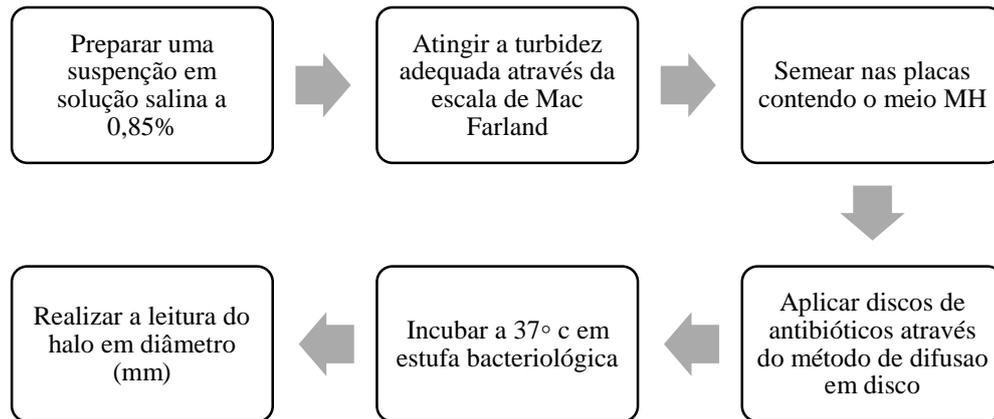
2.3 METODOLOGIA

2.3.1 Obtenção dos isolados

Os isolados foram obtidos a partir de amostras de solo coletados em uma área da Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA) e despejadas em dois recipientes, onde apenas um dos recipientes foi submetido a exposição de 5L manipueira extraído da prensagem da mandioca, e as coletas realizadas em escalas de tempo sendo T0 (1° dia), T1 (15 dias), T2 (30 dias) e T3 (45 dias) foram submetidos a testes bioquímicos sendo identificados diversos táxons bacterianos. Após a identificação, foram selecionados os isolados de acordo com o Gram, reativados em tubos de ensaio contendo meio Trypticase Soy Ágar e incubados em estufa bacteriológica pelo período de 24 a 48 horas a 35°C para o teste de resistência.

2.3.2 Teste de resistência a antimicrobianos

Para o estudo do perfil de resistência a antimicrobianos foi utilizado o método de difusão em disco de Kirby-Bauer (BAUER et al., 1966), onde uma porção da massa bacteriana de um cultivo em meio nutritivo (TSA) por 24h a 35°C foi retirada com auxílio de uma alça bacteriológica estéril e suspensa em solução salina 0,85% estéril, homogeneizada até obter-se a total turbidez correspondente ao padrão da escala Mac Farland de 0,5 que previamente foi calibrada em espectrofotômetro a 600nm de absorbância. Utilizando swabs estéreis embebidos nessa suspensão bacteriana, foi feito um tapete em toda extensão da placa de Petri de 140 mm de diâmetro contendo 45 ml de Ágar Müeller Hinton (MH - KASVI®) e após a secagem do inóculo, foram adicionados os discos de antimicrobianos na superfície do meio, onde os antibióticos inseridos foram selecionados por grupo de bactérias, Gram positivas e Gram negativas.

Fluxograma 1: Processos metodológicos para realização do teste de Antibiógrama.

Fonte: AUTORA (2022)

Foram selecionados 11 antibióticos de acordo com seu espectro de ação para teste em bactérias positivas e negativas como Amoxicilina + Ac. Clavulânico (AMC) 20/10 µg; Ampicilina (AMP) 10 µg; Ciprofloxacina (CIP) 5 µg; Eritromicina (ERI) 15 µg; Imipenem (IMP) 10 µg; Oxacilina (OXA) 1 µg; Penicilina (PEN) 10U; Nitrofurantoína (NIT) 300 µg; Amicacina (AMI) 30 µg; Cloranfenicol (CLO) 30 µg e Gentamicina (GEN) 10 µg. Foi considerado como parâmetros para avaliação do perfil de resistência a classificação de diâmetro do halo medido em mm de acordo com a tabela CLSI, 2019 (Tabela 1).

Tabela 1 – Caracterização dos agentes antimicrobianos e padrões interpretativos para análise de resistência dos isolados através do teste de difusão em disco.

Antibióticos	Diâmetro do Halo de inibição em mm		
	R	I	S
Amoxicilina+Ac. Clavulânico (AMC)	≤ 13	14 - 17	≥ 18
Ampicilina (AMP)	≤ 13	14 - 16	≥ 17
Ciprofloxacina (CIP)	≤ 21	22 - 25	≥ 26
Eritromicina (ERI)	≤ 13	14 - 15	≥ 16
Imipenem (IMP)	≤ 19	14 - 15	≥ 16
Oxacilina (OXA)	≤ 10	20 - 22	≥ 23
Penicilina (PEN)	≤ 28	-	≥ 29
Nitrofurantoína (NIT)	≤ 14	15 - 16	≥ 17
Amicacina (AMI)	≤ 14	15 - 16	≥ 17
Cloranfenicol (CLO)	≤ 12	13 - 17	≥ 18
Gentamicina (GEN)	≤ 12	13 - 14	≥ 15

Fonte: CLSI (2019)

Legenda: (AMC) Amoxicilina+Ac. Clavulânico; (AMP) Ampicilina; (CIP) Ciprofloxacina; (ERI) Eritromicina; (IMP) Imipenem; (OXA) Oxacilina; (PEN) Penicilina; (NIT) Nitrofurantoína; (AMI) Amicacina; (CLO) Cloranfenicol; (GEN) Gentamicina. R – Resistente; I – Intermediário; S – Sensível.

