



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

EXPEDITO MAIA DIÓGENES

**RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA E FATORES DE VIRULÊNCIA DE
BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS ISOLADAS DE BOTOS-VERMELHOS (*Inia
geoffrensis*) DE VIDA LIVRE**

FORTALEZA-CE

2021

EXPEDITO MAIA DIÓGENES

**RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA E FATORES DE VIRULÊNCIA DE
BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS ISOLADAS DE BOTOS-VERMELHOS (*Inia
geoffrensis*) DE VIDA LIVRE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Médica.

Área de concentração: Microbiologia Médica.

Orientador^a: Prof^a. Dr^a. Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia.

FORTALEZA-CE

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- D622r Diógenes, Expedito Maia.
Resistência antimicrobiana e fatores de virulência de bactérias Gram-negativas isoladas de botos-
vermelhos (*Inia geoffrensis*) de vida livre / Expedito Maia Diógenes. – 2021.
71 f.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-
Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2021.
Orientação: Profª. Dra. Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia.
1. Cetáceos. 2. Água doce. 3. Microbiota. 4. Ecossistema Amazônico. I. Título.

CDD 616.9

EXPEDITO MAIA DIÓGENES

**RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA E FATORES DE VIRULÊNCIA DE
BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS ISOLADAS DE BOTOS-VERMELHOS (*Inia
geoffrensis*) DE VIDA LIVRE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Médica.

Área de concentração: Microbiologia Médica.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Márcio Garcia Ribeiro
Universidade Estadual Paulista (UNESP)

Prof^ª. Dr^ª. Vânia Maria Maciel Melo
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Vitor Luz Carvalho
Associação de Pesquisa e Preservação de Ecossistemas Aquáticos (AQUASIS)

À força maior que está acima de tudo.

Aos meus pais, Norma e Expedito;

À minha irmã, Talita;

À minha tia, Rejane.

E à minha vontade de vencer e alcançar meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida e saúde e por estar me guiando nessa jornada instável que é a vida. À UFC e FAMED, como instituições, por proverem as ferramentas para me tornar um mestre e profissional mais competente.

À minha mãe, Norma Suely, por toda a paciência, apoio e incentivo, pelo seu amor incondicional e por me ensinar o valor do trabalho duro. Sem esquecer de agradecer todas as risadas, os choros, as saudades, as conversas e as discussões calorosas diárias. Todo esse amor caloroso é recíproco.

À minha tia, Idalina Rejane, por toda a compreensão, amizade e suporte emocional, pelo seu amor e por me ensinar a ser mais compreensivo com os outros. Sem esquecer todos os mimos, os beijos, as risadas e os abraços reconfortantes. Obrigado por lembrar de mim todos os dias.

À minha irmã, Talita, por toda a sua ajuda, criatividade e ser um exemplo pra mim, me ensinando como alcançar seus objetivos na vida sempre focado. Agradeço por ser a “rocha” dessa família.

Ao meu pai, Expedito, por todo o apoio, amor e humor. Agradeço por me ensinar a amar os animais e como não levar a vida tão a sério.

À minha avó, Maria Vilani, por sempre ser um símbolo de bondade e altruísmo. Lembrando-me de todas as coisas boas que existem no mundo, nunca deixando de sorrir.

Aos meus animais, minha cachorra Madonna e os meus gatos Zacarias e José Lourenço, meus eternos e queridos amores de quatro patas que me lembram da importância do cuidar, do amor incondicional e me trazem apenas felicidade.

A professora Profa. Dra. Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia, minha orientadora, por ter me acolhido no seu local de trabalho e por confiar e acreditar em mim. Assim como agradeço sua preocupação e dedicação na construção deste trabalho.

À equipe do PPGMM por responderem pacientemente todos os meus questionamentos, propiciarem momentos de discussão científica e pela convivência diária maravilhosa.

À FUNCAP, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

“A primeira coisa que um bom cientista faz quando está diante de uma descoberta é tentar provar que ela está errada.”

