

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA  
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

Raquel Rita Mocellin

***Enterococcus* spp. RESISTENTES A ANTIMICROBIANOS E METAIS PESADOS  
ISOLADOS DE AVES MARINHAS DO ARQUIPÉLAGO DOS ABROLHOS,  
BRASIL: UMA SENTINELA DE POLUIÇÃO AMBIENTAL**

Porto Alegre

2023

Raquel Rita Mocellin  
Bacharela em Ciências Biológicas

***Enterococcus* spp. RESISTENTES A ANTIMICROBIANOS E METAIS PESADOS  
ISOLADOS DE AVES MARINHAS DO ARQUIPÉLAGO DOS ABROLHOS,  
BRASIL: UMA SENTINELA DE POLUIÇÃO AMBIENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Paula Guedes Frazzon

Porto Alegre  
2023



Aos meus amados pais, Iara e Gilmar, por serem meus exemplos de dedicação e amor infinito.

“Você não passa um único dia sem ter um impacto no mundo ao seu redor. O que você faz, faz a diferença, e você tem que decidir que tipo de diferença quer fazer.” (Jane Goodall)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço imensamente à minha mãe, Iara Maria da Silva Mocellin, e meu pai, Gilmar Mocellin, que sempre me dedicaram todo o apoio e amor do mundo, me ensinando o valor do respeito por todas as formas de vida existentes no planeta. Ao meu amor, Gabriel Matte de Oliveira, e sua família, pelo apoio incondicional, incentivo e aconchego que foram essenciais nessa trajetória. Ao meu irmão, Rafael Antonio Mocellin, pela amizade desde a infância que perdura até os dias de hoje.

Agradeço à minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Guedes Frazzon, pelo apoio e conhecimento fundamentais não apenas para o desenvolvimento deste trabalho, mas também para o meu crescimento pessoal.

Agradeço às minhas amigas e colegas de laboratório Camila Coutinho dos Santos e Amanda Ladeira Toigo pelos momentos compartilhados e por todas as músicas ouvidas e cantadas. À Camila agradeço, especialmente, por ter sido minha dupla desde o início do mestrado e o maior presente que ganhei nesse período.

Agradeço aos meus amigos por me proporcionarem momentos de leveza e carinho. Um agradecimento especial à minha amiga, Franciely Machado Ramos, por estar sempre presente disposta a acolher e abraçar.

Agradeço ao Prof. Dr. Guilherme Tavares Nunes pela sua constante disponibilidade em ajudar desde o primeiro momento e também por ter coletado as amostras, o que me permitiu realizar este trabalho com animais verdadeiramente fascinantes.

Agradeço ao Laboratório de Virologia, por todo apoio prestado desde a mudança ao novo ICBS. Feliz de ter encontrado pessoas tão especiais nessa jornada.

Por fim, agradeço a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida e a todos que, de alguma maneira, contribuíram para a concretização deste trabalho. Meus sinceros agradecimentos!

# ***Enterococcus* spp. RESISTENTES A ANTIMICROBIANOS E METAIS PESADOS ISOLADOS DE AVES MARINHAS DO ARQUIPÉLAGO DOS ABROLHOS, BRASIL: UMA SENTINELA DE POLUIÇÃO AMBIENTAL**

Autora: Raquel Rita Mocellin

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Paula Guedes Frazzon

## **RESUMO**

Em 2015, o rompimento da barragem de Fundão (Mariana/MG) resultou em uma das mais graves catástrofes ambientais do Brasil, poluindo rios que deságuam no Oceano Atlântico Sul e atingindo o arquipélago dos Abrolhos, situado na Bahia. Estudos posteriores ao derramamento demonstraram o impacto de metais pesados em aves marinhas que se reproduzem em Abrolhos e se alimentam ao redor das colônias. Quando o hospedeiro é exposto a pressões antropogênicas, a comunidade microbiana intestinal também é afetada e pode se adaptar a essas situações estressantes. Nesse sentido, esse estudo buscou avaliar bactérias pertencentes ao gênero *Enterococcus*, bactérias comensais do trato gastrointestinal de diversos animais e conhecidas por serem sentinelas ambientais, obtidos a partir de amostras cloacais de *Sula leucogaster* e *Phaethon aethereus*. Para isso, o perfil de resistência aos antibióticos e a tolerância aos metais pesados, bem como a presença determinantes de virulência dos enterococos foram avaliados. Suabes cloacais foram coletados de *S. leucogaster* (n=11) e *P. aethereus* (n=6) para, posterior, isolamento de enterococos. As cepas foram identificadas pela técnica de Maldi-TOF e avaliadas quanto à suscetibilidade antimicrobiana pelo método de disco-difusão em ágar, de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). O perfil de tolerância aos metais pesados foi determinado pela concentração inibitória mínima (CIM), utilizando ágar suplementado com arsenato de sódio nas concentrações de 0,25-128 mM. O protocolo de PCR padrão foi usado para detectar os genes de resistência aos antibióticos (*msrC* e *ermB*), bem como a tolerância aos metais pesados (*arsA*, *trcB* e *merA*). Como resultados do presente estudo, foram identificados 94 enterococos, sendo *E. casseliflavus* (44,68%) e *E. faecalis* (34,04%) as espécies mais frequentes, seguidos de *E. hirae* (11,7%) e *E. faecium* (5,31%) e *E. flavescens* (4,25%). A maior frequência de cepas com resistência antibiótica foi observada para eritromicina (44,68%). A presença do gene *msrC* foi detectada em 7,14% das cepas resistentes à eritromicina. Com relação à avaliação da suscetibilidade ao arsênio, 84,04% das cepas apresentaram tolerância. Os genes *arsA\_I* e/ou *arsA\_II*, que conferem resistência ao arsênio, foram detectados em 34,04% dos isolados. O gene *trcB*, que confere resistência ao cobre, foi observado em 30,85% das cepas. Todas as cepas foram negativas para a PCR para os genes *merA*. A presença dos genes *gelE* (36,17%) e *ace* (55,31%), associados a fatores de virulência também foram observadas. Em conclusão, a identificação de enterococos AMR e HMR nessas aves marinhas oferece informações sobre o impacto das ações antrópicas na vida selvagem de Abrolhos.

<sup>1</sup>Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (71 p.) setembro, 2023.

# ***Enterococcus* spp. RESISTANT TO ANTIMICROBIALS AND HEAVY METALS ISOLATED FROM SEABIRDS OF THE ABROLHOS ARCHIPELAGO, BRAZIL: AN ENVIRONMENTAL POLLUTION SENTINEL.**

Author: Raquel Rita Mocellin  
Advisor: Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Ana Paula Guedes Frazzon

## **ABSTRACT**

In 2015, the collapse of the Fundão dam (Mariana/MG) resulted in one of the most serious environmental catastrophes in Brazil, polluting rivers that flow into the South Atlantic Ocean and reaching the Abrolhos archipelago located in Bahia. Studies following the spill demonstrated the impact of heavy metals on seabirds that breed in Abrolhos and feed around the colonies. When the host is exposed to anthropogenic pressures, the intestinal microbial community is also affected and can adapt to these stressful situations. In this sense, this study sought to evaluate bacteria belonging to the genus *Enterococcus*, commensal bacteria from the gastrointestinal tract of various animals and known to be environmental sentinels, obtained from cloacal samples of *Sula leucogaster* and *Phaethon aethereus*. For this, the antibiotic resistance profile and tolerance to heavy metals, as well as the presence of virulence determinants of enterococci were evaluated. Cloacal swabs were collected from *S. leucogaster* (n=11) and *P. aethereus* (n=6) for subsequent isolation of enterococci. The strains were identified by the Maldi-TOF technique and evaluated for antimicrobial susceptibility by the agar disk diffusion method, in accordance with the *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). The tolerance profile to heavy metals was determined by the minimum inhibitory concentration (MIC), using agar supplemented with sodium arsenate at concentrations of 0.25-128 mM. The standard PCR protocol was used to detect antibiotic resistance genes (*msrC* and *ermB*) as well as heavy metal tolerance (*arsA*, *trcB* and *merA*). As a result of the present study, 94 enterococci were identified, with *E. casseliflavus* (44.68%) and *E. faecalis* (34.04%) being the most common species, followed by *E. hirae* (11.7%) and *E. faecium* (5.31%) and *E. flavescens* (4.25%). The highest frequency of strains with antibiotic resistance was observed for erythromycin (44.68%). The presence of the *msrC* gene was detected in 7.14% of erythromycin-resistant strains. Regarding the assessment of susceptibility to arsenic, 84.04% of the strains showed tolerance. For copper, 70.21% of the strains showed phenotypic tolerance. The *arsA\_I* and/or *arsA\_II* genes, which confer resistance to arsenic, were detected in 34.04% of the isolates. The *trcB* gene, which confers resistance to copper, was observed in 30.85% of the strains. All strains were susceptible to mercury and negative for PCR for the *merA* genes. The presence of *gelE* (36.17%) and *ace* (55.31%) genes, associated with virulence factors, were also observed. In conclusion, the identification of AMR and HMR enterococci in these seabirds provides information about the impact of anthropogenic actions on Abrolhos wildlife.

<sup>1</sup>Master of Science Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (71 p.) september, 2023.

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	3
2.1	Objetivo Geral .....	3
2.2	Objetivos Específicos .....	3
<b>3.</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	4
3.1	Mineração no Brasil .....	4
3.2	O rompimento da barragem de Fundão .....	5
3.3	Metais pesados e a bioacumulação no ecossistema marinho.....	6
3.4	O Parque Nacional Marinho dos Abrolhos .....	7
3.4.1	Impactos do rompimento da barragem de Fundão em Abrolhos .....	8
3.5	Aves marinhas .....	9
3.5.1	<i>Phaethon aethereus</i> , grázina-de-bico-vermelho .....	10
3.5.2	<i>Sula leucogaster</i> , atobá-marrom .....	11
3.5.3	Efeitos ecológicos do colapso de Fundão em <i>P. aethereus</i> e <i>S. leucogaster</i> .....	13
3.6	O gênero <i>Enterococcus</i> .....	13
3.6.1	<i>Enterococcus</i> spp. isolados de aves marinhas .....	15
3.6.2	Resistência a metais pesados em <i>Enterococcus</i> spp. ....	16
3.6.2.1	Mecanismos de resistência ao arsênio (As) .....	17
3.6.2.2	Mecanismos de resistência ao cobre (Cu) .....	18
3.6.3	Resistência antimicrobiana em <i>Enterococcus</i> spp. ....	19
3.6.3.1	Mecanismos de Resistência aos macrolídeos (eritromicina) .....	20
3.6.3.2	Mecanismos de Resistência às ansamicinas (rifampicina).....	20

3.6.3.3	Mecanismos de Resistência às quinolonas (ciprofloxacina e norfloxacina) ...	21
3.6.3.4	Mecanismos de Resistência aos nitrofuranos (nitrofurantoína) .....	21
3.6.4	Fatores de virulência em <i>Enterococcus</i> spp. ....	21
3.6.4.1	Adesina de colágeno .....	22
3.6.4.2	Gelatinase .....	22
<b>4.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>24</b>
4.1	Área de estudo .....	24
4.1.1	Arquipélago dos Abrolhos .....	24
4.2	Amostras .....	25
4.3	Coleta amostral .....	26
4.4	Isolamento de bactérias do gênero <i>Enterococcus</i> .....	26
4.5	Identificação das espécies de <i>Enterococcus</i> spp. ....	27
4.6	Determinação do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos .....	27
4.7	Determinação do perfil de suscetibilidade aos metais pesados .....	27
4.8	Extração do DNA genômico e detecção dos genes relacionados à resistência aos antimicrobianos e aos metais pesados .....	28
4.9	Detecção dos genes relacionados a fatores de virulência .....	28
4.10	Análise estatística .....	29
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>31</b>
5.1	Isolamento e identificação de <i>Enterococcus</i> spp. oriundos de amostras cloacais de <i>P. aethereus</i> e <i>S. leucogaster</i> .....	31
5.2	Perfil de suscetibilidade antimicrobiana das cepas de enterococos isoladas	

de <i>P. aethereus</i> e <i>S. leucogaster</i> .....	31
5.3 Detecção dos genes de resistência aos antibióticos ( <i>ermB</i> , <i>msrC</i> ) .....	34
5.4 Perfil de suscetibilidade aos metais pesados nas cepas de enterococos isoladas de <i>P. aethereus</i> e <i>S. leucogaster</i> .....	34
5.4.1 Tolerância ao arsênio em cepas de enterococos pela técnica de concentração inibitória mínima em ágar .....	34
5.4.1 Tolerância ao mercúrio em cepas de enterococos pela técnica de microdiluição em caldo .....	36
5.5 Detecção dos genes de resistência aos metais pesados nas cepas de enterococos isoladas de <i>P. aethereus</i> e <i>S. leucogaster</i> .....	36
5.5.1 Detecção dos genes de resistência ao arsênio ( <i>arsA_I</i> , <i>arsA_II</i> ) .....	36
5.5.2 Detecção do gene de resistência ao cobre ( <i>tcrB</i> ) .....	37
5.5.3 Detecção dos genes de resistência ao mercúrio ( <i>merAIII_IV_VI</i> ) .....	38
5.6 Detecção dos genes associados a fatores de virulência ( <i>ace</i> , <i>cylA</i> , <i>gelE</i> , <i>esp</i> ) .....	38
5.7 Associação das cepas de enterococos fenótipo e genótipo positivas para metais pesados e fatores de virulência com as aves <i>P. aethereus</i> e <i>S. leucogaster</i> .....	38
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	40
6.1 Distribuição de <i>Enterococcus</i> spp. em amostras cloacais de aves <i>P. aethereus</i> e <i>S. leucogaster</i> .....	40
6.2 Resistência aos antimicrobianos das cepas de enterococos isoladas das aves marinhas <i>P. aethereus</i> e <i>S. leucogaster</i> .....	43
6.3 Tolerância aos metais pesados em cepas de enterococos de <i>P. aethereus</i> e <i>S. leucogaster</i> .....	45

6.4	Genes associados a fatores de virulência em <i>Enterococcus</i> spp. isolados das aves marinhas <i>P. aethereus</i> e <i>S. leucogaster</i> .....	48
7.	<b>CONCLUSÃO</b> .....	50
8.	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	51
9.	<b>APÊNDICES</b> .....	70
9.1	Relação genótipo/fenótipo das cepas resistentes a arsênio por espécie de <i>Enterococcus</i> spp .....	70