continua

Tratamento	Cepa (n)	Táxon	Amc	Amp	Cip	Eri	Imp	Oxa	Pen	Nit
M1	112	<i>C. xerosis</i>	S	S	S	S	S	R	R	S
M1	100	<i>Clostridium</i> spp.	I	R	S	S	S	R	R	S
M1	105	<i>Clostridium</i> spp.	R	R	S	S	S	R	R	S
M1	113	<i>C. xerosis</i>	I	R	S	S	S	R	R	S
M1	147	<i>Clostridium</i> spp.	S	I	S	S	S	R	R	I
M1	159	<i>Lactobacillus</i> spp.	S	S	S	S	S	R	R	R
M1	152	<i>Clostridium</i> spp.	S	S	S	S	S	S	S	S
M1	156	<i>C. xerosis</i>	S	S	S	R	S	R	R	R
<hr/>										
M2	3	<i>Clostridium</i> spp.	I	R	S	S	S	R	R	S
M2	4	<i>Clostridium</i> spp.	S	R	S	S	S	R	R	S
M2	14	<i>Clostridium</i> spp.	I	R	S	S	S	R	R	S
M2	15	<i>C. kutceri</i>	R	R	S	S	S	R	R	S
M2	16	<i>C. kutceri</i>	I	R	S	S	S	R	R	S
M2	45	<i>C. xerosis</i>	S	I	S	S	S	R	R	S
M2	11	<i>C. kutceri</i>	R	R	S	S	S	R	R	S
M2	60	<i>Lactobacillus</i> spp.	S	S	S	S	S	R	R	S
M2	53	<i>Clostridium</i> spp.	S	S	S	S	S	R	R	S
M2	59	<i>C. xerosis</i>	S	S	S	S	S	R	R	S
M2	61	<i>Clostridium</i> spp.	S	S	S	S	S	R	R	S
M2	117	<i>Clostridium</i> spp.	R	R	S	R	R	R	R	I
M2	108	<i>Clostridium</i> spp.	I	R	S	S	S	R	R	S
M2	121	<i>Clostridium</i> spp.	S	R	S	R	S	R	R	R
M2	127	<i>Clostridium</i> spp.	S	S	S	S	S	R	S	S
M2	133	<i>C. xerosis</i>	R	R	S	S	R	R	R	I
M2	140	<i>C. xerosis</i>	I	R	S	S	S	R	R	S
M2	137	<i>C. xerosis</i>	R	S	S	S	S	R	R	S
M2	138	<i>Clostridium</i> spp.	S	S	R	S	S	R	R	S
M2	136	<i>Clostridium</i> spp.	I	R	S	S	S	R	R	S

Legenda: M1= Amostra sem manipueira; M2= Amostra com manipueira

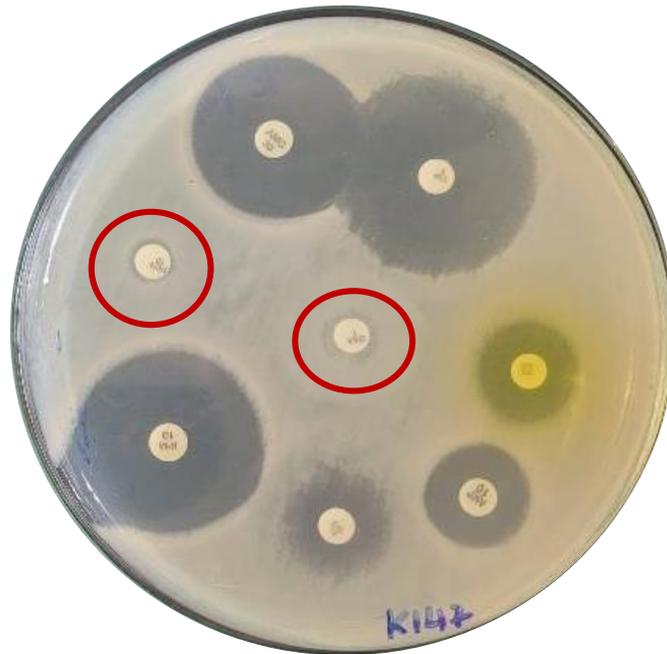
Amc (Amoxicilina+Ac. Clavulânico); **Amp** (Ampicilina); **Cip** (Ciprofloxacina); **Eri** (Eritromicina); **Imp** (Imipenem); **Oxa** (Oxacilina); **Pen** (Penicilina); **Nit** (Nitrofurantoína)

R= Resistente; **I**= Intermediário; **S**= Sensível **Fonte:** Autora (2022).

Dentre as bactérias Gram positivas testadas, constatou-se que no tratamento M2 a

qual recebeu o resíduo da manipueira citado no primeiro capítulo, todas as cepas bacterianas foram resistentes a OXA e PEN. Dentre elas, o gênero *Clostridium* apresentou maior perfil de resistência a esses dois antibióticos apontando cerca de 80% de resistência somado os dois tratamentos (Figura 1).

Figura 1 - Resistência da cepa *Clostridium* spp. aos antibióticos Oxacilina e Penicilina.



Fonte: Autora (2022).

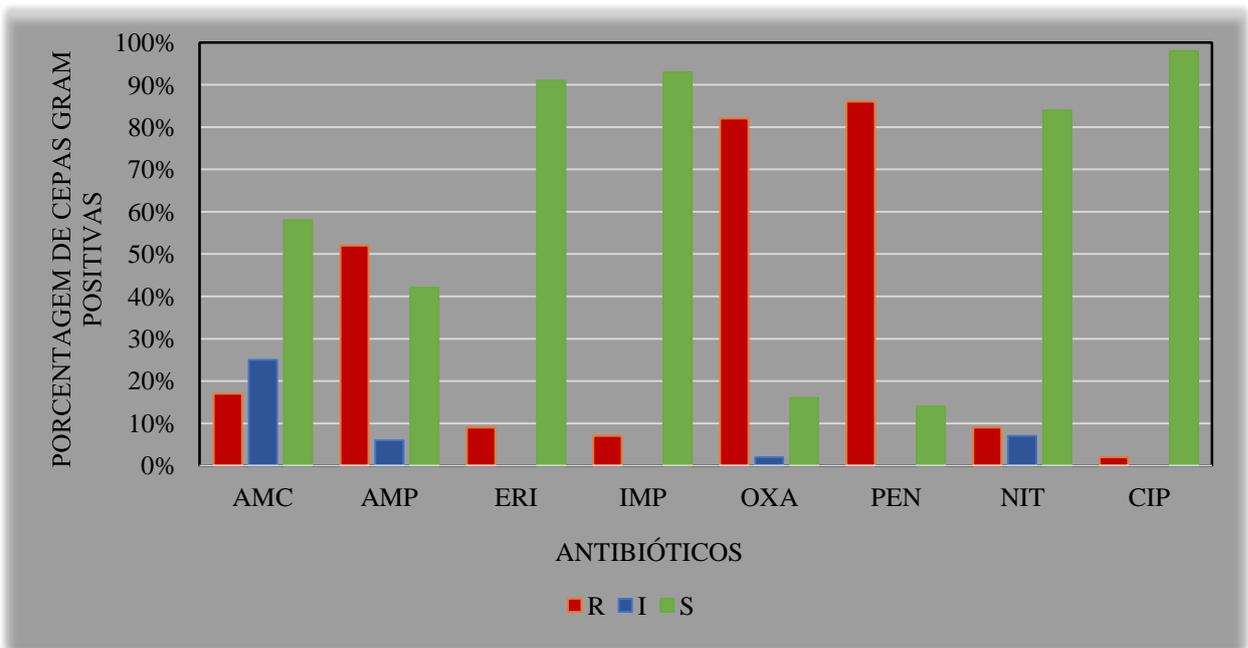
O gênero *Clostridium* pertence a classe das bactérias Gram positivas com capacidade de esporulação, são anaeróbicas estritas e aerotolerante, e algumas espécies são consideradas patógenas. Os antibióticos OXA e PEN são pertencentes a classe dos β lactâmicos, e a resistência bacteriana a esses antibióticos pode ser obtida através de três estratégias: produção de enzimas que hidrolisam os β -lactâmicos; prevenção da interação do fármaco com o alvo, e expulsão dos antibióticos através de bombas de efluxo, por bactérias Gram-negativas (WILKE et al., 2005; WRIGHT, 2005).