Albert Camus

RESUMO

Estudos sobre microbiota em cetáceos de água doce são escassos e fornecem informações sobre as ligações entre ambientes dulcícolas e a saúde humana, indicando o surgimento de doenças emergentes, resistência antimicrobiana e patógenos virulentos. Assim, o presente estudo teve como objetivo identificar e avaliar a sensibilidade antimicrobiana e produção de fatores de virulência, como formação de biofilmes e produção de proteases, sideróforos e hemolisinas de bactérias Gram-negativas isoladas de cavidades naturais de botos-vermelhos (*Inia geoffrensis*) de vida livre. Duas populações foram analisadas de diferentes rios da Bacia Amazônica. Assim, foram capturados 21 animais, treze do Rio Negro e oito do Rio Tapajós, recuperando 132 isolados bacterianos. Amostras de swab foram obtidas da cavidade oral, espiráculo, abertura genital e reto e foram cultivadas em ágar MacConkey. Os isolados foram identificados bioquimicamente, a sensibilidade aos antimicrobianos foi avaliada pelo método de disco-difusão e os fatores de virulência como formação de biofilme, produção de proteases, hemolisinas e sideróforos na forma planctônica e biofilme foram analisados utilizando testes de quebra de substratos e capacidade de ligação ao ferro. Dos 132 isolados, 71 foram recuperados de animais do Rio Negro e 61 do Rio Tapajós. As espécies bacterianas mais comumente isoladas foram *Enterobacter cloacae*, *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*. No geral, 51,6% (63/122) dos isolados foram considerados não sensíveis (resultado intermediário e resistente), dos quais 28/122 (22,9%) foram resistentes a pelo menos um antimicrobiano. Em relação aos fatores de virulência analisados; 43,2% (57/132) foram capazes de produzir biofilme. Em relação à produção de enzimas hidrolíticas, 50% (66/132) apresentaram atividade proteolítica e 66,2% (88/132) exibiram atividade hemolítica. Para a produção de sideróforos, 60,6% (80/132) foram capazes de produzir sideróforos. Em geral, os isolados apresentaram maior produção de fatores de virulência no biofilme do que na forma planctônica ($P < 0,001$). Os resultados indicam que os botos-vermelhos hospedam micro-organismos com genes de resistência e virulência, contribuindo para a manutenção desses no meio ambiente. Portanto, este estudo destaca a importância da abordagem *One Health* para monitorar o surgimento de resistência antimicrobiana.

Palavras-chave: Cetáceos, água doce, microbiota, ecossistema amazônico.

ABSTRACT

Studies on the microbiota of freshwater cetaceans are scarce and may provide information on the link between freshwater environments and human health, indicating the emergence of diseases, antimicrobial resistance and virulent pathogens.. Thus, the present study aimed to identify and evaluate antimicrobial sensitivity and production of virulence factors, such as biofilm formation and production of proteases, siderophores and hemolysins by Gram-negative bacteria recovered from two populations of free-ranging Amazon river dolphins. Two populations were analyzed from different rivers in the Amazon Basin. Thus, 21 animals were captured, thirteen from the Rio Negro and eight from the Tapajós river, recovering 132 bacterial isolates. Swab samples were obtained from the oral cavity, blowhole, genital opening and rectum and were cultured on MacConkey agar. Isolates were biochemically identified, antimicrobial susceptibility was assessed by disk-diffusion method and virulence factors such as biofilm formation, proteases, hemolysins and siderophores production in planktonic and biofilm form were assessed using substrate breakdown and iron-binding capacity tests. Of 132 isolates, 71 were recovered from animals from Negro River and 61 from Tapajós River. The most commonly recovered bacterial species were *Enterobacter cloacae*, *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. Overall, 51.6% (63/122) of the isolates were not-susceptible (intermediate resistance and resistance), of which 28/122 (22.9%) were resistant to at least one antimicrobial. Regarding the virulence factors analyzed; 43.2% (57/132) were able to produce biofilm. Regarding the production of hydrolytic enzymes, 50% (66/132) showed proteolytic activity and 66.2% (88/132) exhibited hemolytic activity. For the production of siderophores, 60.6% (80/132) were able to produce siderophores. In general, the isolates showed a higher production of virulence factors in biofilm than in planktonic form ($P < 0.001$). The results indicate that Amazon river dolphins host microorganisms with resistance and virulence genes, contributing to their maintenance in the environment. Therefore, this study highlights the importance of the One Health approach to monitoring the emergence of antimicrobial resistance.