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Dados das aves marinhas avaliadas no presente estudo.....	25
<b>Tabela 2.</b> Sequência dos primers empregados para detectar os genes de resistência a antimicrobiano, metais pesados e fatores de virulência nas cepas de enterococos .....	30
<b>Tabela 3.</b> Distribuição dos <i>Enterococcus</i> spp. isolados de amostras cloacais de <i>P. aethereus</i> e <i>S. leucogaster</i> .....	32
<b>Tabela 4.</b> Número de cepas de enterococos (%) isoladas de <i>P. aethereus</i> e <i>S. leucogaster</i> com perfil de resistência aos antimicrobianos .....	33
<b>Tabela 5.</b> Número de cepas de enterococos (%) isoladas de <i>P. aethereus</i> e <i>S. leucogaster</i> sensíveis e tolerantes ao arsênio .....	35
<b>Tabela 6.</b> Relação das cepas avaliadas quanto à tolerância genotípica e fenotípica ao arsênio .....	37
<b>Tabela 7.</b> Número de cepas de enterococos (%) isoladas de <i>P. aethereus</i> e <i>S. leucogaster</i> com genótipo positivo para fatores de virulência .....	40

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estuário da Foz do Rio Doce antes e depois do rompimento da barragem de Fundão .....	6
<b>Figura 2.</b> Aves da espécie <i>Phaethon aethereus</i> no Arquipélago dos Abrolhos .....	11
<b>Figura 3.</b> Aves da espécie <i>Sula leucogaster</i> no Arquipélago dos Abrolhos .....	12
<b>Figura 4.</b> Ilhas do Arquipélago dos Abrolhos .....	24
<b>Figura 5.</b> Cepas inoculadas em ágar suplementado com concentrações de arsenato de sódio .....	35

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{g}$	microgramas
$\mu\text{L}$	microlitro
$\mu\text{M}$	micromolar
mM	milimolar
mL	mililitro
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
IUCN	<i>International Union for Conservation of Nature</i>
MIC	Minimal inhibitory concentration
PCR	Polymerase chain reaction
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

## 1. INTRODUÇÃO

Os impactos das atividades antrópicas afetam diretamente a fauna e a flora silvestre, assim como os microrganismos. No Brasil, a mineração de metais de interesse comercial, têm contribuído com a liberação de rejeitos que se constituem como uma das principais formas de contaminação do solo e da água por metais pesados (Matta, 2001).

Em novembro de 2015, o Brasil sofreu um dos maiores desastres ambientais de sua história, quando houve o rompimento da barragem de Fundão construída para reter 50-60 milhões de metros cúbicos de rejeitos de minério de ferro, localizada no município de Mariana, Minas Gerais. Este rompimento liberou cerca de 45 milhões de m<sup>3</sup> de rejeitos de mineração, compostos, principalmente, por arsênio (As), cádmio (Cd), chumbo (Pb), mercúrio (Hg) e ferro (Fe). A lama dos rejeitos de minérios foram lançados no meio ambiente, contaminando rios, incluindo o Rio Doce que deságua no litoral do Espírito Santo, e o Oceano Atlântico, atingindo o arquipélago dos Abrolhos, situado na Bahia (Coimbra *et al.*, 2020; IBAMA, 2015).

Diversos estudos foram realizados após o rompimento da barragem, objetivando avaliar como a biodiversidade aquática do Arquipélago havia sido afetada pela presença dos rejeitos oriundos do rompimento da barragem. Nesses estudos, foram observadas concentrações de metais pesados em peixes, corais, macrofauna bentônica e, recentemente, em penas e sangue de aves marinhas silvestres das espécies *Phaethon aethereus* (grazina-de-bico-vermelho) e *Sula leucogaster* (atobá-marrom) que se reproduzem e se alimentam ao redor das colônias de Abrolhos (Cardoso *et al.*, 2022; Gabriel *et al.*, 2020; Nunes *et al.*, 2022).

Quando o hospedeiro é exposto a pressões antropogênicas, a comunidade microbiana intestinal pode se adaptar a essas situações estressantes. Entre as bactérias membros da microbiota comensal do trato gastrointestinal de uma ampla variedade de animais, está o gênero *Enterococcus*, membro da família Enterococcaceae pertencente ao filo Firmicutes. *Enterococcus* é um gênero ubíquo, sendo também encontrada no solo, água, plantas e alimentos. Devido a sua ampla distribuição nos diferentes ambientes, este gênero tem sido empregado como bioindicador ambiental, para avaliar o potencial de risco dos poluentes ambientais

sobre a saúde humana e de diversos ecossistemas terrestres e marinhos.

Ao investigar a microbiota do trato gastrointestinal de animais silvestres, é possível obter informações valiosas sobre o ambiente e a fisiologia do hospedeiro, que podem servir como indicadores de perturbação do ecossistema. Até o momento, estudos avaliando o perfil de resistência aos antimicrobianos e tolerância aos metais pesados de enterococos do trato gastrointestinal de aves marinhas de Abrolhos, são inexistentes. Sob uma perspectiva, o presente estudo centrou-se na avaliação dos perfis de resistência antimicrobiano e de tolerância aos metais pesados em enterococos obtidos a partir de amostras cloacais de duas aves marinhas comumente encontradas em Abrolhos: a grázina-de-bico-vermelho (*Phaethon aethereus*) e a atobá-marrom (*Sula leucogaster*), as quais se reproduzem em Abrolhos e se alimentam ao redor das colônias.

Desse modo, mais inferências poderão ser feitas sobre como a microbiota intestinal de espécies de aves que habitam essa região foram indiretamente afetadas pelo derramamento.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar a resistência aos antimicrobianos e a tolerância aos metais pesados em *Enterococcus* spp. isolados em amostras cloacais de aves marinhas das espécies *Phaethon aethereus* (grazina-de-bico-vermelho) e *Sula leucogaster* (atobá-marrom) coletadas no arquipélago dos Abrolhos, a fim de entender como as ações antrópicas impactaram a microbiota intestinal dessas aves.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o perfil fenotípico e genotípico de resistência aos antimicrobianos em enterococos isolados das cloacas de *P. aethereus* (grazina-de-bico-vermelho) e *S. leucogaster* (atobá-marrom);
- Avaliar a presença de genes de tolerância aos metais, tais como arsênio (As), cobre (Cu) e mercúrio (Hg), e o perfil fenotípico de tolerância ao arsênio e mercúrio em enterococos isolados das cloacas de *P. aethereus* (grazina-de-bico-vermelho) e *S. leucogaster* (atobá-marrom);
- Detectar a presença de genes codificadores de virulência em enterococos isolados das cloacas de *P. aethereus* (grazina-de-bico-vermelho) e *S. leucogaster* (atobá-marrom);
- Correlacionar os dados observados de tolerância aos metais pesados e resistência aos antimicrobianos com os impactos antrópicos no Arquipélago dos Abrolhos.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Mineração no Brasil

Os recursos minerais sempre desempenharam um papel crucial na economia nacional, estabelecendo uma íntima relação com a História do Brasil (Farias; Eugênio, 2002). Contudo, conforme as atividades de mineração foram se expandindo no Brasil, foi possível verificar uma correlação com o aumento do desmatamento e a descaracterização do solo e poluição das águas com a produção de rejeitos (Matta, 2001).

Na mineração, os rejeitos são subprodutos, não relevantes comercialmente, do material processado resultante da separação dos minerais - de valor comercial como níquel, ouro e ferro - da rocha ou solo nos quais estão contidos (GTR, 2020). Esses rejeitos podem ter, além de outros contaminantes, concentrações de metais pesados como: arsênio (As), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cobre (Cu), mercúrio (Hg) e ferro (Fe).

A disposição de rejeitos é o que gera maior conflito na atividade de mineração, uma vez que esses resíduos possuem potencial elevado de contaminação e degradação ao meio ambiente. Entre os métodos de disposição, as barragens de contenção são as mais utilizadas (IBRAM, 2016). No Brasil, atualmente, há o registro de 769 barragens de rejeito, das quais 425 estão incluídas na Política Nacional de Segurança de Barragens (PNSB) e 344 não estão. Ao analisar os acidentes ocorridos na América do Sul, constatou-se que o Brasil é o país com maior número de ocorrências, sendo que a maioria delas ocorreu durante a década de 2010 (Neto *et al.*, 2022).

Metais pesados não são biodegradáveis, o que resulta no aumento de sua concentração, acumulação em todos os níveis tróficos, e, conseqüentemente, pode causar efeitos agudos ou crônicos de toxicidade em organismos vivos por vários anos (Gautam *et al.*, 2016).

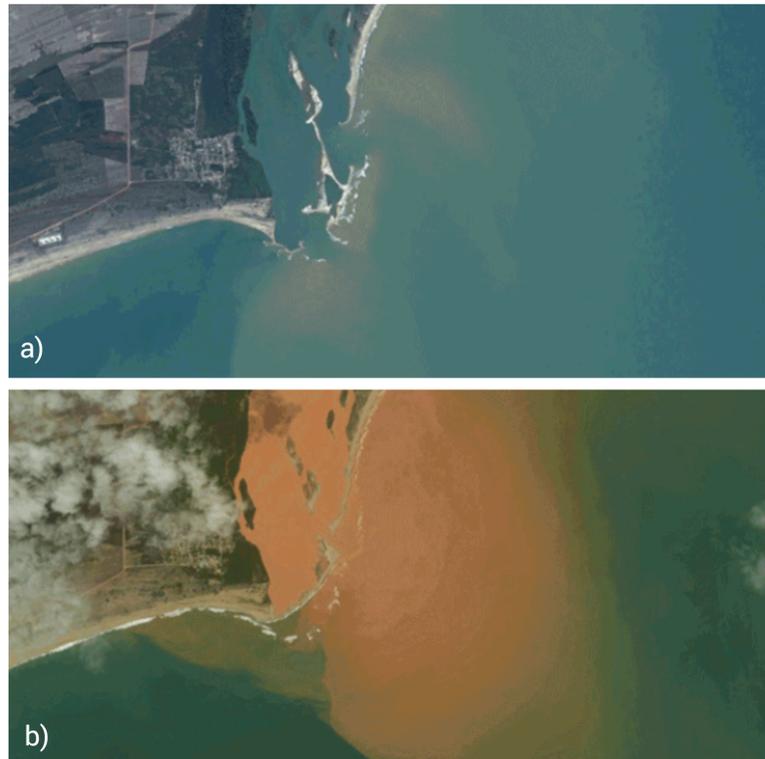
### 3.2 O rompimento da barragem de Fundão

Em 5 de novembro de 2015, um desastre de grandes consequências ambientais, sociais e econômicas ocorreu no município de Mariana, Minas Gerais, em decorrência do rompimento da barragem de Fundão da mineradora Samarco. A barragem de Fundão foi construída para reter 50-60 milhões de metros cúbicos de rejeitos de minérios, tais como Fe, As, Cd, Hg, Cu, Pb e outros (Hatje *et al.*, 2017).

Com o seu rompimento, cerca de 45 milhões de metros cúbicos de rejeitos foram liberados no meio ambiente soterrando o subdistrito de Bento Rodrigues e percorreram 663,2 km de cursos d'água, contaminando os rios Gualaxo do Norte, do Carmo e Doce, deixando um rastro de destruição até o litoral do Espírito Santo (IBAMA, 2015), contaminando o Oceano Atlântico e atingindo o arquipélago dos Abrolhos, localizado a 200 km ao norte (Coimbra *et al.*, 2020) (Figura 1).

Uma pesquisa conduzida por Gabriel *et al.* (2021) constatou que, mesmo após 4,5 anos do desastre de Mariana, as concentrações de As, Cr, Cu, Ni ainda permaneciam acima dos níveis considerados tóxicos no estuário da Foz do Rio Doce. No estuário do Rio Doce, transição do ambiente terrestre e marinho, estudos relataram o aumento da concentração de metais na macrofauna bentônica, em larvas de peixes (Bernardino *et al.*, 2019; Bonecker *et al.*, 2019; Gomes *et al.*, 2017), além da diminuição na diversidade de crustáceos (Oliveira-Filho *et al.*, 2023).

Na costa marinha adjacente à Foz do Rio Doce, Bevitorio *et al.* (2022) observaram a contaminação de peixes marinhos por metais pesados. A correlação entre a bioacumulação de metais e os biomarcadores foi mais pronunciada em peixes carnívoros, apesar de terem sido observados danos bioquímicos e morfológicos similares em todos os níveis tróficos. Além disso, peixes coletados na costa próxima à Foz do Rio Doce apresentaram níveis mais elevados de Cr, Cu, As e Fe nos tecidos, especialmente durante o período chuvoso. Em aves costeiras, verificou-se que houve maiores concentrações de Pb, Hg, As e Cd nas penas e sangue de aves na expedição realizada no inverno. Além disso, os níveis de bioacumulação foram maiores no ponto coletado na Foz do Rio Doce (Zebral *et al.*, 2022).



Figuras 1: Estuário da Foz do Rio Doce antes e depois do rompimento da barragem de Fundão. a) Imagem de maio de 2014. b) imagem do mesmo local em 1 de dezembro de 2015 (Foto: Google Earth)

### 3.3 Metais pesados e bioacumulação no ecossistema marinho

Nas últimas décadas, pesquisadores têm oferecido diferentes definições para conceituação de metal pesado, que levam em conta tanto aspectos químicos quanto ambientais e toxicológicos. Segundo Alloway (2013), o termo "metal pesado" é utilizado para se referir a uma ampla variedade de elementos, incluindo metais, semimetais e não metais, com uma densidade atômica superior a  $6 \text{ g cm}^{-3}$ . Em um relatório técnico apresentado à União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), foram relatados os resultados de uma extensa revisão bibliográfica sobre as definições de metal pesado por Duffus (2002). Em relação às propriedades químicas, as principais definições tiveram como critério as elevadas: massa específica, massa atômica e número atômico. Contudo, o termo "metal pesado" tem sido utilizado em diversas publicações e leis para se referir a um conjunto de metais e semimetais que estão associados à contaminação e possuem potencial de

toxicidade aos organismos, que, na maioria das vezes, está ligada à sua concentração.