A produção de β -lactamases podem ser encontradas em bactérias anaeróbias como espécies de *Clostridium* spp., mas estes podem ser encontradas em ambas as bactérias Gram positivas e Gram negativas (PETROSINO et al., 1998; HENRIQUES et al., 2006), concordando com este estudo em que os resultados mostraram resistência deste gênero bacteriano a estes dois antibióticos.

O antibiótico com maior percentual de eficácia contra as cepas Gram positivas nos

dois tratamentos foi o CIP (98%), seguido de IMP (93%) e ERI (90%), e para a classificação intermediária o antibiótico AMC (25%) (Figura 2).

Figura 2 – Perfil de resistência e sensibilidade dos isolados Gram positivos de solo Amazônico dos tratamentos M1 e M2 submetidos ao antibiograma.



Legenda: AMC – Amoxicilina+Ac. Clavulânico; AMP – Ampicilina; ERI – Eritromicina; IMP – Imipenem; OXA – Oxacilina; PEN – Penicilina; NIT – Nitrofurantoína; CIP – Ciprofloxacina. **R** – Resistente; **I** – Intermediário; **S** – Sensível.

Fonte: AUTORA (2022)

O gênero *Lactobacillus* mostrou resistência pelos antibióticos PEN, OXA, NIT e AMP. As bactérias desse gênero são geralmente resistentes às principais classes de antimicrobianos como β -lactâmicos, aminoglicosídeos, sulfas e quinolonas (CHARTERIS et al., 1998).

As cepas de *Corynebacterium kutcheri* apresentaram juntas resistência aos antibióticos AMP, OXA e PEN, enquanto cepas de *C. kutcherie* mostraram resistência para estes três antimicrobianos e *C. xerosis* para PEN (100%) e OXA (73%).

Da espécie *Staphyococcus aureus* apenas uma cepa foi testada e mostrou-se resistente apenas a OXA e para todos os outros antibióticos ela foi sensível. A resistência à OXA está em grande parte relacionada com resistência a outros antimicrobianos, particularmente os aminoglicosídeos e macrolídeos (LYYTIKÄINEN, 1996).

As bactérias Gram negativas pertencentes aos dois tratamentos testadas neste capítulo estão representadas pelos gêneros *Pseudomonas*, *Aeromonas* e pelas espécies *K. pneumonie*, *E. intermedius* e *C. diversus* apresentadas como Família *Enterobacteriaceae* no primeiro capítulo (Tabela 3).

Tabela 3 - Classificação do alo de inibição das cepas bacterianas Gram negativas das amostras de solo do tratamento M1 e M2 aos antibióticos.

			Antibióticos							
Tratamento cepa		Táxon	Amc	Amp	Ami	Eri	Imp	Clo	Gen	Nit
M1	20	<i>Pseudomonas</i> spp.	S	R	S	R	S	S	S	S
M1	29	<i>K. pneumonie</i>	S	R	S	R	S	S	S	R
M1	49	<i>Pseudomonas</i> spp.	S	S	S	R	S	S	S	S
M1	52	<i>Pseudomonas</i> spp.	S	R	R	R	S	S	R	S
M1	75	<i>Pseudomonas</i> spp.	S	S	S	S	S	S	S	S
M1	70	<i>K. pneumonie</i>	S	S	S	S	S	S	S	S
M1	81	<i>Enterobacter intermedium</i>	S	S	S	S	S	S	S	S
M1	80	<i>Aeromonas</i> spp.	S	S	S	S	S	S	S	S
M1	83	<i>Pseudomonas</i> spp.	S	S	S	S	S	S	S	S
M1	104	<i>Citrobacter diversus</i>	S	I	S	S	S	S	S	S
M1	111	<i>Pseudomonas</i> spp.	R	R	S	S	S	R	S	R
M1	96	<i>K. pneumonie</i>	S	R	S	R	S	S	S	R
M1	103	<i>K. pneumonie</i>	S	S	S	S	S	S	S	R
M1	144	<i>K. pneumonie</i>	S	S	S	S	S	S	S	S
M1	158	<i>Pseudomonas</i> spp.	S	R	S	S	S	S	S	S
M2	1	<i>Pseudomonas</i> spp.	S	R	R	R	R	S	S	S
M2	6	<i>K. pneumonie</i>	I	R	S	S	S	S	S	S
M2	7	<i>K. pneumonie</i>	S	R	S	R	S	S	S	S
M2	41	<i>K. pneumonie</i>	S	R	R	S	S	S	S	S
M2	68	<i>E. intermedium</i>	S	S	S	S	S	S	S	S
M2	55	<i>K. pneumonie</i>	S	R	S	S	S	S	S	S
M2	107	<i>Pseudomonas</i> spp.	S	S	S	S	S	S	S	S
M2	120	<i>K. pneumonie</i>	S	I	S	S	S	S	S	S
M2	126	<i>K. pneumonie</i>	S	S	S	S	S	S	S	S
M2	134	<i>K. pneumonie</i>	S	S	S	S	S	S	R	S
M2	124	<i>Pseudomonas</i> spp.	S	S	S	S	S	S	S	S
M2	129	<i>Pseudomonas</i> spp.	S	S	S	S	S	S	S	S
M2	139	<i>Aeromonas</i> spp.	R	R	S	R	S	S	S	R