Keywords: Cetaceans, fresh water, microbiota, Amazonian ecosystem.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Mapa de distribuição das espécies do gênero <i>Inia</i>	20
Figura 2 – Turistas em interação com os botos em plataformas submersas sobre o Rio Negro, Parque Nacional de Anavilhanas. Amazonas, Brasil.....	23
Figura 3 – Representação esquemática da formação de biofilme.....	32
Figura 4 - Localização geográfica dos locais de coleta de amostras de botos-vermelhos.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Isolados bacterianos de diferentes sítios anatômicos de duas populações de botos-vermelhos (<i>I. geoffrensis</i>) de vida livre.....	47
Tabela 2 – Número de isolados bacterianos resistentes recuperados de sítios anatômicos de 21 botos do rio Amazonas.....	48
Tabela 3 – Resultados intermediários e resistentes dos isolados bacterianos recuperados de botos do rio Amazonas (<i>Inia geoffrensis</i>) da população do Rio Negro.....	49
Tabela 4 – Resultados intermediários e resistentes dos isolados bacterianos recuperados de botos do rio Amazonas (<i>Inia geoffrensis</i>) da população do Rio Tapajós....	50
Tabela 5 – Produção de biofilmes por bactérias Gram-negativas isoladas de botos-vermelhos (<i>I. geoffrensis</i>).....	51
Tabela 6 - Fatores de virulência: produção de proteases, sideróforos e hemolisinas pelos isolados de botos-vermelhos (<i>I. geoffrensis</i>).....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
C	Celsius
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>
Cl	Cloro
H	Hidrogênio
O	Oxigênio
BGN	Bacilos Gram-negativos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
OD	Densidade óptica
GrAMM	Grupo Aplicado em Microbiologia Médica
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
IUCN	<i>International Union for Conservation of Nature</i>
mg	Miligrama
g	Gramma
mL	Mililitro
mm	Milímetros
nm	Nanômetro
MH	Mueller Hinton
UFC	Unidade formadora de colônia
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
M	Molar
R	Resistente
I	Intermediário
S	Sensível
h	Horas
min	Minutos
A	Absorbância
CAS	Chrome Azurol S
G	Força G (unidade de aceleração)

Fe

Ferro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	Taxonomia e características gerais do boto-vermelho	18
2.2	Rio Negro e Rio Tapajós	22
2.3	Estudo da microbiota em cetáceos	24
2.4	Bactérias Gram-negativas	25
2.4.1	<i>Ordem Enterobacteriales</i>	26
2.4.2	<i>Bacilos Gram-negativos não-fermentadores</i>	27
2.5	Resistência antimicrobiana em bactérias de mamíferos aquáticos	28
2.6	Fatores de virulência	31
2.6.1	<i>Biofilmes bacterianos</i>	31
2.6.2	<i>Proteases</i>	33
2.6.3	<i>Sideróforos</i>	33
2.6.4	<i>Hemolisinas</i>	34
3	HIPÓTESES	34
4	OBJETIVOS	35
4.1	Objetivo geral	35
4.2	Objetivos específicos	35
5	METODOLOGIA	35
5.1	Aspectos éticos e licenças ambientais	35
5.2	Áreas de estudo e animais	35
5.3	Isolamento e identificação microbiana	37
5.4	Teste de sensibilidade antimicrobiana	38
5.5	Produção de fatores de virulência	39
5.5.1	<i>Formação de Biofilmes</i>	39
5.5.2	<i>Fatores de virulência na forma planctônica e em biofilme</i>	40
5.5.2.1	<i>Proteases</i>	40
5.5.2.2	<i>Sideróforos</i>	40
5.5.2.3	<i>Hemolisinas</i>	41
5.6	Análises estatísticas	41
6	RESULTADOS	42
6.1	Animais capturados	42

6.2	Isolados bacterianos.....	42
6.3	Teste de sensibilidade antimicrobiana.....	44
6.4	Fatores de virulência.....	45
6.4.1	Biofilmes.....	45
6.4.2	Proteases, sideróforos e hemolisinas.....	45
7	DISCUSSÃO.....	53
8	CONCLUSÃO.....	59
9	REFERÊNCIAS.....	60

1 INTRODUÇÃO

Os cetáceos são representados por espécies de baleias, golfinhos e botos, formando um grupo heterogêneo de animais, ocorrendo em bacias oceânicas e hidrográficas em todo o mundo (WÜRSIG et al., 2018). Dentre as quatro famílias de cetáceos de água doce, apenas a família *Iniidae* é encontrada no Brasil, sendo o boto-vermelho (*Inia geoffrensis*) o principal representante (HRBEK et al., 2014; GRAVENA et al., 2014).

Essa espécie está classificada como em perigo de extinção, principalmente, devido às crescentes ameaças antrópicas, como o aumento de capturas, a degradação dos recursos naturais, perda de habitat e poluição dos ambientes aquáticos, através de efluentes de fossas sépticas, de indústrias, de fazendas agrícolas e aquícolas, dentre outros (IRIARTE et al., 2013; DA SILVA et al., 2018; MAREGA-IMAMURA et al., 2020). Sabe-se que os cetáceos de água-doce estão entre os mais ameaçados de extinção, devido aos grandes impactos humanos nos ambientes onde vivem (AVILA et al. 2018).