Sendo assim, os metais pesados podem ser subdivididos em duas categorias: Os elementos Mn, Fe, Co, Cu, Zn e Mo são essenciais para o crescimento e os ciclos de vida dos organismos, porém se tornam tóxicos em altas concentrações (Khaled, 2004). Já As, Cd, Pb e Hg possuem alta toxicidade, mesmo em concentrações baixas, e seu acúmulo no organismo pode levar ao desenvolvimento de doenças graves, como câncer (Bremner, 1998).

Os ecossistemas marinhos são vulneráveis à contaminação por metais pesados, sendo considerados os principais poluentes inorgânicos do meio ambiente devido à sua mobilidade nos ecossistemas aquáticos e alto potencial de toxicidade (Gautam *et al.*, 2016). A presença desses contaminantes pode provocar alterações significativas no meio ambiente, impossibilitando a restauração das condições naturais prévias. A intensificação da atividade humana nos ecossistemas marinhos também contribui para o aumento da pressão sobre os recursos disponíveis, afetando a saúde dos organismos e causando modificações na teia alimentar. Essa pressão também influencia a bioacumulação de contaminantes em plantas e animais marinhos, ampliando ainda mais os danos causados. A presença de concentrações excessivas de metais tóxicos pode resultar em disfunção do sistema endócrino, da reprodução e do crescimento (Hylland, 2006).

Além disso, esses metais podem se acumular nos tecidos e órgãos dos organismos, prejudicando as funções celulares quando interagem com enzimas sistêmicas. Essa interação pode levar a distúrbios no crescimento, na reprodução, no sistema imunológico e no metabolismo (Jakimska *et al.*, 2011).

### **3.4 O Parque Nacional Marinho dos Abrolhos**

O Parque Nacional Marinho dos Abrolhos (PARNA MAR Abrolhos) é uma Unidade de Conservação de proteção integral e o primeiro Parque Nacional Marinho criado no Brasil. Desde abril de 1983, os 87.943 hectares da Unidade de Conservação ajudam a proteger ecossistemas marinhos de extrema relevância ecológica. É administrado pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da

Biodiversidade - ICMBio, autarquia federal ligada ao Ministério do Meio Ambiente.

O PARNA MAR Abrolhos abrange duas áreas que não estão conectadas: uma que protege o Recife de Timbebas, localizado entre os municípios de Alcobaça e Prado e faz parte do arco recifal costeiro do Banco dos Abrolhos, e outra que fica a cerca de 70 quilômetros da cidade de Caravelas e inclui o Arquipélago dos Abrolhos - composto pelas ilhas Redonda, Siriba, Sueste, Guarita e Santa Bárbara (esta última não faz parte do parque e está sob a jurisdição da Marinha do Brasil) e também o Parcel dos Abrolhos, um complexo de milhares de chapeirões, que são estruturas recifais únicas encontradas exclusivamente no Banco dos Abrolhos (ICMBio, 2023).

Possui a maior biodiversidade marinha do Atlântico Sul, abrigando 1.300 espécies, sendo 45 ameaçadas de extinção segundo listas da União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN) e do Ministério do Meio Ambiente (MMA). Dentre as espécies ameaçadas podemos citar o coral-fogo (*Millepora alcicornis*), o coral-cérebro (*Mussismilia braziliensis*), a anêmona-gigante (*Condylactis gigantea*), a baleia-franca-austral (*Eubalaena australis*), o tubarão-limão (*Negaprion brevirostris*), três espécies de tartarugas marinhas (*Caretta caretta*, *Eretmochelys imbricata*, *Chelonia mydas*), e as aves marinhas grazina-de-bico-amarelo (*Phaethon lepturus*) e grazina-de-bico-vermelho (*Phaethon aethereus*).

### **3.4.1 Impactos do colapso da barragem de Fundão em Abrolhos**

O Parque Nacional Marinho dos Abrolhos está localizado há 200 km da foz do Rio Doce. Evangelista *et al.* (2023), observaram um aumento nas concentrações de B, P, Mn, Ga, As, Y, Ba, Hb, Tm, Fe, Mn, Zn e Cu em corais de Abrolhos. Cardoso *et al.* (2022) também identificaram mudanças nos recifes de corais de Abrolhos, observando diminuição nas taxas de crescimento dos corais da espécie *Montastraea cavernosa* (Linnaeus 1767), o pico de Fe registrado no início de 2016 e o aumento dos metais Pb, Sr, V, Y e Zn após o desastre, evidenciando a associação com o rompimento da barragem de Fundão.

Estudos mostraram que a biodiversidade marinha foi afetada pela lama de rejeitos da barragem de Fundão como, por exemplo, o cnidário *Kishinouyea corbini*

Larson 1980 (Staurozoa), espécie extremamente rara, com uma distribuição conhecida que se sobrepõe a área ameaçada pelo desastre (Miranda; Marques, 2016). Uma pesquisa desenvolvida por Tognella *et al.* (2022) indicou o aumento na concentração dos metais Fe e Mn em manguezais. Importantes ecossistemas de transição entre o ambiente terrestre e marinho que servem de abrigo e reprodução para diversas espécies de peixes, moluscos, crustáceos e apresentam conexão com os recifes de corais de Abrolhos. Estudos também foram realizados para avaliar a presença de metais pesados nas penas e sangue de aves marinhas silvestres que se reproduzem em Abrolhos e se alimentam ao redor das colônias (Nunes *et al.*, 2022).

### 3.5 Aves Marinhas

As aves marinhas podem desempenhar o papel de sentinelas, refletindo as transformações antropogênicas na saúde do ecossistema marinho, e podem ser utilizadas como bioindicadores de alterações ambientais (Furness; Camphuysen, 1997; Piatt; Sydeman, 2007; Rajpar *et al.*, 2018). Devido à posição de destaque que ocupam na cadeia alimentar, as aves marinhas estão expostas a diversos tipos de contaminantes, principalmente, por meio da alimentação (Carvalho *et al.*, 2013).

Diversos fatores comprometem a saúde das aves marinhas, contribuindo para a descrição de muitas espécies como ameaçadas de extinção, dentre eles destacam-se: poluição por plásticos, introdução de espécies invasoras, mudanças climáticas, viroses, bactérias resistentes e bioacumulação por metais tóxicos (Brentano *et al.*, 2020; Ewbank *et al.*, 2022; Fernandes *et al.*, 2007; Hall, 2021; Martini *et al.*, 2022; Niemeyer *et al.*, 2017; Sarmiento *et al.*, 2014). Do total de 346 espécies de aves marinhas que ocorrem no mundo, 114 (33%) estão globalmente ameaçadas de extinção e 10% estão listadas como quase ameaçadas (Croxall *et al.*, 2012). O Brasil abriga cerca de 150 espécies de aves marinhas, mas apenas 18 dessas espécies nidificam no país (Branco *et al.*, 2004).

Um importante ecossistema marinho que serve de sítio reprodutivo para milhares de indivíduos de aves marinhas é o arquipélago dos Abrolhos. Sete espécies de aves nidificam no arquipélago, são elas: *Anous stolidus* com cerca de

4725 indivíduos, *Sula dactylatra* (~1600), *Fregata magnificens* (~860), *Phaethon aethereus* (~540), *S. leucogaster* (~500), *Onychoprion fuscatus* (~20) e *P. lepturus* (~2) (Mancini *et al.* 2016).

### 3.5.1 *Phaethon aethereus*, grazina-de-bico-vermelho

*Phaethon aethereus* (Linnaeus, 1758) chamada popularmente de grazina-de-bico-vermelho ou rabo-de-palha-de-bico-vermelho é uma ave tropical pertencente à família Phaethontidae e à ordem Phaethontiformes possuindo três subespécies. A subespécie *Phaethon aethereus aethereus* se reproduz em ilhas no Atlântico ao sul do equador, incluindo Ascensão e Santa Helena na Dorsal Meso Atlântica, e em águas brasileiras nos arquipélagos de Fernando de Noronha e Abrolhos (Alves *et al.*, 2004; Orta, 1992) (Figura 2).

Abrolhos é a maior colônia de *P. aethereus* do Brasil, com cerca de 540 indivíduos (Antas, 1991, Mancini *et al.*, 2016), e a população mais ao sul do Atlântico Oeste. A espécie está atualmente em perigo (EN) na Lista Vermelha do Brasil devido ao seu pequeno tamanho populacional, área restrita de reprodução e presença de predação dos ninhos por espécies invasoras (Efe *et al.*, 2018), sendo registrada uma taxa de 50% de predação por ratos, o que pode comprometer a persistência dessa população nos próximos anos (Sarmiento *et al.*, 2014).

*Phaethon aethereus* é uma espécie oceânica que geralmente procura alimento de forma solitária ou em pares. Eles capturam suas presas mergulhando na água, podendo atingir profundidades de 3 a 4 metros (Orta, 1992). Em estudo realizado por Serrano e Azevedo-Júnior (2005) foram analisados 17 regurgitos de *P. aethereus* do arquipélago dos Abrolhos. As presas identificadas foram peixes das famílias Clupeidae (35%), Carangidae (12%), Scombridae (12%), Exocoetidae (10%), Belonidae (5%), Haemulidae (2%) e lulas da família Loliginidae (10%). Quanto à porcentagem de hábitos das presas identificadas, 49% apresentavam hábitos costeiros, 12% oceânicos, 10% oceânicos/costeiros, 10% bentônicos e 5% recifais. *Phaethon aethereus* mostrou menos presas em relação à diversidade quando comparada com outras aves do estudo, porém sua distribuição nas amostras é mais uniforme, o que aumenta o valor do índice.

Outros pesquisadores analisaram a dieta de *P. aethereus* ao redor do mundo. Nas ilhas Madeleine, Senegal e *St. Eustatius National Marine Park*, Caribe foram identificadas a predominância das famílias de peixes bentônicos Exocoetidae e Belonidae (Diot *et al.*, 2018; Madden *et al.*, 2022). Castillo-Guerrero *et al.* (2011) analisaram a dieta e o comportamento de forrageamento da espécie no golfo da Califórnia nos anos de 2004 e 2007. Observaram que adultos entregaram diferentes espécies de presas para seus filhotes, sendo as predominantes: a espécie de peixe *Fodiator acutus rostratus*, membro da família Exocoetidae e lulas *Loliolopsis diomedea*.



Figura 2: Aves *Phaethon aethereus* no Arquipélago dos Abrolhos. (Foto: Guilherme Tavares Nunes)

### 3.5.2 *Sula leucogaster*, atobá-marrom

*Sula leucogaster* (Boddaert, P 1783) tem como nomes populares atobá-marrom e atobá-pardo, pertence à família Sulidae e à ordem Pelecaniformes (Figura 3). É uma ave característica dos mares tropicais e subtropicais, inclusive das costas e mares brasileiros. Ocorre no Sudeste e Nordeste do Brasil. Em Abrolhos reproduz-se durante todo ano principalmente nas ilhas Sueste, Redonda e Santa Bárbara (Alves *et al.*, 2000). Fica em bando em cima de barcos de pesca, forrageando áreas que estão localizadas ao redor das colônias e tende a explorar os

arredores imediatos da colônia (Miller *et al.*, 2018a; Weimerskirch *et al.*, 2009).

No arquipélago dos Abrolhos, Alves *et al.* (2004) observaram cinco famílias de peixes em dezessete amostras de regurgitos de *S. leucogaster*, sendo a mais comum Exocoetidae (84,6%), em sequência Carangidae (6,4%), Clupeidae (5,1%), Belonidae (2,6%) e Scombridae (1,3%). *Hemiramphus brasiliensis* foi o mais explorado. A abundância de espécies de presas foi relatada segundo um estudo mais recente realizado por Jacoby *et al.* (2023). A espécie mais explorada foi *Hemiramphus brasiliensis* (37,5%), seguida de *Caranx hippos* (11,72%), *Opisthonema oglinum* (10,57%), *Paraexocoetus brachypterus* (10,57%), *Hemiramphus balao* (8,59%), pertencentes às famílias Hemiramphidae, Carangidae, Clupeidae e Exocoetidae.

Nunes *et al.* (2018), analisaram o material regurgitado por atobás-marrom das Ilhas São Pedro e São Paulo. Todas as presas foram identificadas a nível de espécie, sendo os peixes *Exocoetus volitans* e *Oxyporhamphus micropterus* os mais abundantes, seguidos por *Hirundichthys afnis*, *Cheilopogon cyanopterus*, *Prognichthys gibbifrons*, *Euleptorhamphus velox*, e a lula *Ommastrephes bartramii*. Castillo-Guerrero *et al.* (2016) avaliaram a diferença entre os sexos em relação às estratégias de forrageamento e dieta no golfo da Califórnia. Apenas uma das dezoito variáveis avaliadas apresentou diferença significativa inter-sexual: as fêmeas apresentaram uma média maior de profundidade de mergulho solitário. Em relação a dieta, fêmeas e machos apresentaram o mesmo tipo de presa como preferência na maioria dos anos avaliados.



Figura 3: Aves *Sula leucogaster* no Arquipélago dos Abrolhos. (Foto: Guilherme Tavares Nunes)

### **3.5.3 Efeitos ecológicos do colapso de Fundão em *P. aethereus* e *S. leucogaster***

Os possíveis impactos ecológicos do rompimento da barragem de Fundão em *P. aethereus* e *S. leucogaster* de Abrolhos foram avaliados por Nunes *et al.* (2022), antes e depois da tragédia. As aves marinhas continuaram utilizando áreas e recursos alimentares, sem que tenha sido observada uma mudança significativa em suas estratégias de forrageamento. A análise dos elementos traços foi feita a partir do isolamento de isótopos estáveis de penas e sangue das aves. Em *P. aethereus* observou-se o aumento de arsênio (As) no sangue e nas penas, assim como ferro (Fe), manganês (Mn), cádmio (Cd) e chumbo (Pb) no sangue. Já em *S. leucogaster* houve um aumento de As no sangue e de Cd nas penas, sugerindo que as presas de ambas as aves estão contaminadas com elementos de rejeitos.

Até o momento inexistem estudos sobre os efeitos dos impactos antrópicos da barragem de Fundão sobre as bactérias que compõem a microbiota intestinal das aves marinhas de Abrolhos. É sabido que a adaptação e persistência das espécies animais em ambientes impactados têm sido associadas a fatores comportamentais, fisiológicos e anatômicos, bem como à composição e função da microbiota.