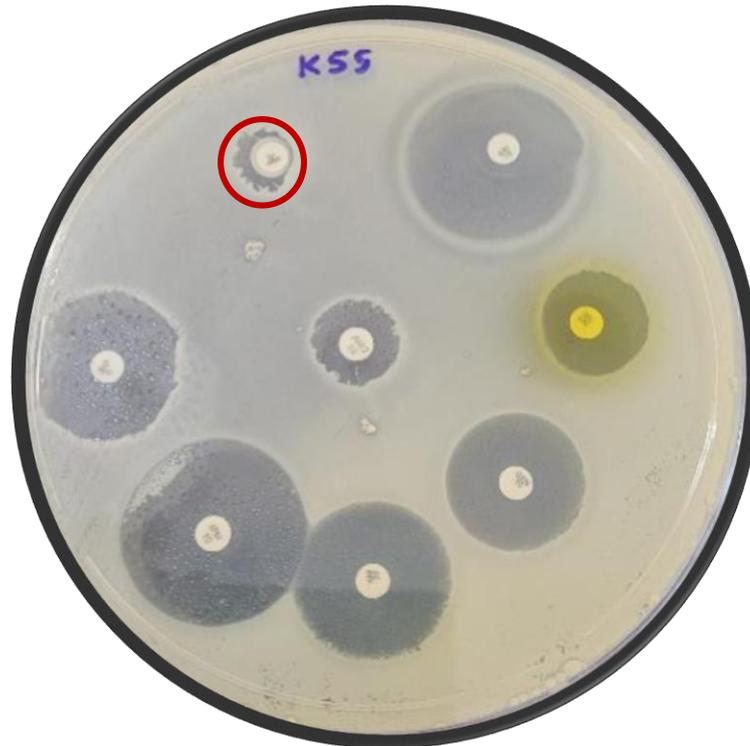
Legenda: M1= Amostra sem manipueira; M2= Amostra com manipueira

Amc (Amoxicilina+Ac. Clavulânico); **Amp** (Ampicilina); **Ami** (Amicacina); **Eri** (Eritromicina); **Imp** (Imipenem);

Clo (Cloranfenicol); **Gen** (Gentamicina); **Nit** (Nitrofurantoína)
R= Resistente; **I**= Intermediário; **S**= Sensível **Fonte:** Autora
 (2022).

Dentre as cepas de bactérias Gram negativas testadas, os gêneros *Pseudomonas*, seguido da espécie *K. pneumoniae*, além de uma cepa do gênero *Aeromonas* mostraram resistência para AMP. (Figura 3).

Figura 3 - Resistência da cepa *Klebsiella pneumoniae* ao antibiótico Ampicilina.

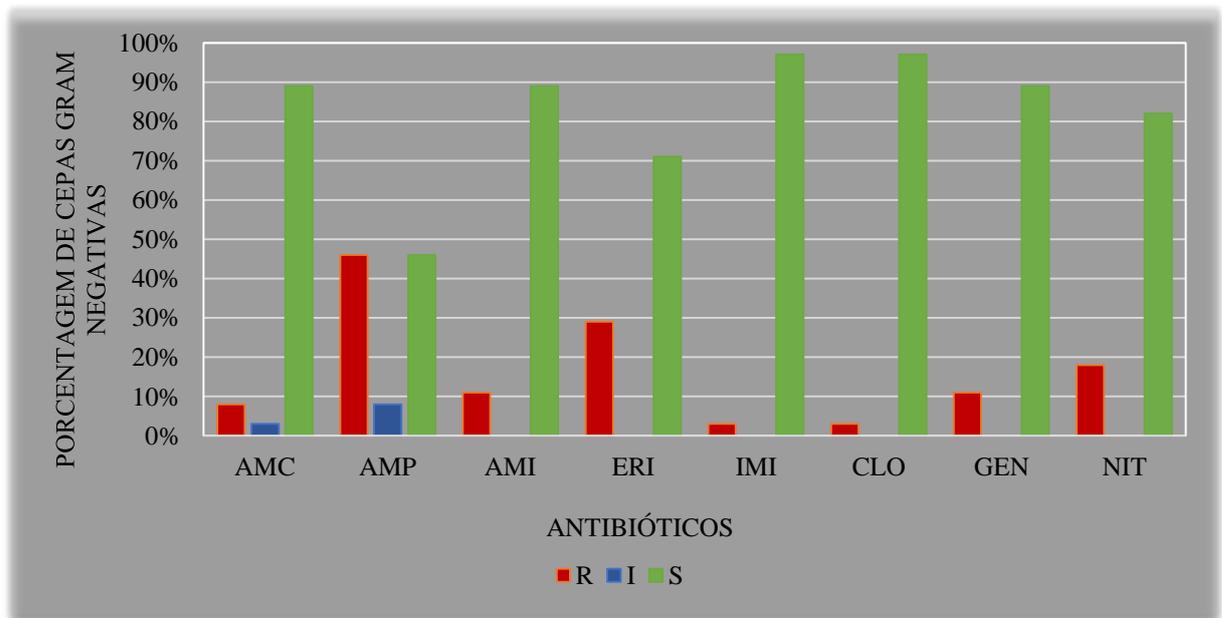


Fonte: Autora (2022).

A resistência da espécie de *Pseudomonas*, *K. pneumoniae* e do gênero *Aeromonas* ao antibiótico AMP está associada a multirresistência a classe dos β -lactâmicos, pois possuem capacidade de produzir enzimas hidrolíticas que inativam os antimicrobianos dessa classe, sendo um dos mecanismos de resistência bacteriana mais importante (OGALO et al., 2016). Das espécies de *E. intermedius* e *C. diversus* foram submetidas apenas uma cepa de cada táxon, e não apresentaram resistência aos antibióticos testados.

Os antibióticos que tiveram maior eficácia contra as Gram negativas, foram IMI e CLO com mais de 90% de sensibilidade seguida dos outros antibióticos que tiveram um bom resultado de eficácia contra as bactérias Gram negativas. O número de cepas que apresentaram perfil intermediário para os antibióticos testados foi baixo quando comparado as taxas de resistência e sensibilidade (Figura 4).

Figura 4 – Porcentagem de Perfil de resistência e sensibilidade dos isolados Gram negativos submetidos aos antibióticos.



Legenda: AMC – Amoxicilina+Ac. Clavulânico; AMP – Ampicilina; AMI – Amicacina; ERI – Eritromicina; IMI – Imipenem; CLO – Cloranfenicol; GEN – Gentamicina; NIT – Nitrofurantoína; **R** – Resistente; **I** – Intermediário; **S** – Sensível.