### 3.6 O gênero *Enterococcus*

Enterococos são bactérias Gram-positivas com morfologia celular de cocos isolados ou arranjados aos pares ou em cadeias curtas. Possuem metabolismo fermentativo produzindo apenas ácido láctico a partir da fermentação da glicose, além de poder fermentar carboidratos como manitol, sorbose, arabinose, sorbitol, bem como hidrolisar esculina (Gilmore *et al.*, 2014). Bactérias anaeróbias facultativas, não emitem gases e testam negativo para catalase (Ogier; Serror, 2008). Apresentam uma temperatura ideal de crescimento de 35-37 °C, porém conseguem suportar variações entre 10-45 °C. Demonstram capacidade de desenvolver em meios com pH entre 4.5 e 10.0, além de tolerarem concentrações de 6,5% de NaCl no meio. Além disso, a utilização de azida como agente seletivo para isolamento e bile esculina no meio de cultura para diferenciação e identificação presuntiva de enterococos é frequente (Devriese *et al.*, 1993b; 1995; Domig *et al.*, 2003).

O gênero *Enterococcus* pertence à família Enterococcaceae, ao Filo Firmicutes e, atualmente, estão descritas 80 espécies pertencentes ao gênero (Schwartzman *et al.*, 2023). A origem dos enterococos ocorreu a aproximadamente 400 milhões de anos atrás, coincidindo com o surgimento dos primeiros animais terrestres (Lebreton *et al.*, 2017). Esses microrganismos possuem a habilidade de sobreviverem em diferentes ambientes, mesmo sob condições adversas, podendo ser encontrados no solo, água, plantas, alimentos e no trato gastrointestinal (TGI) de uma variedade de animais invertebrados e vertebrados, incluindo seres humanos (Byappanahalli *et al.*, 2012; Lebreton *et al.*, 2014). A combinação entre a capacidade de sobreviver em diversos ambientes e a facilidade de aquisição de mecanismos de resistência e virulência (Shepard; Gilmore, 2002), os torna microrganismos sentinelas de poluição ambiental.

Com base nisso, vários estudos foram conduzidos para avaliar a diversidade e a resistência a antimicrobianos em enterococos encontrados em animais silvestres. As espécies comumente observadas no TGI são *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. hirae*, *E. durans*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* e *E. mundtii* (da Silva Heck *et al.*, 2021; Grassotti *et al.*, 2018; Huff *et al.*, 2020; Lebreton *et al.*, 2014; Oliveira de Araújo *et al.*, 2020). Além disso, *Enterococcus* spp. têm sido utilizados como

bioindicadores de saúde animal e do ecossistema em ambientes possivelmente afetados por metais pesados como As, Co, Cu, Hg, Pb e Zn (Aktan *et al.*, 2013; da Silva *et al.*, 2012; Ji *et al.*, 2012; Niederhäusern *et al.*, 2013; Novais *et al.*, 2018; Rebelo *et al.*, 2021; Ture *et al.*, 2018; Vignaroli *et al.*, 2018).

Em humanos, apesar de fazerem parte da microbiota comensal (do TGI, cavidade oral e do trato geniturinário), bactérias do gênero *Enterococcus* também são relatadas como um problema na área clínica, responsáveis por infecções hospitalares graves, sendo consideradas patógenos oportunistas (Clewell *et al.*, 2014). As espécies *E. faecium* e *E. faecalis* são as mais frequentemente associadas com humanos (Moellering, 1992; Morrison *et al.*, 1997).

### 3.6.1 *Enterococcus* spp. isolados de aves marinhas

Pesquisadores avaliaram a distribuição de *Enterococcus* isolados de aves marinhas. Em estudo recente, Prakash *et al.* (2022) coletaram amostras cloacais de trinta-réis-ártico (*Sterna paradisaea*), aves marinhas migratórias, antes e depois da migração. Das bactérias cultiváveis isoladas, 7% e 6% pertenciam a *Enterococcus* spp. antes e depois da migração, respectivamente.

Em amostras fecais de pinguim-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*), Trinta-réis-de-coroa-branca (*Sterna trudeaui*) e pernilongo-de-costas-brancas (*Himantopus melanurus*) coletadas no litoral do Rio Grande do Sul, Prichula *et al.* (2016) identificaram *E. faecalis*, *E. faecium* e *E. hirae* como mais abundantes. A prevalência de *E. faecalis* também foi observada em aves atobá-mascarado (*Sula dactylatra*) e pardela (*Puffinus nativitatis*) da Ilha de Páscoa no Chile, seguidas por *E. faecium* e *E. casseliflavus/gallinarum* (Ardiles-Villegas *et al.*, 2011), assim como em amostras fecais de gaivotas de uma praia urbana da Califórnia, onde o percentual de *E. faecalis* foi de 52%, seguidas por *E. faecium* (33%), *E. casseliflavus* (25%), *E. hirae*, *E. avium*, *E. gallinarum* e *E. durans* com 8% cada (Layton *et al.*, 2010). Radouahni *et al.* (2011) isolaram 54 cepas de enterococos de amostras fecais de gaivotas (*Larus cachinnans*) de Berlengas Natural Reserve em Portugal, observando predomínio de *E. faecium* (52,4%), seguidos por *E. faecalis* (11,9%) e *E. hirae* (7,1%).

O perfil de resistência a antibióticos em enterococos isolados de aves marinhas foi avaliado em alguns estudos. Choi *et al.* (2003) analisaram 498 enterococos isolados de amostras fecais de gaivotas em Huntington Beach, Califórnia. Desses, todos apresentaram resistência para dois ou até sete antibióticos: ampicilina, eritromicina, clortetraciclina, tetraciclina, oxitetraciclina, estreptomicina e salinomicina. No estudo feito por Radhouani *et al.* (2011) altos percentuais de resistência a eritromicina (92,5%) também foram identificados em amostras fecais de gaivotas, e a presença de *ermB* foi detectada em 65% desses isolados.

O estudo de Prichula *et al.* (2016) identificou 36 padrões de resistência antimicrobiana nos enterococos isolados de aves marinhas. Em pinguins-de-magalhães foram observados alta frequência dupla (32,35%) ou múltipla (26,47%) de resistência aos antibióticos. Smith *et al.* (2019), analisaram a resistência a antibióticos em amostras fecais de aves marinhas de diferentes localidades da Austrália. Dentre elas, na Ilha Adele, das 9 amostras de atobá-mascarado (*Sula dactylatra*) e das 20 de rabiforcado-pequeno (*Fregata ariel*) apenas em duas, uma em cada espécie de ave, ocorreu a presença de *Enterococcus* spp., sendo estas resistente aos antibióticos: ciprofloxacina, eritromicina, gentamicina, estreptomicina e vancomicina. Não foram encontrados enterococos em nenhuma das 16 amostras coletadas de atobá-marrom (*Sula leucogaster*).

Até o momento, não há estudos que avaliaram a resistência a metais pesados em *Enterococcus* spp. provenientes de aves marinhas.

### **3.6.2 Resistência a metais pesados em *Enterococcus* spp.**

As concentrações baixas de alguns metais, como cobalto, cobre, níquel e zinco, são essenciais para diversos processos celulares das bactérias. No entanto, quando esses metais estão em concentrações elevadas, podem se tornar tóxicos para as células. Por outro lado, metais pesados como arsênio, chumbo, cádmio, mercúrio, prata e cromo não possuem nenhum efeito benéfico conhecido nas células bacterianas e são tóxicos mesmo em concentrações baixas (Nies, 2004).

O desenvolvimento de resistência bacteriana a metais tóxicos tem sido observado em diversos grupos bacterianos devido às pressões seletivas presentes

no ambiente (Rouch *et al.*, 1995). A extensão da resistência aos metais em um microrganismo é determinada por vários fatores, incluindo os mecanismos de absorção de metal, o papel do metal no metabolismo e a presença de genes que controlam a resistência em plasmídeos, cromossomos ou transposons (Bruins *et al.*, 2000).

Postula-se que seis mecanismos estão envolvidos na resistência a metais: (1) Exclusão de metais por barreira de permeabilidade; (2) Transporte ativo do metal para longe da célula/organismo; (3) Sequestro intracelular do metal por ligação a proteínas; (4) Sequestro extracelular; (5) Desintoxicação enzimática do metal para uma forma menos tóxica; (6) Redução na sensibilidade de metais no sítio alvo (Silver, 1992; Rouch *et al.*, 1995).

As bombas de efluxo são amplamente utilizadas pelos microrganismos para resistir a metais tóxicos, como o arsênio e o cobre, empregando mecanismos de transporte ativo para eliminar esses metais do citoplasma. Esses mecanismos podem estar presentes no cromossomo ou no plasmídeo do microrganismo (Silver *et al.*, 1989; Nies; Silver, 1995). A resistência ao mercúrio é um exemplo modelo de um sistema de desintoxicação enzimática para uma forma menos tóxica do metal em microorganismos. Tanto bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas demonstram resistência a Hg(II) (Misra, 1992).

### **3.6.2.1 Mecanismos de resistência ao arsênio (As)**

O operon *ars* codifica tanto uma bomba de fluxo de ATPase quanto a enzima de desintoxicação redutase de arsenato, ou seja, ele é responsável pela desintoxicação do arsenato As (V) para arsenito As (III) (Kruger *et al.*, 2013). O operon *ars* pode existir tanto na forma de *arsRDABC* quanto *arsRBC*, em plasmídeo bacteriano e cromossomo (Tsai *et al.*, 2009). O gene *arsA* codifica uma ATPase induzida por arsenito e antimônio. ArsB, bomba de expulsão codificada pelo gene *arsB*, age sinergicamente com ArsA, que é uma ATPase, sendo responsável pelo efluxo de arsênio. Além disso, ArsY também pode se unir a ArsA, fazendo esse papel (Sunita *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2015).

O gene *arsC* codifica a arsenato redutase, que reduz o As(V) intracelular

para a forma mais tóxica As(III) (Nies; Silver, 1995). O As(III) é então removido do organismo por uma bomba de efluxo codificada por outros genes no operon *ars*. A redução de As (V) também é realizada pela redutase periplasmática dissimilatória de arsenato (codificada pelo operon *arr*), que transfere um elétron terminal para o As (V) e promove o crescimento das bactérias em condições anaeróbicas (Sarkar *et al.*, 2013).

Os genes *arsR* e *arsD* são responsáveis pela regulação do operon. O gene *arsR* atua como um repressor, enquanto o gene *arsD* age como um regulador secundário da transcrição (Bruins *et al.*, 2000). Além disso, novos genes foram relatados recentemente como via alternativa de expressão do operon *ars*, como: *arsM*, responsável pela codificação de uma metiltransferase Adenosilmetionina-As(III); *arsI*, responsável pela codificação de uma ligase C-As; e *arsH*, responsável pela codificação de uma oxidase de metilarsenito (Yang; Rosen, 2016).

### 3.6.2.2 Mecanismos de resistência ao cobre (Cu)

O operon *tcrYAZB* é adquirido no plasmídeo, sendo comumente encontrado em proximidade a um conjunto de genes *cueO*, que codificam uma enzima multicopper oxidase que presumidamente tem papel na conversão de Cu<sup>+</sup> para Cu<sup>2+</sup> durante condições aeróbicas, visando desintoxicação (Ladomersky; Petris, 2015). O gene *tcrB* (*transferable copper resistance gene B*) é um dos constituintes do operon e codifica uma bomba de efluxo do subgrupo P1B-3-ATPase, que é ativada por Cu<sup>2+</sup> e, em menor medida, Cu<sup>+</sup> (Arguello, 2003).

O gene *tcrB* tem sido altamente estudado em isolados de *Enterococcus* spp. (Amachawadi *et al.*, 2010; da Silva *et al.*, 2012; Hasman *et al.*, 2002; Mourão *et al.*, 2016b; Vignarolli *et al.*, 2018). Sendo descrito como associado ao gene *ermB* e *vanA*, que conferem resistência à eritromicina e vancomicina respectivamente. Também estão relacionados com os antibióticos ampicilina, tetraciclina, vancomicina e aminoglisídeos (Hasman *et al.*, 2002; Silveira *et al.*, 2014; Pasquaroli *et al.*, 2014). A co-ocorrência entre os genes *tcrB* e *cueO* também é relatada (Silveira *et al.*, 2014).

Outro operon responsável pelo mecanismo de resistência ao cobre é o

*copYZAB*, que contém quatro genes: *copY*, *copZ*, *copA*, *copB*, que atuam em conjunto até atingir o equilíbrio tolerável dos níveis do cobre na células (Lu; Solioz, 2002). O gene *copA* é responsável por codificar uma ATPase de captação de Cu(II), *copB* codifica uma ATPase de bomba de efluxo. Os produtos dos genes *copY* e *copZ* regulam o operon *cop* (Silver; Phung, 1996).

### 3.6.3 Resistência antimicrobiana em *Enterococcus* spp.

A resistência antimicrobiana é um fenômeno natural que antecede a existência dos humanos (D'Costa *et al.*, 2011). Antes mesmo do uso de antimicrobianos em tratamentos clínicos, as bactérias já haviam desenvolvido genes com a função original de oferecer defesa contra toxinas ou compostos naturalmente encontrados em seu ambiente, além de conferir redução na sensibilidade a antimicrobianos (Sengupta *et al.* 2013). No entanto, sua ocorrência tem sido severamente afetada por atividades antropogênicas (Wright, 2007). O uso excessivo de antibióticos e sua consequente liberação no meio ambiente têm gerado uma crescente preocupação com a disseminação de resistência aos mesmos, tanto para a saúde humana como para o ecossistema natural (Grenni *et al.*, 2018).

Dois tipos de formas de expressão de resistência são relatados em bactérias: resistência intrínseca, a qual está presente no cromossomo destas bactérias, e resistência adquirida, obtida através de elementos genéticos móveis como plasmídeos ou transposons (Miller *et al.*, 2014). *Enterococcus* são descritos como resistentes intrínsecos aos antimicrobianos:  $\beta$ -lactâmicos, cefalosporinas, aminoglicosídeos, lincosamidas, estreptograminas, trimetoprim-sulfametoxazol. Por outro lado, bactérias desse gênero também podem adquirir resistência a uma variedade de antimicrobianos, são eles:  $\beta$ -lactâmicos, aminoglicosídeos, glicopéptidicos (vancomicina), estreptograminas, linezolida, daptomicina, tigeciclina, macrolídeos, tetraciclina, cloranfenicol, fosfomicina, rifampicina e quinolonas (Hollenbeck; Rice, 2012).

A resistência a várias classes de agentes antimicrobianos é uma característica marcante dos enterococos (Kristich *et al.*, 2014). Devido à proximidade e abundância de microrganismos, o microambiente do TGI é bastante

favorável para a ocorrência de transferências gênicas e aquisição de elementos móveis entre diferentes espécies de bactérias (Hollenbeck; Rice, 2012).

### **3.6.3.1 Mecanismos de resistência aos macrolídeos (eritromicina)**

Os macrolídeos são um grupo de antibiótico bacteriostático que consistem em um anel de lactona conectado a dois resíduos de açúcar. A Eritromicina foi o pioneiro deste grupo e diversos outros medicamentos foram derivados a partir dele (Constant, 2015). Todos os membros dessa classe são capazes de inibir a síntese proteica, afetando posições específicas na subunidade 50S do RNA ribossômico. Especificamente, o domínio V do 23S RNAr é o alvo desses antimicrobianos (Gomes *et al.*, 2016).

A resistência dos enterococos frente aos macrolídeos pode ser adquirida por dois mecanismos: modificação do sítio de ação pelos genes *erm* e sistema bomba de efluxo pelos genes *mef* e *msrC*. Os genes *erm* codificam N-metiltransferases que metilam uma adenina no 23S rRNA, A2058, modificando o sítio-alvo de ação do antimicrobiano e impedindo sua interação (Schroeder; Stephens, 2016). Em *Enterococcus* spp. se destaca a presença do gene *ermB* que está localizado no transposon Tn551 (Leclercq *et al.*, 2002)

De acordo com Majdanik (2021), o desenvolvimento de resistência associada aos genes *msr* é altamente controverso. Até recentemente, acreditava-se que as proteínas codificadas agiam como uma bomba de efluxo. No entanto, evidências atuais sugerem que elas podem desempenhar o papel de proteínas protetoras, as quais, ao serem internalizadas com o ribossomo, promovem a separação do macrolídeo. O gene *msrC* é descrito como codificador de uma bomba de efluxo que confere baixa resistência contra macrolídeos e estreptograminas do tipo B, e tem alta prevalência em *E. faecium* (Portillo *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2001).

### **3.6.3.2 Mecanismos de Resistência às ansamicinas (rifampicina)**

As ansamicinas são uma família de antibióticos, que tem a rifampicina como um membro importante. O seu modo de ação é inibir a transcrição de mRNA

ligando-se à  $\beta$ -subunidade da RNA polimerase dependente de DNA (Wehrli *et al.*, 1968). A resistência à rifampicina na maioria das bactérias é causada por mutações nos códons 516, 526 ou 531 da sequência conservada do DNA do gene *rpoB*, que é responsável pela codificação da subunidade  $\beta$  da RNA polimerase (Goldstein, 2014). São identificadas mutações no gene *rpoB* que conferem resistência à rifampicina em diferentes espécies bacterianas. Além disso, em algumas situações, é observada a inativação enzimática da rifampicina (Kristich *et al.*, 2014). Cepas de *E. faecalis* e *E. faecium* resistentes à rifampicina são descritas carregando mutações na posição H486Y do gene *rpoB* (Kristich *et al.*, 2012).

### **3.6.3.3 Mecanismos de Resistência às quinolonas (ciprofloxacina e norfloxacina)**

Os antimicrobianos norfloxacina e ciprofloxacina, pertencentes à classe das quinolonas, têm ação de inibição sobre a atividade enzimática da DNA girase e topoisomerase IV, duas proteínas essenciais para a replicação do DNA. Essas enzimas são compostas por duas subunidades distintas cada: o complexo da girase do DNA é formado por GyrA e GyrB, enquanto ParC e ParE compõem a topoisomerase IV (Miller *et al.*, 2014). A resistência bacteriana às quinolonas se apresenta principalmente através de mutações que afetam a subunidade GyrA da DNA girase e a subunidade ParC da topoisomerase IV (Kanematsu *et al.*, 1998).

Outro mecanismo de resistência bacteriana às quinolonas é mediado por proteínas da família Qnr, que se ligam a DNA girase e a topoisomerase IV, protegendo-as do efeito inibitório das quinolonas sobre sua atividade. Essa proteção está condicionada à concentração de Qnr, sendo inversamente proporcional às concentrações de ciprofloxacina (Tran *et al.*, 2005).

### **3.6.3.4 Mecanismos de Resistência aos nitrofuranos (nitrofurantoína)**

O mecanismo de ação da nitrofurantoína ocorre pela redução do antibiótico pelas flavoproteínas bacterianas e os intermediários reativos resultantes inativam ou alteram proteínas bacterianas essenciais, interferindo assim nas funções vitais das

células bacterianas (Spielberg; Gordon, 1981). A eficácia da nitrofurantoína é comprometida quando ocorrem mutações nos genes *nfsA*, *nfsB* e *ribE* (Osei *et al.*, 2018; Sandegren *et al.*, 2008). A presença de genes *oqxAB* que codificam bombas de efluxo, responsáveis pela expulsão intracelular de nitrofurantoína, também é um mecanismo importante relatado (Ho *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2018).

### **3.6.4 Fatores de virulência em *Enterococcus* spp.**

Os fatores de virulência são estruturas, produtos ou estratégias que as bactérias utilizam para a colonização no hospedeiro. Nos enterococos, os fatores de virulência incluem aderência ao tecido do hospedeiro, formação de abscesso, modulação das respostas inflamatórias e secreção de produtos tóxicos (Jett *et al.*, 1994), sendo que diversas moléculas estão associadas a essas estratégias, tais como a adesina de colágeno, a citolisina, a gelatinase e a substância de agregação (Gilmore *et al.*, 2002; Lebreton *et al.*, 2009).

Existe uma relação significativa entre a colonização e a infecção do hospedeiro com a aquisição de genes de virulência. Dentre os genes mais comumente encontrados em enterococos que estão associados a fatores de virulência, temos o *ace*, que é responsável pela codificação de uma adesina de colágeno, o *agg*, que codifica uma substância de agregação, o *esp*, responsável pela codificação de uma proteína de superfície extracelular que produz biofilmes, o *gelE*, que é responsável pela codificação da gelatina, uma enzima capaz de degradar o colágeno, e o *cylA*, que codifica a citolisina, uma enzima com capacidade de destruir células do hospedeiro (Eaton; Gasson, 2001; Gilmore *et al.*, 2002; Lebreton *et al.*, 2009; Medeiros *et al.*, 2014).

#### **3.6.4.1 Adesina de colágeno**

Assim como ocorre na maioria das infecções bacterianas, a aderência de *Enterococcus* aos tecidos hospedeiros é considerada um passo crítico no processo de infecção (Foster; Hook, 1998). A adesina de colágeno é uma proteína da família das adesinas de componentes de superfície microbiana que são responsáveis pelo

reconhecimento de moléculas da matriz adesiva, sendo semelhante às imunoglobulinas. Essas proteínas são conhecidas como Microbial Surface Component Recognizing Adhesive Matrix Molecules (MSCRAMM) (Sillanpää *et al.*, 2004). A expressão do gene *ace* pode ser aumentada por estímulos ambientais, tais como a presença de sais biliares e variações de temperatura (Lebreton *et al.*, 2009).

#### **3.6.4.2 Gelatinase**

A gelatinase é uma metaloendopeptidase extracelular capaz de agir em materiais colágenos e outros peptídeos bioativos. A enzima contém um átomo de metal essencial, geralmente zinco, sendo o cálcio essencial para estabilizá-la (Poirier *et al.*, 1979). A produção de gelatinase, mediada pela expressão de *gelE*, é descrita como sendo regulada de forma dependente da densidade celular pelos produtos dos genes *fsrA*, *fsrB* e *fsrC*. Os produtos Fsr possuem a capacidade de regular seus próprios genes de acordo com a densidade celular, além de estimular a expressão de gelatinase e serina proteases de forma positiva. Além disso, os produtos Fsr podem também influenciar a regulação de outros fatores de virulência ou proteínas da superfície, tanto de maneira direta quanto indireta (Gilmore *et al.*, 2002; Lopes *et al.*, 2006).



## 7. CONCLUSÃO

Enterococos isolados das aves *P. aethereus* e *S. leucogaster* apresentaram alta taxa de tolerância ao arsênio, bem como resistência aos genes de tolerância a arsênio (*arsA*) e cobre (*tcrB*), demonstrando que a microbiota intestinal dessas aves foram afetadas por impactos antrópicos. Este é o primeiro estudo que avaliou e identificou bactérias tolerantes a metais pesados em aves marinhas do arquipélago dos Abrolhos.

Os enterococos exibiram resistência fenotípica a pelo menos quatro antimicrobianos utilizados na clínica e veterinária: eritromicina, rifampicina, quinolonas e nitrofurantoína. Todavia, apenas genes codificadores de resistência à eritromicina foram detectados entre os enterococos – gene *msrC*. Além disso, alguns isolados de enterococos carregavam genes correlacionados com virulência, tais como, *ace* e *gelE*

As duas espécies de aves apresentaram exposição aos metais arsênio e cobre, assim como antimicrobianos. Porém, as cepas de *P. aethereus* demonstraram que estão sendo mais expostas a contaminação ambiental. Desse modo, a contaminação ambiental causada pela barragem de Fundão não só prejudica os animais, como também pode contribuir para a seleção de enterococos com fatores de virulência, resistência a antibióticos e metais pesados.

## 8. REFERÊNCIAS

- Aktan, Y., Tan, S., & Içgen, B. (2013). Characterization of lead-resistant river isolate *Enterococcus faecalis* and assessment of its multiple metal and antibiotic resistance. *Environmental monitoring and assessment*, 185, 5285-5293.
- Alghamdi, F., & Shakir, M. (2020). The influence of *Enterococcus faecalis* as a dental root canal pathogen on endodontic treatment: A systematic review. *Cureus*, 12(3).
- Alloway, B.J. Heavy metals in soils. 3. ed. Springer Science+Business, 2013. 615p
- Alves, V. S., Soares, A. B. A., Couto, G. S., Ribeiro, A. B. B. and Efe, M. A. (2000). Aves do Arquipélago dos Abrolhos, Bahia, Brasil. Ibama, Brasília, Brazil.
- Alves, V. S.; Soares, A. B. A.; Couto, G. S.; Efe, M. A.; Ribeiro, A. B. B. (2004). Aves marinhas de Abrolhos. p. 213-232 in Aves marinhas e insulares brasileiras: bioecologia e conservação (Organizado por Joaquim Olinto Branco). Editora da UNIVALI, Itajaí, SC.
- Amachawadi, R. G., Shelton, N. W., Jacob, M. E., Shi, X., Narayanan, S. K., Zurek, L., ... & Nagaraja, T. G. (2010). Occurrence of *tcrB*, a transferable copper resistance gene, in fecal enterococci of swine. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7(9), 1089-1097.
- Amachawadi, R. G., Scott, H. M., Alvarado, C. A., Mainini, T. R., Vinasco, J., Drouillard, J. S., & Nagaraja, T. G. (2013). Occurrence of the transferable copper resistance gene *tcrB* among fecal enterococci of US feedlot cattle fed copper-supplemented diets. *Applied and environmental microbiology*, 79(14), 4369-4375.
- Anderson, K. L., Whitlock, J. E., & Harwood, V. J. (2005). Persistence and differential survival of fecal indicator bacteria in subtropical waters and sediments. *Applied and environmental microbiology*, 71(6), 3041-3048.
- Antas P.T.Z. (1991). Status and Conservation of seabirds breeding in Brazilian waters. - ICBP Tech. Pub- 11:141-158
- Ardiles-Villegas, K., González-Acuña, D., Waldenström, J., Olsen, B., & Hernández, J. (2011). Antibiotic resistance patterns in fecal bacteria isolated from Christmas shearwater (*Puffinus nativitatis*) and masked booby (*Sula dactylatra*) at remote Easter Island. *Avian diseases*, 55(3), 486-489.
- Argüello, J. M. (2003). Identification of ion-selectivity determinants in heavy-metal transport P 1B-type ATPases. *The Journal of membrane biology*, 195, 93-108.

- Aubry-Damon, H., Soussy, C. J., & Courvalin, P. (1998). Characterization of mutations in the *rpoB* gene that confer rifampin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 42(10), 2590-2594.
- Barros, J., Igrejas, G., Andrade, M., Radhouani, H., López, M., Torres, C., & Poeta, P. (2011). Gilthead seabream (*Sparus aurata*) carrying antibiotic resistant enterococci. A potential bioindicator of marine contamination?. *Marine pollution bulletin*, 62(6), 1245-1248.
- Bernardino, A. F., Pais, F. S., Oliveira, L. S., Gabriel, F. A., Ferreira, T. O., Queiroz, H. M., & Mazzuco, A. C. A. (2019). Chronic trace metals effects of mine tailings on estuarine assemblages revealed by environmental DNA. *PeerJ*, 7, e8042.
- Bevitório, L. Z., da Silva, N. G., Pirovani, J. C. M., Marques, J. A., Vieira, C. E. D., Zebal, Y. D., ... & do Vale-Oliveira, M. (2022). Impacts of tailings of Fundão dam (Brazil) rupture on marine fish: Metals bioaccumulation and physiological responses. *Marine Pollution Bulletin*, 177, 113511.
- Bonecker, A. C. T., de Castro, M. S., Costa, P. G., Bianchini, A., & Bonecker, S. L. C. (2019). Larval fish assemblages of the coastal area affected by the tailings of the collapsed dam in southeast Brazil. *Regional Studies in Marine Science*, 32, 100848.
- Branco, J. O. (2004). Aves marinhas das ilhas de Santa Catarina. *BRANCO, JO Aves marinhas e insulares brasileiras: biologia e conservação. Editora da UNIVALI, Itajaí*, 15-36.
- Brentano, R., de Brum, A. C., Montone, R. C., & Petry, M. V. (2020). Incidence of anthropogenic material in *Sula leucogaster* nests in a distant archipelago of Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, 151, Article 110815. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.110815>
- Bremner, I. (1998). Manifestations of copper excess. *The American journal of clinical nutrition*, 67(5), 1069S-1073S.
- Bruins, M. R., Kapil, S., & Oehme, F. W. (2000). Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicology and environmental safety*, 45(3), 198-207.
- Byappanahalli, M. N., Nevers, M. B., Korajkic, A., Staley, Z. R., & Harwood, V. J. (2012). Enterococci in the environment. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(4), 685-706.
- Cardoso G.O., Falsarella L.N., Chiroque-Solano P.M., Porcher C.C., Leitzke F.P., Wegner A.C., Carelli T., Salomon P.S., Bastos A.C., Sá F., Fallon S., Salgado L.T., Moura R.L. (2022) Coral growth bands recorded trace elements associated with the Fundão dam collapse. *Science of the Total Environment* 807 150880.