Fonte: AUTORA (2022)

A resistência ao antibiótico pelo gênero *Pseudomonas* já é caracterizada por ser intrínseca à espécie, por esse motivo o descarte indiscriminado de antimicrobianos em lixo comum associados a prática do consumo constante destes fármacos por longos períodos em hospitais, representa um fator que favorece a seleção de cepas resistentes (BRETT; ELLISPEGLER, 2001; LOUREIRO et al., 2002). A resistência intrínseca ou natural está relacionada às características fenotípicas do micro-organismo, fazendo parte de sua herança genética e sendo transmitida verticalmente, sem alterações (VERDI et al., 2016)

A resistência da espécie de *K. pneumoniae* e do gênero *Aeromonas* ao antibiótico AMP está associada a multirresistência a classe dos β -lactâmicos, pois possuem capacidade de produzir enzimas hidrolíticas que inativam os antimicrobianos dessa classe, sendo um dos mecanismos de resistência bacteriana mais importante (OGALO et al., 2016).

As bactérias gram-negativas são intrinsecamente menos permeáveis a muitos

antibióticos por possuírem membrana externa na constituição de sua parede celular, o que não existe na parede celular de bactérias gram-positivas. Dessa forma, a redução da permeabilidade da membrana externa é um mecanismo de resistência exclusivo de bactérias gram-negativas. (DE ANDRADE, L. N.; DA COSTA DARINI, A. L. 2016). Isso explica por que as bactérias Gram negativas tiveram maior perfil de sensibilidade aos antibióticos provenientes das amostras de solo contaminado e não contaminado por manipueira. Porém a produção de betalactamases de espectro expandido (ESBL) tem sido descrita como um importante mecanismo de resistência a beta-lactâmicos em espécies da Família Enterobacteriaceae, e seu achado constitui um dado clínico relevante (FRANCISCO & JEA, 2006).

O descarte de águas residuais principalmente agrícolas, são as principais fontes de antimicrobianos (DING e HE, 2010) e vários estudos também são feitos para identificar genes de resistência em bactérias encontradas no solo (CAUMO et al., 2010), porém é escasso os estudos que identifiquem resistência bacteriana proveniente de amostras de solo contaminados por manipueira.

A resistência pelos antibióticos citados neste capítulo da classe das penicilinas tem diversas desvantagens, principalmente pelo fato de serem suscetíveis à ação das beta-lactamases e pela sua rápida eliminação pelo organismo (AZEVEDO, 2014) o que sugere que mais estudos sobre a resistência à essa classe bacteriana principalmente por amostras provenientes de contaminação seja considerada importante atualmente.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A comunidade microbiana isolada e identificada no primeiro capítulo se mostrou adaptada ou tem seu metabolismo alinhado as condições físico-químicas presentes ali naturalmente;

- A resistência pelos antibióticos OXA e PEN no segundo capítulo dos isolados Gram positivos e a resistência a AMP nos isolados Gram negativos pode estar relacionada com a presença da β -lactamases produzidas por algumas espécies bacterianas, impedindo a ação dos antimicrobianos β -lactâmicos;

Considerando a importância do assunto, sobretudo para as populações tradicionais que tem a mandioca como um recurso alimentar e econômico, além do caráter cultural que o vegetal representa, se faz necessário para melhor compreensão desse processo que a avaliação físico-química da manipueira tivesse sido realizada, para a determinação da concentração dos componentes do resíduo utilizado para o tratamento M2, e assim poder correlacionar de forma mais completa e aprofundada sobre qual destes comprometeu a microbiota do solo. Além da importância de pesquisas acerca da resistência bacteriana de cepas provenientes de amostras contaminadas por efluentes industriais.

REFERÊNCIAS

- AMPE, F.; SIRVENT, A.; ZAKHIA, N.. Dynamics of the microbial community responsible for traditional sour cassava starch fermentation studied by denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative rRNA hybridization. **International Journal of Food Microbiology**, v. 65, n. 1–2, p. 45–54, 2001.
- ANNEMÜLLER, C. *et al.* Genotyping of Staphylococcus aureus isolated from bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 69, p.217-224, 1999.
- ARAÚJO, N. C. *et al.* Crescimento e produtividade de milho fertilizado com manipueira como fonte alternativa de nutrientes. **Tecnol. & Ciênc. Agropec**, v. 9, n. 2, p. 31-35, 2015.
- AVANCINI, S.R.P. *et al.* Cassava starch fermentation wastewater: Characterization and preliminary toxicological studies. **Food and Chem. Tox.**, v. 45, n.11, p. 2273–2278, 2007.
- AZEVEDO, F. M. Microrganismos multirresistentes. *In*: OLIVEIRA, A. C; ARMOND, G. A. **Infecções hospitalares: epidemiologia, prevenção e controle**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. p. 241-347.
- AZEVEDO, S. M. M.. **Farmacologia dos antibióticos beta-lactâmicos**, 2014. Tese (Doutorado) – Mestre de Ciências Farmacêuticas, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2014.
- BALASUBRAMANIAN, S.. *et al.* Antimicrobial properties of skin mucus from four freshwater cultivable fishes (*Catla catla*, *Hypophthalmichthys molitrix*, *Labeo rohita* and *Ctenopharyngodon idella*). **African Journal of Microbiology Research** v. 6, n. 24, p. 51105120, 2012.
- BAPTISTA, M. G. F. M. **Mecanismos De Resistência Aos Antibióticos**, 2013. Dissertação (Mestrado) - Curso De Mestrado Integrado Em Ciências Farmacêuticas, Universidade Lusófona De Humanidades E Tecnologia, Lisboa2013.
- BAUER, A.W. *et al.* Antibiotic Susceptibility Testing By A Standardized Single Disk Method. **Am. J. Clin. pathol** , v.45, n.4, p.493-496.