- Carvalho, P. C., Bugoni, L., McGill, R. A., & Bianchini, A. (2013). Metal and selenium concentrations in blood and feathers of petrels of the genus *Procellaria*. *Environmental toxicology and chemistry*, 32(7), 1641-1648.
- Castillo-Guerrero, J. A., Guevara-Medina, M. A., & Mellink, E. (2011). Breeding ecology of the Red-billed Tropicbird *Phaethon aethereus* under contrasting environmental conditions in the Gulf of California. *Ardea*, 99(1), 61-71.
- Castillo-Guerrero, J. A., Lerma, M., Mellink, E., Suazo-Guillén, E., & Peñaloza-Padilla, E. A. (2016). Environmentally-mediated flexible foraging strategies in brown boobies in the Gulf of California. *Ardea*, 104(1), 33-47.
- Clancy, J., Petitpas, J., Dib-Hajj, F., Yuan, W., Cronan, M., Kamath, A. V., ... & Retsema, J. A. (1996). Molecular cloning and functional analysis of a novel macrolide-resistance determinant, *mefA*, from *Streptococcus pyogenes*. *Molecular microbiology*, 22(5), 867-879.
- Cody, W. L., Wilson, J. W., Hendrixson, D. R., McIver, K. S., Hagman, K. E., Ott, C. M., ... & Schurr, M. J. (2008). Skim milk enhances the preservation of thawed-80 C bacterial stocks. *Journal of microbiological methods*, 75(1), 135-138.
- Coimbra, K. T. O., Alcântara, E., & de Souza Filho, C. R. (2020). Possible contamination of the Abrolhos reefs by Fundao dam tailings, Brazil–New constraints based on satellite data. *Science of the Total Environment*, 733, 138101.
- Constant JMC, Constant ABL. (2015). Antibióticos e quimioterápicos antimicrobianos. São Paulo: Sarvier.
- Choi, S., Chu, W., Brown, J., Becker, S. J., Harwood, V. J., & Jiang, S. C. (2003). Application of enterococci antibiotic resistance patterns for contamination source identification at Huntington Beach, California. *Marine Pollution Bulletin*, 46(6), 748-755.
- Clewell, D. B., Weaver, K. E., Dunny, G. M., Coque, T. M., Francia, M. V., & Hayes, F. (2014). Extrachromosomal and mobile elements in enterococci: transmission, maintenance, and epidemiology. *Enterococci: From commensals to leading causes of drug resistant infection [Internet]*.
- Croxall, J.P., Butchart, S.H.M., Lascelles, B., Stattersfield, A.J., Sullivan, B., Symes, A. and Taylor, P. (2012). Seabird conservation status, threats and priority actions: a global assessment. *Bird Conservation International* 22:1-34.
- CLSI. (2021). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*, M100, 31st ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA

- da Silva, V. L., Caçador, N. C., da Silva, C. D. S. F., Fontes, C. O., Garcia, G. D., Nicoli, J. R., & Diniz, C. G. (2012). Occurrence of multidrug-resistant and toxic-metal tolerant enterococci in fresh feces from urban pigeons in Brazil. *Microbes and environments*, 27(2), 179-185.
- da Silva Heck, J. M., Prichula, J., Huff, R., de Oliveira, R. B., Silva-Soares, T., Frazzon, J., & Frazzon, A. P. G. (2021). Captive snakes from Brazil as carriers of multidrug-resistant enterococci. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences*, 11(3), 503-523.
- D'Costa, V. M., King, C. E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W. W., Schwarz, C., ... & Wright, G. D. (2011). Antibiotic resistance is ancient. *Nature*, 477(7365), 457-461.
- De Niederhäusern, S., Bondi, M., Anacarso, I., Iseppi, R., Sabia, C., Bitonte, F., & Messi, P. (2013). Antibiotics and heavy metals resistance and other biological characters in enterococci isolated from surface water of Monte Cotugno Lake (Italy). *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 48(8), 939-946.
- Devriese, L.A., Pot, B. & Collins, M.D. (1993b) Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups
- Devriese, L.A., Pot, B., Vandamme, L., Kersters, K. & Haesebrouck, F. (1995) Identification of *Enterococcus* species isolated from foods of animal origin. *Int. J. Food. Microbiol.* 26: 187–97
- Diop, N., Zango, L., Beard, A., Ba, C., Ndiaye, P., Henry, L., Clingham, E., Opiel, S., González- Solís, J. (2018). Foraging ecology of tropicbirds breeding in two contrasting marine environments in the tropical Atlantic. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 607, 221–236.
- Domig, K. J., Mayer, H. K., & Kneifel, W. (2003). Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus* spp.: 2. Pheno-and genotypic criteria. *International journal of food microbiology*, 88(2-3), 165-188.
- Donato, S. T. (2007). Comparison of conventional and semi-automatized methods to identify *Enterococcus* spp versus molecular biology in discrepant identifications.
- Duffus, J.H. "Heavy metals" a meaningless term? (IUPAC Technical Report). (2002). IUPAC INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. *Pure Appl.Chem.* Vol.74, No.5, pp.793–807

- Eaton, T. J., & Gasson, M. J. (2001). Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Applied and environmental microbiology*, 67(4), 1628-1635.
- Efe, M.A., Serafini, P.P., Nunes, G.T., (2018). *Phaethon aethereus* Linnaeus, 1758. Available at Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. Volume III – Aves. ICMBio, Brasília, pp. 92–95.
- Evangelista H, de Paula RLM, Magalhães N, de Gois JS, Luna AS, Cagnin RC, Quaresma VS, Bezerra FF, Dia JP, Santos RV, Pullen A, Crivellari S, Chiessi CM, Batista DB, Gonçalves SJ, Oliveira BVX, Bizelli PAR, Sodre ED, Angonese M, Oaquim ABJ. (2023). Intake of trace contaminants by corals in Abrolhos reef bank (western South Atlantic) during two decades of coastal impacts. *Continental Shelf Research* 255 104946.
- Ewbank, A. C., Fuentes-Castillo, D., Sacristán, C., Cardoso, B., Esposito, F., Fuga, B., de Macedo, E. C., Lincopan, N., & Catao-Dias, J. L. (2022). Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* survey in wild seabirds at a pristine atoll in the southern Atlantic Ocean, Brazil: First report of the O25b-ST131 clone harboring blaCTX-M-8. *Science of The Total Environment*, 806, Article 150539.
- Fard, R. M. N., Heuzenroeder, M. W., & Barton, M. D. (2011). Antimicrobial and heavy metal resistance in commensal enterococci isolated from pigs. *Veterinary microbiology*, 148(2-4), 276-282.
- Farias, G., & Eugênio, C. (2002). Mineração e meio ambiente no Brasil.
- Fernandes, C., Fontainhas-Fernandes, A., Peixoto, F., & Salgado, M. A. (2007). Bioaccumulation of heavy metals in *Liza saliens* from the Esmoriz–Paramos coastal lagoon, Portugal. *Ecotoxicology and environmental safety*, 66(3), 426-431.
- Foster, T. J., & Höök, M. (1998). Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends in microbiology*, 6(12), 484-488.
- Furness, R. W., & Camphuysen, K. (1997). Seabirds as monitors of the marine environment. *iceS Journal of marine Science*, 54(4), 726-737.
- Gabriel, F.A., Silva, A.G., Queiroz, H.M., Ferreira, T.O., Hauser-Davis, R.A., Bernardino, A.F., (2020). Ecological risks of metal and metalloid contamination in the Rio Doce Estuary. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 16, 655–660. <https://doi.org/10.1002/ieam.4250>.
- Gabriel, F. Â., Ferreira, A. D., Queiroz, H. M., Vasconcelos, A. L. S., Ferreira, T. O., & Bernardino, A. F. (2021). Long-term contamination of the Rio Doce estuary as

- a result of Brazil's largest environmental disaster. *Perspectives in Ecology and Conservation*, 19(4), 417-428.
- Gilmore, M. S., Coburn, P. S., Nallapareddy, S. R., & Murray, B. E. (2002). Enterococcal virulence. *The enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance*, 301-354.
- Gilmore, M. S., Clewell, D. B., Ike, Y., & Shankar, N. (2014). Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection [Internet].
- Goldstein, B. P. (2014). Resistance to rifampicin: a review. *The Journal of antibiotics*, 67(9), 625-630.
- Gomes, L. E., Correa, L. B., Sá, F., Neto, R. R., & Bernardino, A. F. (2017). The impacts of the Samarco mine tailing spill on the Rio Doce estuary, Eastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, 120(1-2), 28-36.
- Gautam, P. K.; Gautam, R. K.; Banerjee, S.; Chattopadhyaya, M. C.; Pandey, J. D. (2016). Heavy metals in the environment: fate, transport, toxicity and remediation Technologies. Nova Science Publishers.
- GLOBAL TAILINGS REVIEW (GTR). (2020). *Padrão global da indústria para a gestão de rejeitos: minuta final*. International Council on Mining and Metals (ICMM), United Nations Environment Program (UNEP), Principles for Responsible Investment (PRI), 42 p
- Grassotti, T. T., de Angelis Zvoboda, D., da Fontoura Xavier Costa, L., De Araujo, A. J. G., Pereira, R. I., Soares, R. O., ... & Frazzon, A. P. G. (2018). Antimicrobial Resistance Profiles in *Enterococcus* spp. Isolates From Fecal Samples of Wild and Captive Black Capuchin Monkeys (*Sapajus nigritus*) in South Brazil. *Frontiers in microbiology*, 9, 2366.
- Grenni, P., Ancona, V., & Caracciolo, A. B. (2018). Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: A review. *Microchemical Journal*, 136, 25-39.
- Ji, X., Shen, Q., Liu, F., Ma, J., Xu, G., Wang, Y., & Wu, M. (2012). Antibiotic resistance gene abundances associated with antibiotics and heavy metals in animal manures and agricultural soils adjacent to feedlots in Shanghai; China. *Journal of hazardous materials*, 235, 178-185.
- Kristich, C. J., Rice, L. B., & Arias, C. A. (2014). Enterococcal infection—treatment and antibiotic resistance. *Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection [Internet]*.
- Hall, R. J. (2021). Climate change and avian disease. In R. J. In (Ed.), Hall, Infectious Disease Ecology of Wild Birds (pp. 189–206). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/oso/9780198746249.003.0010>.

- Hatje V, Pedreira RMA, Rezende CE, Schettini CAF, Souza GC, Marin DC, Hackspacher PC. (2017). The environmental impacts of one of the largest tailing dam failures worldwid. *Nature Scientific Reposts*. 7: 10706
- Hasman, H., & Aarestrup, F. M. (2002). *tcrB*, a gene conferring transferable copper resistance in *Enterococcus faecium*: occurrence, transferability, and linkage to macrolide and glycopeptide resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(5), 1410-1416.
- Hasman, H. (2005). The *tcrB* gene is part of the *tcrYAZB* operon conferring copper resistance in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Microbiology*, 151(9), 3019-3025.
- Hasman, H., Kempf, I., Chidaine, B., Cariolet, R., Ersbøll, A. K., Houe, H., ... & Aarestrup, F. M. (2006). Copper resistance in *Enterococcus faecium*, mediated by the *tcrB* gene, is selected by supplementation of pig feed with copper sulfate. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(9), 5784-5789.
- Hatje V, Pedreira RMA, Rezende CE, Schettini CAF, Souza GC, Marin DC, Hackspacher PC. 2017. The environmental impacts of one of the largest tailing dam failures worldwid. *Nature Scientific Reposts*. 7: 10706
- Ho, P. L., Ng, K. Y., Lo, W. U., Law, P. Y., Lai, E. L. Y., Wang, Y., & Chow, K. H. (2016). Plasmid-mediated OqxAB is an important mechanism for nitrofurantoin resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 60(1), 537-543.
- Hollenbeck, B. L., & Rice, L. B. (2012). Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus. *Virulence*, 3(5), 421-569.
- Hristova, P. M., Nankov, V. M., Hristov, I. G., Trifonov, S. V., Alexandrova, A. S., & Hitkova, H. Y. (2023). Gut colonization with vancomycin-resistant enterococci among patients with hematologic malignancies. *Gut Pathogens*, 15(1), 12.
- Huff, R., Pereira, R. I., Pissetti, C., de Araújo, A. M., d'Azevedo, P. A., Frazzon, J., & Guedes Frazzon, A. P. (2020). Antimicrobial resistance and genetic relationships of enterococci from siblings and non-siblings *Heliconius erato* phyllis caterpillars. *PeerJ*, 8, e8647.
- Hylland, K. (2006). Biological effects in the management of chemicals in the marine environment, *Mar. Pollut. Bull.*, 53, 614
- IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renovaveis. (2015). Laudo técnico preliminar: Impactos ambientais decorrentes do desastre envolvendo o rompimento da barragem de Fundao, em Mariana, Minas Gerais.