- BERGEY, D. H.; HOLT, J. G. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.
- BERTRAM, E.. **Nietzsche: Attempt at a Mythology** . Editora da University of Illinois, 2010.
- BEZERRA, M. S.; HOLANDA, V. C. D.; AMORIM, J. A.; MACEDO, G.R.; SANTOS, E.S.. Produção de biotensoativo utilizando *Pseudomonas aeruginosa* (PA) e resíduo agroindustrial (manipueira) como substrato. **HOLOS**, v.1, p. 14 – 27, 2012.
- BISCARDI D. et al.. The occurrence of cytotoxic *Aeromonas hydrophila* strains in Italian mineral and thermal waters. **Science of the Total Environment.**, v.292, n.3, p. 255 – 263, 2002.
- BRETT, M, ELLIS – PEGLER, R. Surveillance Of Antimicrobial Resistance In New Zealand. **N Z Pub Health Report**, v.8, n.3, p.17-24, 2001.
- CAMARGO, K. F.; LEONEL, M.; MISCHAN, M. M.. Produção de biscoitos extrusados de polvilho azedo com fibras: efeito de parâmetros operacionais sobre as propriedades físicas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 3, p. 586-591, 2008.
- CARVALHO, E. P. et al.. Povilho azedo: aspectos físicos, químicos e microbiológicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 31, n. 2, p. 129–137, 1996.
- CARVALHO, N. L.; PIVOTO, T. S. Ecotoxicologia: conceitos, abrangência e importância agrônômica. **Revista Monografias Ambientais**, v. 2, n.2, p.176-192, 2011.
- CAUMO, K. et al.. Resistência bacteriana no meio ambiente e implicações na clínica hospitalar. **Revista Liberato**, v.11, n. 16, p. 183-190, 2010.
- CENÓZ, P. J.; BURGOS, A. M.; LÓPEZ, A. E. Factores ambientales que afectan la calidad de raíces en mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **Horticultura Argentina**, v.26, p.5-9, 2007.
- CEREDA, M. P. **Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca**. 1.ed. São Paulo: Fundação Cargill, 2001.
- CHARTERIS, W. et al. Antibiotic Susceptibility Of Potentially Probiotic *Lactobacillus* Species. **Journal Of Food Protection**, v.61, n.12, p. 1636-1643, 1998.
- CHOGI, M. A. N. et al..Produção de biocombustível e ácidos orgânicos para agregar valor ao efluente de mandioca. **Revista Virtual de Química**, v.12, n.1, p.1-10, 2020.
- Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB). **Análise Mensal da mandioca**. Brasília, 2019.
- COSTA, J. **Potencial uso da manipueira no controle larvicida do *Aedes aegypti***, 2018. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós - Graduação em Química, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2018.
- CRECCHIO, C. et al. Soil microbial dynamics and genetic diversity in soil under monoculture wheat grown in different long-term management systems. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, n. 6, p. 1391-1400, 2007.

DAMACENO, J. M.. **Potencial simbiótico de queijo tipo *petit suisse* diet adicionado de extrato de castanha do Brasil, *Bifidobacterium bifidum* e *Lactobacillus paracasei***, 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Engenharia) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, 2018.

DASKALOV, H. The importance of *Aeromonas hydrophila* in food safety. 2006, **Food Control**, v.17, n.6, p.474-483, 2006.

DE ANDRADE, L. N.; DA COSTA, A. L. D.. Mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos. **Curso: Básico de Antimicrobianos** Divisão de MI – CM – FMRP, São Paulo:USP, 2016.

DING, C; HE, J. Effect of antibiotics in the environment on microbial populations. **Appl Microbiol Biotechnol.**, v.87, n.3, p.925-941,2010.

DIXIT, R. *et al.*. Bioremediation of Heavy Metals from Soil and Aquatic Environment: An Overview of Principles and Criteria of Fundamental Processes. **Sustainability**, v.7, n 2, p. 2155-2212, 2015.

DRESCHKE, G. *et al.* Lactic acid and methane: Improved exploitation of biowaste potential. **Bioresource Technology**, v. 176, p. 47–55, 2015.

DUARTE, A. *et al.*. Uso de diferentes doses de manipueira na cultura da alface em substituição à adubação mineral. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.16, n.3, p. 262-267, 2010.

DUARTE, A. S. *et al.*. Alterações dos atributos físicos e químicos de um Neossolo após aplicação de doses de manipueira. **Rev.Bras. de Eng. Agr. e Amb.**, v. 17, n. 9, p. 938-946, 2013.

DUARTE, M. W. *et al.* Atividade antimicrobiana e produção e enzimas extracelulares por actinomicetos isolados de solo. 2009. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

ELIJAH, A. I. *et al.*.Molecular characterization and potential of bacterial species associated with cassava waste. **Nigerian Food Journal**, v.32, n. 2, p.56-65, 2014.

FAO. **Production Yearbook**, Rome. 2007.

FERNÁNDEZ, L.; BREIDENSTEIN, E. B.; HANCOCK, R, E. Creeping Baselines And Adaptive Resistance To Antibiotics. **Drug Resist. Updat**, v.14, n.1, p.1-21, 2011.

FERREIRA, W. de A.; BOTELHO, S. M.; CARDOSO, E. M. R.; POLTRONIERI, M. C.; **Manipueira: um adubo orgânico em potencial**. Belém: EMBRAPA Amazônia Oriental, 2001. **INFOTECA – E**.

FIALHO, J. F.; ANDRADE, R. F. R.; VIEIRA, E. A. **Mandioca no Cerrado – Questões práticas**. 1 ed. Brasília: Embrapa, 2009.

FRANCISCO, W; JEA, A. H. Y. Resistência à Beta-Lactamases por Presença de ESBL. Disponível em: <http://www.fleury.com.br/mednews/0301/mdcontfcb0302.htm>. Acesso em: 14/11/2022.

GHINI, RAQUEL. Influência das mudanças climáticas na agricultura. *In*: CONGRESSO SUL BRASILEIRO DE MEIO AMBIENTE, 1.; SEMINÁRIO REGIONAL DE EDUCAÇÃO AMBIENTAL, 7.; SEMANA ACADÊMICA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, 20.; SEMANA ACADÊMICA DE TECNOLOGIA EM MEIO AMBIENTE, 3.; SEMANA ACADÊMICA DE ENGENHARIA AMBIENTAL, 2., 2006, Concordia: Universidade do Contestado, 2006. p. 110.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta de novos agentes. **Química Nova**, v.33, n.3, p.667-679, 2010.

HASSINK, J.; WHITMORE, A.P.. A model of the physical protection of organic matter in soils. **Soil Science Society of America Journal**, v.6, n.1, p.131-139, 1997.

HENRIQUES, I.S. et al.. Occurrence and diversity of integrons and beta-lactamase genes among ampicillin-resistant isolates from estuarine waters. **Research in Microbiology**, v.157, n.10, p.938-947, 2006.

HOFVENDAHL, K.; HAHN-HAGERDAL, B. l-lact acid production from whole wheat flour hydrolysate using strains of *Lactobacilli* and *Lactococci*. **Enzyme and microbial Technology**, v. 20, n. 4, p. 301-307, 1997.

HOWELER, R.; LUTALADIO, N.; THOMAS, G. **Save and grow: cassava. A guide to sustainable production intensification**. Fao, 2013.