- Instituto Brasileiro de Mineração (IBRAM). Gestão e Manejo de Rejeitos da Mineração/Instituto Brasileiro de Mineração; organizador, Instituto Brasileiro de Mineração. 1.ed. Brasília, BR: IBRAM, 2016. 128p.
- Jacoby, J., Mancini, P.L., Bertrand, S.L., Efe, M.A., Bugoni, L., Nunes, G.T. (2023). Biogeographic variation on dietary aspects of a widely distributed seabird. *Marine Biology* 170:21
- Jakimska A, Konieczka P, Skóra K, Namieśnik J. (2011) Bioaccumulation of Metals in Tissues of Marine Animals, Part I: the Role and Impact of Heavy Metals on Organisms. *Pol. J. Environ. Stud.* Vol. 20, No. 5 (2011), 1117-1125.
- Jett, B. D., Huycke, M. M., & Gilmore, M. S. (1994). Virulence of enterococci. *Clinical microbiology reviews*, 7(4), 462-478.
- Kanematsu, E., Deguchi, T., Yasuda, M., Kawamura, T., Nishino, Y., & Kawada, Y. (1998). Alterations in the GyrA subunit of DNA gyrase and the ParC subunit of DNA topoisomerase IV associated with quinolone resistance in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 42(2), 433-435.
- Khaled, A. (2004). Heavy metal concentrations in certain tissues of five commercially important fishes from El-Mex Bay, Alexandria, Egypt, *Egyptian Journal of Aquatic Biology And Fisheries*, 8, 51.
- Kirby, B. (1966). Sherris and Turck, Performance standards for antimicrobial disc susceptibility. *American Journal of Clinical Pathology*, 45, 493.
- Kristich, C. J., & Little, J. L. (2012). Mutations in the  $\beta$  subunit of RNA polymerase alter intrinsic cephalosporin resistance in Enterococci. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(4), 2022-2027.
- Kristich, C. J., Rice, L. B., & Arias, C. A. (2014). Enterococcal infection—treatment and antibiotic resistance. *Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection [Internet]*.
- Kruger, M. C., Bertin, P. N., Heipieper, H. J., & Arsène-Ploetze, F. (2013). Bacterial metabolism of environmental arsenic—mechanisms and biotechnological applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 97, 3827-3841.
- Ladomersky, E., & Petris, M. J. (2015). Copper tolerance and virulence in bacteria. *Metallomics*, 7(6), 957-964.
- Laplace, J. M., Hartke, A., Giard, J. C., & Auffray, Y. (2000). Cloning, characterization and expression of an *Enterococcus faecalis* gene responsive to heavy metals. *Applied microbiology and biotechnology*, 53, 685-689.

- Layton, B. A., Walters, S. P., Lam, L. H., & Boehm, A. B. (2010). *Enterococcus* species distribution among human and animal hosts using multiplex PCR. *Journal of applied microbiology*, *109*(2), 539-547.
- Lebreton, F., Riboulet-Bisson, E., Serror, P., Sanguinetti, M., Posteraro, B., Torelli, R., ... & Giard, J. C. (2009). ace, which encodes an adhesin in *Enterococcus faecalis*, is regulated by Ers and is involved in virulence. *Infection and immunity*, *77*(7), 2832-2839.
- Lebreton, F., Willems, R. J., & Gilmore, M. S. (2014). *Enterococcus* diversity, origins in nature, and gut colonization. *Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection [Internet]*.
- Lebreton, F., Manson, A. L., Saavedra, J. T., Straub, T. J., Earl, A. M., & Gilmore, M. S. (2017). Tracing the enterococci from Paleozoic origins to the hospital. *Cell*, *169*(5), 849-861.
- Leclercq, R. (2002). Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clinical infectious diseases*, *34*(4), 482-492.
- Lopes, M. D. F. S., Simões, A. P., Tenreiro, R., Marques, J. J. F., & Crespo, M. T. B. (2006). Activity and expression of a virulence factor, gelatinase, in dairy enterococci. *International journal of food microbiology*, *112*(3), 208-214.
- Lu, Z. H., & Solioz, M. (2002). Bacterial copper transport. *Advances in protein chemistry*, *60*, 93-121.
- Madden, H., Satgé, Y., Wilkinson, B., & Jodice, P. G. (2022). Foraging ecology of red-billed tropicbird *Phaethon aethereus* in the caribbean during early chick rearing revealed by GPS tracking. *Marine Ornithology*, *50*(2), 165-175.
- McOsker, C. C., & Fitzpatrick, P. M. (1994). Nitrofurantoin: mechanism of action and implications for resistance development in common uropathogens. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, *33*(suppl\_A), 23-30.
- Miklasińska-Majdanik, M. (2021). Mechanisms of resistance to macrolide antibiotics among *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics*, *10*(11), 1406.
- Mancini, P. L., Serafini, P. P., Bugoni, L. (2016). Breeding seabird populations in Brazilian oceanic islands: historical review, update and a call for census standardization. *Revista Brasileira de Ornitologia*, *24*, 94-115.
- Mannu, L., Paba, A., Daga, E., Comunian, R., Zanetti, S., Duprè, I., & Sechi, L. A. (2003). Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. *International journal of food microbiology*, *88*(2-3), 291-304.

- Marinho C, Silva N, Pombo S, Santos T, Monteiro R, Gonçalves A, Micael J, Rodrigues P, Costa AC, Igrejas G, Poeta P. (2013) Echinoderms from Azores islands: An unexpected source of antibiotic resistant *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* isolates.
- Martin, J. D., & Mundt, J. O. (1972). Enterococci in insects. *Applied microbiology*, 24(4), 575-580.
- Martini, R., Mangini, P. R., & Lange, R. R. (2022). Seabirds health and conservation medicine in Brazil. *Journal for Nature Conservation*, 126238.
- Marra, A., Dib-Hajj, F., Lamb, L., Kaczmarek, F., Shang, W., Beckius, G., ... & Gootz, T. D. (2007). Enterococcal virulence determinants may be involved in resistance to clinical therapy. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 58(1), 59-65.
- Mascher, T., Helmann, J. D., & Unden, G. (2006). Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases. *Microbiology and molecular biology reviews*, 70(4), 910-938.
- Medeiros AW, Pereira RI, Oliveira DV, Martins PD, d'Azevedo PA, Van der Sand S Frazzon J, Frazzon AP. (2014). Molecular detection of virulence factors among food and clinical *Enterococcus faecalis* strains in South Brazil. *Braz J Microbiol.* 45(1):327-32.
- Micallef, S. A., Goldstein, R. E. R., George, A., Ewing, L., Tall, B. D., Boyer, M. S., ... & Sapkota, A. R. (2013). Diversity, distribution and antibiotic resistance of *Enterococcus* spp. recovered from tomatoes, leaves, water and soil on US Mid-Atlantic farms. *Food Microbiology*, 36(2), 465-474.
- Miller, W. R., Munita, J. M., & Arias, C. A. (2014). Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. *Expert review of anti-infective therapy*, 12(10), 1221-1236.
- Miller, M.G.R., Silva, F.R.O., Machovsky-Capuska, G.E., Congdon, B.C.. (2018a). Sexual segregation in tropical seabirds: drivers of sex-specific foraging in the brown booby *Sula leucogaster*. *J. Ornithol.* 159, 425–437.
- Miranda, L. S.; Marques, A. C. (2016). Impactos ocultos do colapso da barragem de resíduos da mineradora Samarco para a fauna marinha brasileira: um exemplo em estaurozoários (Cnidaria). *Biota Neotropica*, v. 16, n. 2.
- Misra, T. K. (1992). Bacterial resistances to inorganic mercury salts and organomercurials. *Plasmid*, 27(1), 4-16.

- Moellering RC, Jr. (1992). Emergence of *Enterococcus* as a significant pathogen. *Clin. Infect. Dis.* 15:58 – 62.
- Monticelli, J., Knezevich, A., Luzzati, R., & Di Bella, S. (2018). Clinical management of non-faecium non-faecalis vancomycin-resistant enterococci infection. Focus on *Enterococcus gallinarum* and *Enterococcus casseliflavus/flavescens*. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 24(4), 237-246.
- Monticelli, L. S., Decembrini, F., Bergamasco, A., & Caruso, G. (2019). Water quality assessment of transitional and coastal marine Sicilian waters (Italy): Ecological and epidemiological significance of multiple antimicrobial resistant *Enterococcus* spp. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 217, 173-184.
- Morrison D, Woodford N, Cookson B. (1997). Enterococci as emerging pathogens of humans, p 89S–99S. In Andrew PW, Mitchell TJ (ed), *The biology of streptococci and enterococci*. Blackwell Science, Oxford, United Kingdom.
- Mourao, J., Rae, J., Silveira, E., Freitas, A. R., Coque, T. M., Peixe, L., ... & Novais, C. (2016). Relevance of tcrYAZB operon acquisition for *Enterococcus* survival at high copper concentrations under anaerobic conditions. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(2), 560-563.
- Mundy, L. M., Sahm, D. F., & Gilmore, M. (2000). Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clinical microbiology reviews*, 13(4), 513-522.
- Nakamura, S. H. I. N. I. C. H. I., Nakamura, M. I. K. A., Kojima, T. S. U. Y. O. S. H. I., & Yoshida, H. I. R. O. A. K. I. (1989). *gyrA* and *gyrB* mutations in quinolone-resistant strains of *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 33(2), 254-255.
- Nallapareddy, S. R., Singh, K. V., Duh, R. W., Weinstock, G. M., & Murray, B. E. (2000). Diversity of ace, a gene encoding a microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules, from different strains of *Enterococcus faecalis* and evidence for production of ace during human infections. *Infection and immunity*, 68(9), 5210-5217.
- Naser, S. M., Vancanneyt, M., Hoste, B., Snauwaert, C., Vandemeulebroecke, K., & Swings, J. (2006). Reclassification of *Enterococcus flavescens* Pompei et al. 1992 as a later synonym of *Enterococcus casseliflavus* (ex Vaughan et al. 1979) Collins et al. 1984 and *Enterococcus saccharominimus* Vancanneyt et al. 2004 as a later synonym of *Enterococcus italicus* Fortina et al. 2004. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 56(2), 413-416.
- Neto, O. F., Leal, F. C. A., Gomes, W. V., Silva, P. J. L., Gonçalves, P. H., & Santos Jr, O. (2022). Uma revisão dos acidentes em barragens de rejeito de mineração

- da América do Sul e o cenário brasileiro. *Revista de Geociências do Nordeste*, 8(1), 10-27.
- Niederhäusern, S., Bondi, M., Anacarso, I., Iseppi, R., Sabia, C., Bitonte, F., & Messi, P. (2013). Antibiotics and heavy metals resistance and other biological characters in enterococci isolated from surface water of Monte Cotugno Lake (Italy). *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 48(8), 939-946.
- Niemeyer, C., Favero, C. M., Shivaprasad, H. L., Uhart, M., Musso, C. M., Rago, M. V., Silva-Filho, R. P., Canabarro, P. L., Craig, M. I., Olivera, V., Pereda, A., Brandao, P. E., & Catao-Dias, J. L. (2017). Genetically diverse herpesviruses in South American Atlantic coast seabirds. *PLoS ONE*, 12(6), Article e0178811. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178811>
- Nies, D. H. (2004). Metals and their compounds in the environment. Part II. In K. Anke, M. Ichnat, & M. Stoepler (Eds.), *The elements: essential and toxic effects on microorganisms*. Weinheim: Wiley
- Nies, D. H., & Silver, S. (1995). Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. *Journal of industrial microbiology*, 14, 186-199.
- Novais, C., Campos, J., Freitas, A. R., Barros, M., Silveira, E., Coque, T. M., ... & Peixe, L. (2018). Water supply and feed as sources of antimicrobial-resistant *Enterococcus* spp. in aquacultures of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), Portugal. *Science of the Total Environment*, 625, 1102-1112.
- Nowakiewicz, A., Ziółkowska, G., Zięba, P., & Kostruba, A. (2014). Undomesticated animals as a reservoir of multidrug-resistant *Enterococcus* in eastern Poland. *Journal of Wildlife Diseases*, 50(3), 645-650.
- Nunes, G. T., Bertrand, S., & Bugoni, L. (2018). Seabirds fighting for land: phenotypic consequences of breeding area constraints at a small remote archipelago. *Scientific Reports*, 8(1), 665.
- Nunes, G. T., Efe, M. A., Barreto, C. T., Gaiotto, J. V., Silva, A. B., Vilela, F., ... & Bugoni, L. (2022). Ecological trap for seabirds due to the contamination caused by the Fundão dam collapse, Brazil. *Science of the Total Environment*, 807, 151486.
- Oliveira de Araujo, G., Huff, R., Favarini, M. O., Mann, M. B., Peters, F. B., Frazzon, J., & Guedes Frazzon, A. P. (2020). Multidrug resistance in enterococci isolated from wild pampas foxes (*Lycalopex gymnocercus*) and Geoffroy's Cats (*Leopardus geoffroyi*) in the Brazilian Pampa Biome. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 606377
- Oliveira-Filho, R. R., Musiello-Fernandes, J., Pichler, H. A., Antunes, M., Vilar, C. C., Mantelatto, F. L., ... & Hostim-Silva, M. (2023). Marine and estuarine crustacean

- diversity and assemblage structure in eastern Brazil three years after the Fundão mining dam failure. *Regional Studies in Marine Science*, 65, 103068.
- Ong, Y. Y., Tan, W. S., Mohamad, R., Sieo, C. C., & Tey, B. T. (2014). Biochemical and molecular identification of *Enterococcus* spp. from red pitaya. *Process Biochemistry*, 49(4), 563-568.
- Ogier, J. C., & Serror, P. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: the *Enterococcus* genus. *International journal of food microbiology*, 126(3), 291-301.
- Orta, J., Del Hoyo, J., Elliot, A., & Sargatal, J. (1992). Handbook of the birds of the world
- Osei Sekyere, J. (2018). Genomic insights into nitrofurantoin resistance mechanisms and epidemiology in clinical Enterobacteriaceae. *Future science OA*, 4(5), FSO293.
- Park, S. Y., Kim, K. M., Lee, J. H., Seo, S. J., & Lee, I. H. (2007). Extracellular gelatinase of *Enterococcus faecalis* destroys a defense system in insect hemolymph and human serum. *Infection and immunity*, 75(4), 1861-1869.
- Pasquaroli, S., Di Cesare, A., Vignaroli, C., Conti, G., Citterio, B., & Biavasco, F. (2014). Erythromycin-and copper-resistant *Enterococcus hirae* from marine sediment and co-transfer of *erm(B)* and *tcrB* to human *Enterococcus faecalis*. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 80(1), 26-28.
- Piatt, J. F., Sydeman, W. J., & Wiese, F. (2007). Introduction: a modern role for seabirds as indicators. *Marine Ecology progress series*, 352, 199-204.
- Poirier, T. P., Tonelli, S. J., & Holt, S. C. (1979). Ultrastructure of gliding bacteria: scanning electron microscopy of *Capnocytophaga sputigena*, *Capnocytophaga gingivalis*, and *Capnocytophaga ochracea*. *Infection and immunity*, 26(3), 1146-1158.
- Pompei, R., Berlutti, F., Thaller, M. C., Ingianni, A., Cortis, G., & Dainelli, B. (1992). *Enterococcus flavescens* sp. nov., a new species of enterococci of clinical origin. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 42(3), 365-369.
- Portillo, A., Ruiz-Larrea, F., Zarazaga, M., Alonso, A., Martinez, J. L., & Torres, C. (2000). Macrolide resistance genes in *Enterococcus* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(4), 967-971.
- Prakash, E. A., Hromádková, T., Jabir, T., Vipindas, P. V., Krishnan, K. P., Hatha, A. M., & Briedis, M. (2022). Dissemination of multidrug resistant bacteria to the

- polar environment-Role of the longest migratory bird Arctic tern (*Sterna paradisaea*). *Science of The Total Environment*, 815, 152727.
- Prichula, J., Pereira, R. I., Wachholz, G. R., Cardoso, L. A., Tolfo, N. C. C., Santestevan, N. A., ... & Frazzon, A. P. G. (2016). Resistance to antimicrobial agents among enterococci isolated from fecal samples of wild marine species in the southern coast of Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, 105(1), 51-57.
- Prichula, J., Primon-Barros, M., Luz, R. C., Castro, Í. M., Paim, T. G., Tavares, M., ... & Gilmore, M. S. (2021). Genome mining for antimicrobial compounds in wild marine animals-associated enterococci. *Marine Drugs*, 19(6), 328.
- Radhouani, H., Igrejas, G., Pinto, L., Gonçalves, A., Coelho, C., Rodrigues, J., & Poeta, P. (2011). Molecular characterization of antibiotic resistance in enterococci recovered from seagulls (*Larus cachinnans*) representing an environmental health problem. *Journal of Environmental Monitoring*, 13(8), 2227-2233.
- Rajpar, M. N., Ozdemir, I., Zakaria, M., Sheryar, S., & Rab, A. (2018). Seabirds as bioindicators of marine ecosystems. In H. Mikkola (Ed.), *Seabirds*. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.75458>.
- Rebelo, A., Mourão, J., Freitas, A. R., Duarte, B., Silveira, E., Sanchez-Valenzuela, A., ... & Novais, C. (2021). Diversity of metal and antibiotic resistance genes in *Enterococcus* spp. from the last century reflects multiple pollution and genetic exchange among phyla from overlapping ecosystems. *Science of The Total Environment*, 787, 147548.
- Rich, R. L., Kreikemeyer, B., Owens, R. T., LaBrenz, S., Narayana, S. V., Weinstock, G. M., ... & Höök, M. (1999). Ace is a collagen-binding MSCRAMM from *Enterococcus faecalis*. *Journal of biological chemistry*, 274(38), 26939-26945.
- Ribeiro AR, Eira C, Torres J, Mendes P, Miguel J, Soares AMVM, VINGADA J. (2009). Toxic element concentrations in the razorbill *Alca torda* (Charadriiformes, Alcidae) in Portugal, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 56, 588.
- Rouch, D. A., Lee, B. T., & Morby, A. P. (1995). Understanding cellular responses to toxic agents: a model for mechanism-choice in bacterial metal resistance. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*, 14(2), 132-141.
- Sandegren, L., Lindqvist, A., Kahlmeter, G., & Andersson, D. I. (2008). Nitrofurantoin resistance mechanism and fitness cost in *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62(3), 495-503.
- Santestevan, N. A., de Angelis Zvoboda, D., Prichula, J., Pereira, R. I., Wachholz, G. R., Cardoso, L. A., ... & Frazzon, A. P. G. (2015). Antimicrobial resistance

- and virulence factor gene profiles of *Enterococcus* spp. isolates from wild *Arctocephalus australis* (South American fur seal) and *Arctocephalus tropicalis* (Subantarctic fur seal). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31, 1935-1946.
- Sarkar, A., Kazy, S. K., & Sar, P. (2013). Characterization of arsenic resistant bacteria from arsenic rich groundwater of West Bengal, India. *Ecotoxicology*, 22, 363-376.
- Sarmento R, Brito D, Ladle RJ, Leal GDR, Efe MA. (2014). Invasive house (*Rattus rattus*) and brown rats (*Rattus norvegicus*) threaten the viability of red-billed tropicbird (*Phaethon aethereus*) in Abrolhos National Park, Brazil. *Tropical Conservation Science* Vol.7 (4):614-627, 2014
- Shankar, V., Baghdayan, A. S., Huycke, M. M., Lindahl, G., & Gilmore, M. S. (1999). Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in esp, a gene encoding a novel surface protein. *Infection and immunity*, 67(1), 193-200.
- Schroeder, M. R., & Stephens, D. S. (2016). Macrolide resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 6, 98.
- Švec, P. & Devriese, L.A. (2009) Genus I. *Enterococcus* (ex Thiercelin and Jouhaud 1903) Schleifer and Kilpper-Bälz 1984, 32VP. In: De Vos, P., Garrity, G.M., Jones, D. et al. (eds), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 3. The Firmicutes. Ne
- Sauget, M., Valot, B., Bertrand, X., & Hocquet, D. (2017). Can MALDI-TOF mass spectrometry reasonably type bacteria?. *Trends in microbiology*, 25(6), 447-455.
- Sengupta, S., Chattopadhyay, M. K., & Grossart, H. P. (2013). The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Frontiers in microbiology*, 4, 47.
- Serrano IL, Azevedo-Júnior SM. (2005). Dietas das Aves Marinhas no Parque Nacional dos Abrolhos, Bahia, Brasil. *Ornithologia* 1(1):75-92
- Sillanpaa, J., Xu, Y., Nallapareddy, S. R., Murray, B. E., & Hook, M. (2004). A family of putative MSCRAMMs from *Enterococcus faecalis*. *Microbiology*, 150(7), 2069-2078.
- Singh, K. V., Malathum, K., & Murray, B. E. (2001). Disruption of an *Enterococcus faecium* species-specific gene, a homologue of acquired macrolide resistance genes of staphylococci, is associated with an increase in macrolide susceptibility. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45(1), 263-266.

- Silveira, E., Freitas, A. R., Antunes, P., Barros, M., Campos, J., Coque, T. M., ... & Novais, C. (2014). Co-transfer of resistance to high concentrations of copper and first-line antibiotics among *Enterococcus* from different origins (humans, animals, the environment and foods) and clonal lineages. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *69*(4), 899-906.
- Silver, S., Nucifora, G., Chu, L., & Misra, T. K. (1989). Bacterial resistance ATPases: primary pumps for exporting toxic cations and anions. *Trends in biochemical sciences*, *14*(2), 76-80.
- Silver, S. (1992). Plasmid-determined metal resistance mechanisms: range and overview. *Plasmid*, *27*(1), 1-3.
- Silver, S., & Phung, L. T. (1996). Bacterial heavy metal resistance: new surprises. *Annual review of microbiology*, *50*(1), 753-789.
- Shepard, B. D., & Gilmore, M. S. (2002). Differential expression of virulence-related genes in *Enterococcus faecalis* in response to biological cues in serum and urine. *Infection and immunity*, *70*(8), 4344-4352.
- Schafhauser, B. H., Kristofco, L. A., de Oliveira, C. M. R., & Brooks, B. W. (2018). Global review and analysis of erythromycin in the environment: occurrence, bioaccumulation and antibiotic resistance hazards. *Environmental pollution*, *238*, 440-451.
- Schwartzman, J. A., Lebreton, F., Salamzade, R., Martin, M. J., Schaufler, K., Urhan, A., ... & Gilmore, M. S. (2023). Global diversity of enterococci and description of 18 novel species. *bioRxiv*, 2023-05.
- Schroeder, M. R., & Stephens, D. S. (2016). Macrolide resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, *6*, 98.
- Smith, H. G., Clarke, R. H., Larkins, J. A., Bean, D. C., & Greenhill, A. R. (2019). Wild Australian birds and drug-resistant bacteria: characterisation of antibiotic-resistant *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. *Emu-Austral Ornithology*, *119*(4), 384-390.
- Solioz, M., Abicht, H. K., Mermoud, M., & Mancini, S. (2010). Response of Gram-positive bacteria to copper stress. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, *15*, 3-14.
- Spielberg, S. P., Gordon, G. B., Blake, D. A., Goldstein, D. A., & Herlong, H. F. (1981). Predisposition to phenytoin hepatotoxicity assessed in vitro. *New England Journal of Medicine*, *305*(13), 722-727.

- Sunita, M., Prashant, S., Bramha Chari, P. V., Nageswara Rao, S., Balaravi, P., & Kavi Kishor, P. B. (2012). Molecular identification of arsenic-resistant estuarine bacteria and characterization of their ars genotype. *Ecotoxicology*, 21, 202-212.
- Sutcliffe, J., Grebe, T., Tait-Kamradt, A., & Wondrack, L. (1996). Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 40(11), 2562-2566.
- Tannock, I. F., Lee, C. M., Tunggal, J. K., Cowan, D. S., & Egorin, M. J. (2002). Limited penetration of anticancer drugs through tumor tissue: a potential cause of resistance of solid tumors to chemotherapy. *Clinical cancer research*, 8(3), 878-884.
- Tognella, M. M. P., Falqueto, A. R., Espinoza, H. D. C. F., Gontijo, I., Gontijo, A. B. P. L., Fernandes, A. A., ... & Albino, J. (2022). Mangroves as traps for environmental damage to metals: The case study of the Fundão Dam. *Science of The Total Environment*, 806, 150452.
- Tran, J. H., Jacoby, G. A., & Hooper, D. C. (2005). Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein Qnr with *Escherichia coli* DNA gyrase. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(1), 118-125.
- Ture, M., Altinok, I., & Alp, H. (2018). Effects of cage farming on antimicrobial and heavy metal resistance of *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium*, and *Lactococcus garvieae*. *Microbial Drug Resistance*, 24(9), 1422-1430.
- Tsai, S. L., Singh, S., & Chen, W. (2009). Arsenic metabolism by microbes in nature and the impact on arsenic remediation. *Current Opinion in Biotechnology*, 20(6), 659-667.
- Urusova, D. V., Merriman, J. A., Gupta, A., Chen, L., Mathema, B., Caparon, M. G., & Khader, S. A. (2022). Rifampin resistance mutations in the *rpoB* gene of *Enterococcus faecalis* impact host macrophage cytokine production. *Cytokine*, 151, 155788.
- Vignaroli, C., Pasquaroli, S., Citterio, B., Di Cesare, A., Mangiaterra, G., Fattorini, D., & Biavasco, F. (2018). Antibiotic and heavy metal resistance in enterococci from coastal marine sediment. *Environmental pollution*, 237, 406-413.
- Wehrli, W., Knüsel, F., Schmid, K., & Staehelin, M. (1968). Interaction of rifamycin with bacterial RNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 61(2), 667-673.
- Weimerskirch, H., Shaffer, S., Tremblay, Y., Costa, D., Gadenne, H., Kato, A., Ropert Coudert, Y., Sato, K., Aurioules, D., (2009). Species- and sex-specific differences in foraging behaviour and foraging zones in blue-footed and brown boobies in the Gulf of California. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 391, 267–278.

- Werner, G., Hildebrandt, B., & Witte, W. (2001). The newly described *msrC* gene is not equally distributed among all isolates of *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(12), 3672.
- Wright, G. D. (2007). The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nature reviews microbiology*, 5(3), 175-186.
- Yasufuku, T., Shigemura, K., Shirakawa, T., Matsumoto, M., Nakano, Y., Tanaka, K., ... & Fujisawa, M. (2011). Mechanisms of and risk factors for fluoroquinolone resistance in clinical *Enterococcus faecalis* isolates from patients with urinary tract infections. *Journal of clinical microbiology*, 49(11), 3912-3916.
- Yang, Y., Wu, S., Lilley, R. M., & Zhang, R. (2015). The diversity of membrane transporters encoded in bacterial arsenic-resistance operons. *PeerJ*, 3, e943.
- Yang, H. C., & Rosen, B. P. (2016). New mechanisms of bacterial arsenic resistance. *Biomedical journal*, 39(1), 5-13.
- Zebral, Y. D., Costa, P. G., de Souza, M. M., & Bianchini, A. (2022). Avian blood and feathers as biological tools to track impacts from trace-metals: Bioaccumulation data from the biggest environmental disaster in Brazilian history. *Science of The Total Environment*, 807, 151077.
- Zhang, X., Zhang, Y., Wang, F., Wang, C., Chen, L., Liu, H., ... & Zhou, T. (2018). Unravelling mechanisms of nitrofurantoin resistance and epidemiological characteristics among *Escherichia coli* clinical isolates. *International journal of antimicrobial agents*, 52(2), 226-232.
- Zhao, C., Zhang, Y., Chan, Z., Chen, S., & Yang, S. (2015). Insights into arsenic multi-operons expression and resistance mechanisms in *Rhodopseudomonas palustris* CGA009. *Frontiers in Microbiology*, 6, 986.

#### **Dissertações e teses:**

- Araujo, G. O. D. (2019). Estudo de *Enterococcus* sp. isolados de canídeos e felídeos selvagens do Pampa brasileiro.
- Medeiros, A. W. (2011). Avaliação dos fatores de virulência e a capacidade de formação de biofilme in vitro em isolados alimentares e clínicos de *Enterococcus* sp. e utilização de PCR-RFLP para a identificação de *Enterococcus casseliflavus* e *Enterococcus gallinarum*.
- Pereira, R. I. (2016). Diversidade genética e fatores de virulência de *Enterococcus*

spp. isolados de amostras fecais de tartarugas marinhas recuperadas no litoral norte do Rio Grande do Sul, Brasil.

**Internet:**

ICMBIO, 2023. Parque Nacional Marinho dos Abrolhos: Guia de visitantes. disponível em: ICMBio - Parque Nacional Marinho dos Abrolhos - Guia do Visitante. Acesso em: 20/08/2023.

RRDM, 2019b. Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática da Área Ambiental I – Rede Rio Doce Mar. Disponível em: [http://www.ibama.gov.br/phocadownload/cif/notas-tecnicas/CT-BIO/2019/nt\\_ctbio\\_rrdm\\_rel\\_anual\\_rt23\\_megafauna\\_19.pdf](http://www.ibama.gov.br/phocadownload/cif/notas-tecnicas/CT-BIO/2019/nt_ctbio_rrdm_rel_anual_rt23_megafauna_19.pdf). Acesso em: 25/08/2023.

Matta, P. M. (2001). Reflexos da mineração na qualidade ambiental das cidades. Disponível:[http://www.dnpm.gov.br/mostra\\_arquivo.asp?IDBancoArquivoArquivo=2065](http://www.dnpm.gov.br/mostra_arquivo.asp?IDBancoArquivoArquivo=2065). Acesso em: 15/08/2023.