HUDDLESTON, J. R.; ZAK, J. C.; JETER, R. M.. Antimicrobial susceptibilities of *Aeromonas* spp. isolated from environmental sources. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, n.11, p.7036-7042, 2006.

IZONFUO, W. A. L.; BARIWENI, P. A.; GEORGE, D. M. C. Soil Contamination from Cassava Wastewater Discharges in a Rural Community in the Niger Delta, Nigeria. **Appl. Sci. Environ. Manage.**, v. 17, n.1, p. 105-110, 2013.

KHAMIS, A.; RAOULT, D; LA SCOLA, B. Comparison between *rpoB* and 16S rRNA gene sequencing for molecular identification of 168 clinical isolates of *Corynebacterium*. **J. Clin. Microbiol.**, v.43, n.4, p.1934-1936, 2005.

KUMAR, L. et al.. Adsorption of copper, zinc and lead on biosurfactant produced from cassava wastewater. **African journal of biotechnology**, v. 15, n.5, p. 110-117, 2016.

LACERDA, I. C. A. *et al.* Lactic acid bacteria and yeasts associated with spontaneous fermentations during the production of sour cassava starch in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 105, n. 2, p. 213–219, 2005.

LEISNER, J. J.; JORGENSEN, N. O. G.; MIDDELBOE, M.. Predation and selection for antibiotic resistance in natural environments. **Evolutionary Applications**, v. 9, p. 427– 434, 2015.

- LEVY, S. B.; MARSHALL, B.. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. **Nature Medicine Supplement**, v. 10, n. 12, p.S122-S129, 2004.
- LOUREIRO, M. M. et al.. *Pseudomonas aeruginosa*: study of antibiotic resistance and molecular typing in hospital infection cases in a neonatal intensive care unit from Rio de Janeiro city, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, n.97, p.387-394, 2002.
- LYYTIKÄINEN, O. et al. Increased resistance among staphylococcus epidermidis isolates in a large teaching hospital over a 12-year period. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v.15, n.2, p. 133-138, 1996.
- MAGALHÃES, A. G. et al.. Reutilização da água residuária de casa de farinha em substituição à adubação mineral: efeitos no solo e na planta. **Rev. EDUCamazônia**, v. X, n. 1, p. 93-108, 2013.
- MARINGONI, A. C.; KUROSAWA, C. Tipificação de isolados de *Cutobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* por bacteriocino. **Revista Agropecuária Brasileira**, v. 37, p. 1339-1345, 2002.
- MARINI, F. S.; MARINHO, C. S. Adubação complementar para a mexeriqueira ‘Rio’ em sistema de cultivo orgânico. **Rev.Bras. de Eng. Agr. e Amb.**, v. 15, p. 562-568, 2011.
- MATOS, P. L. P.; BEZERRA, V. S. Cultivo da Mandioca para o Estado do Amapá. Embrapa Mandioca e Fruticultura. Sistemas de Produção. Disponível em: http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mandioca/mandioca_amapa/index.htm. Acesso em: 19 Out. 2022.
- MONTEIRO, T. R.; FRIGHETO, T. S. Determinação da umidade, pH e capacidade de retenção de água do solo. In.: FRIGHETO, R.T. S; VALARINI, P. J. **Indicadores biológicos e bioquímicos da qualidade do solo**: manual técnico. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. 198p.
- MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 1 ed. Lavras: Editora UFLA, 2002.
- NASCIMENTO, E. D.; ARAÚJO, M. F. F. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquatic environments in Brazil: a systematic review. **Revista Ambiente & Água**, v. 9, n. 2, p. 239-249, 2014.
- NICOLAUS, B.; KAMBOUROVA, M.; ONER, E.T. Exopolysaccharides from extremophiles: from fundamentals to biotechnology. **Environmental Technology**, v. 31, n. 10, p. 1145-1158, 2010.
- OGALO, E.A. et al. High prevalence of multi-drug resistant *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary teaching Hospital In Western Kenya. **Afr. J. Infect. Dis.**, v.10, n.2, p.89-95, 2016.
- OLIVEIRA, Juliana Guerra de. Utilização de melaço, manipueira e soro de queijo como substratos para produção de biossurfactante por *Bacillus Pumilus* e sua aplicação em biorremediação de solo. 2014. opportunities. **Bioresource Technology**, v. 215, p. 50–62, set. 2016.

- ORÚS, P. *et al.* Increasing antibiotic resistance in preservative-tolerant bacterial strains isolated from cosmetic products. **International microbiology**, v.18, n.1, p. 51-59, 2015.
- OSUNBITAN, J. A. Suitability of Runoff water quality for Irrigation from a plot treated with cassava effluents. **J. Environ. Hydrol.**, v. 17, n.18, 2009.
- PANTAROTO, S. **Isolamento, seleção, identificação e avaliação de microrganismos aeróbios in situ, com habilidade à biodegradação de linamarina.** Dissertação (Mestrado) – Curso de Agronomia, Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP, Botucatu, 2001.
- PARKER, J.L.; SHAW, J.G. *Aeromonas* spp. clinical microbiology and disease. **Journal of Infection**, v.62, n.2, p.109 – 118, 2011.
- PETROSINO, J.; CANTU, C. R. D; PALZKILL, T.. Beta-Lactamases: protein evolution in real time. **Trends in Microbiology**, v. 6, n.8, p. 6079-83, 1998.
- PINHO, M. M. C. A.. **Reaproveitamento de resíduo do processamento da mandioca (Manipueira):** Avaliação de impactos químicos e microbiológicos no solo e utilização como fertilizante. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2007.
- PRA, M. A. D. *et al.* Uso de cal virgem para o controle de *Salmonella* spp. e *Clostridium* spp. em camas de aviário. **Ciência Rural**, v.39, n.4, p.1189-1194, 2009.
- PRUDEN, A. *et al.* Antibiotic resistance genes (ARG) as emerging contaminants: Studies in northern Colorado. **Environ. Sci. Technol**, v.40, n.23, p.7445-7450, 2006.
- QI, G. *et al.* Solvents production from cassava by co-culture of *Clostridium acetobutylicum* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v.6, n.1, p. 128 – 133, 2018.
- RAKERS, S. *et al.* Antimicrobial peptides (AMPs) from fish epidermis: perspectives for investigative dermatology. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, n.5, p. 1140–1149, 2013.
- RAKERS, S. *et al.* Fish matters: the relevance of fish skin biology to investigative dermatology. **Experimental Dermatology**, v. 19, n.4, p. 313-324, 2010.
- SANTOS, A. Usos e impactos ambientais causados pela manipueira na microrregião sudoeste da Bahia-Brasil. In: LUZÓN, J. L; CARDIM, M. **Problemas sociales y regionales em America Latina.** Barcelona: Universitat de Barcelona, 2009, p.11-25.
- SARAIVA, F. Z.*et al.* Uso de manipueira no desenvolvimento vegetativo do milho em ambiente protegido. **Rev.Bras. de Eng. Agr. e Amb.**, v. 11, p.30-36, 2007.
- SCHAIK, W. V. The human gut resistome, **Philosophical Transaction Royal Society Biological Sciences**, v. 370, n. 1670, pág. 20140087, 2015.
- SCOARIS, D.O. *et al.* Virulence and antibiotic susceptibility of *Aeromonas* spp. isolated from drinking water. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.93, n.1-2, p.111 – 122, 2008.

- SESHADRI R., J. S.W. *et al.* Genome sequence of *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966T: jack of all trades. **Journal of bacteriology**, 188 (23): 8272 – 8282, 2006.
- SILVA, A. R. Manejo e conservação do solo. *In*: JÚNIOR, M. S. M; ALVES, R. N. B.. **Cultura da Mandioca**. 1 ed. Belém: EMBRAPA, 2014. p.29-44.
- SILVA, P.; NAHAS, E. Bacterial diversity in soil in response to different plans, phosphate fertilizers and liming. **Braz. J. Microbiol**, v..33, n. 4, 2002.
- SINHA, S. *et al.* Prevalence, serotype distribution, antibiotic susceptibility and genetic profiles of mesophilic *Aeromonas* species isolated from hospitalized diarrhoeal cases in Kolkata, India. **Journal of Medical Microbiology**, v.53, n.6, p.527- 534, 2004.
- SOLER L. *et al.* Potential virulence and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas popoffii* recovered from freshwater and seawater. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v.32, n.3, p.243-247, 2002.
- SONENSHEIN, A.J.L. *et al.* *Bacillus subtilis* and its closest relatives: From genes to cells. ASM Press, 2002. Disponível em: https://socgenmicrobiol.org.uk/pubs/micro_today/book_reviews/MTAUG03/MTA03_26.cfm. Acesso em: 25 Nov. 2022.
- SPIERS; A. J.; BUCKLING, A.; RAINEY, P. B. The causes of *Pseudomonas* diversity. **Microbiology**, v.146, n.10, p.2345-2350, 2000.
- SRINIVASAN, M. S.; MCDOWELL, R. W. Irrigation and soil physical quality: An investigation at a long-term irrigation site. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v.52, n.2, p.113-121, 2009. TAVARES W. **Manual De Antibióticos E Quimioterápicos Antiifeciosos**. São Paulo: Atheneu, 2001.
- VERDI, C. M. *et al.* Detecção laboratorial dos mecanismos de resistência da *Klebsiella pneumoniae*: uma Revisão. **Revista Saúde Integrada**, v. 9, n.17, p.16-27, 2016.
- VIKESLAND, P. J. *et al.* Toward a comprehensive strategy to mitigate dissemination of environmental sources of Antibiotic Resistance. **Environmental Science & Technology**, v. 51, n. 22, p. 13061-13069, 2017.
- VILHALVA, D. A. A. *et al.* Aproveitamento da farinha de casca de mandioca na elaboração de pão de forma. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v.70, n.4, p. 514-521, 2011.
- WASTOWSKI, A. D. *et al.* Caracterização dos níveis de elementos químicos em solo, submetido a diferentes sistemas de uso e manejo, utilizando espectrometria de fluorescência de raios-x por energia dispersiva (edxrf). **Química. Nova**, v. 33, n. 7, p. 1449-1452, 2010.
- WILKE; M.S.; LOVERING, A. L.; STRYNADKA, N. C. J. β -lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. **Current Opinion in Microbiology**, v.8, n.5, p.525–533, 2005.
- WRIGHT; G. D. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.57, n.10, p.1451– 1470, 2005.
- ZHANG, M. *et al.* Biorefinery approach for cassava-based industrial wastes: Current status and



UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
REITORIA
SISTEMA INTEGRADO DE BIBLIOTECAS
BIBLIOTECA CENTRAL RUY BARATA

TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO DE TRABALHOS
ACADÊMICOS

1. Identificação do autor

Nome completo: Andresa Krislany Ferreira

CPF: 02379310289 RG: 6933494 Telefone: (93) 991116207

E-mail: andresa.krislany@yahoo.com.br

Titulação recebida: Bacharel em Ciências Biológicas

Seu e-mail pode ser disponibilizado na página de rosto?

(X) Sim () Não

2. Identificação da obra

(X) Monografia () TCC () Dissertação () Tese () Artigo científico () Outros:

Título da obra: Diversidade e perfil de resistência de Cepas Bacterianas Heterotróficas Isoladas De Solo Contaminado Por Rejeito De Mandioca

Programa/Curso de pós-graduação:

Data da conclusão: / /

Orientador: Graciene do Socorro Taveira Fernandes

E-mail: gracienefernaandes@hotmail.com

Coorientador: _____

Examinadores: Dr. Thalís Ferreira dos Santos

Dr. Marcos Diones Ferreira Santana

3. Termo de autorização

Autorizo a Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA) a incluir o documento de minha autoria, acima identificado, em acesso aberto, no Portal da instituição, na Biblioteca Ruy Barata, no Repositório Institucional da Ufopa, bem como em outros sistemas de disseminação

da informação e do conhecimento, permitindo a utilização, direta ou indireta, e a sua reprodução integral ou parcial, desde que citado o autor original, nos termos do artigo 29 da Lei nº 9.610, de 19 de fevereiro de 1998. Essa autorização é uma licença não exclusiva, concedida à Ufopa a título gratuito, por prazo indeterminado, válida para a obra em seu formato original.

Declaro possuir a titularidade dos direitos autorais sobre a obra e assumo total responsabilidade civil e penal quanto ao conteúdo, citações, referências e outros elementos que fazem parte da obra. Estou ciente de que todos os que de alguma forma colaboram com a elaboração das partes ou da obra como um todo tiveram seus nomes devidamente citados e/ou referenciados, e que não há nenhum impedimento, restrição ou limitação para a plena validade, vigência e eficácia da autorização concedida.

Santarém, 24/01/2023



Assinatura do autor

4. Tramitação

Secretaria / Coordenação de curso

Recebido em ____/____/____. Responsável: _____

Siape/Carimbo