Os cetáceos, de maneira geral, incluindo aqueles de ambientes dulcícolas, são importantes sentinelas para as condições ambientais por estarem no topo da cadeia alimentar e serem longevos, apresentando o potencial de acúmulo de substâncias e micro-organismos em seus organismos (BOSSART, 2011). Os micro-organismos presentes na microbiota desses animais, por sua vez, mantém uma forte interação com substâncias e outros micro-organismos inseridos no ambiente aquático, respondendo a diferentes condições ambientais e, assim, atuando como bioindicadores (FURNESS et al., 2017). Além disso, o aumento rápido e desordenado do ecoturismo possibilita o contato próximo entre seres humanos e esses animais e traz sérias implicações na troca de micro-organismos, podendo levar à emergência de patógenos na população humana ou animal (CARROLL et al., 2015; VIDAL, 2018).

Nesse contexto, a investigação de micro-organismos da microbiota desses animais pode indicar a presença de contaminantes e servir como parâmetro de análise da saúde e ambiental e impactos humanos (STEWART et al., 2008). Existem poucos estudos publicados acerca do isolamento de micro-organismos de cetáceos de água-doce (NELSON et al., 2015). Entretanto, a detecção de bactérias potencialmente patogênicas, apresentando resistência antimicrobiana já foi relatada em cetáceos e pinípedes de vida livre, principalmente por bactérias Gram-negativas (WALLACE et al., 2013; SCHAEFER et al., 2019). Assim, podendo ser considerado um problema de saúde pública na medicina veterinária e humana e, portanto, um problema de Saúde Única. (RADHOUANI et al., 2014)

As bactérias tendem a compartilhar genes de virulência, incluindo genes de resistência a antibióticos, nos ambientes onde habitam (KARKMAN et al., 2018). Os ambientes aquáticos podem atuar como reservatórios de bactérias patogênicas, enquanto os organismos aquáticos podem atuar como vetores desses microrganismos (GROSSART et al., 2010; TELLO et al., 2012). Os estudos sobre fatores de virulência de bactérias isoladas de mamíferos aquáticos ainda são escassos, havendo alguns relatos da presença de genes de virulência em bactérias Gram-negativas de pinípedes (HUGHES et al., 2013; DELPORT et al., 2015).

Estudos publicados a respeito de bactérias isoladas de botos-vermelhos são escassos. Nesse contexto, esse trabalho teve como objetivo avaliar a sensibilidade antimicrobiana e a produção de fatores de virulência por bactérias Gram-negativas isoladas de duas populações de botos de vida livre da espécie *Inia geoffrensis*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Taxonomia e características gerais do boto-vermelho

Os mamíferos aquáticos constituem um grupo distinto da classe Mammalia, assim denominados pela sua dependência do meio aquático para realização de funções vitais, como alimentação e reprodução (BOESSENECKER, 2018). Atualmente, este grupo é representado por cerca de 130 espécies que estão divididas na ordem Cetartiodactyla, formada pelos golfinhos, botos e baleias, na ordem Sirenia, representada pelos peixes-bois e dugongos e na ordem Carnivora, constituída pela subordem Caniformia, compostas pelas focas, leões e lobos-marinhos e morsas, e as famílias Mustelidae, como ariranhas e lontras, e Ursidae, representada pelo urso-polar (JEFFERSON et al., 2011).

Esses animais evoluíram do meio terrestre através de modificações anatômicas e fisiológicas e se adaptaram ao meio aquático, com significativas mudanças em relação à natação, mergulho, alimentação, controle da temperatura corporal e osmorregulação, dos quais apenas os sirênios e cetáceos são considerados totalmente adaptados à vida aquática. (ELSNER, 2002; BERTA et al., 2006).

A ordem Cetacea é formada por 88 espécies que estão divididas em duas subordens: Mysticeti e Odontoceti. A primeira é representada pelas baleias verdadeiras e é composta por 16 espécies, das quais oito ocorrem no Brasil, enquanto a última é constituída pelos golfinhos, botos, orcas e cachalotes, possui 72 espécies, das quais 35 ocorrem no Brasil (WÜRSIG et al., 2018). Essas subordens se diferenciam pelas suas estruturas na cavidade oral e orifícios respiratórios, de forma que os misticetos apresentam uma série de placas queratinizadas na cavidade oral, chamadas de barbatanas, e dois orifícios, enquanto os odontocetos possuem dentes verdadeiros e um único orifício (MARIGO et al., 2014).

A família Iniidae representada pelos botos, animais odontocetos, é uma das quatro famílias de cetáceos de água doce, juntamente com as famílias Platanistidae, Pontoporiidae e Lipotidae (GRAVENA et al., 2014). O principal representante dessa família, o boto da Amazônia (Blainville, 1817), popularmente chamado de boto-cor-de-rosa ou boto-vermelho, é uma espécie pertencente à classe Mammalia, ordem Cetartiodactyla, subordem Odontoceti, família Iniidae, gênero *Inia*, que possui três espécies *I. araguaiaensis*, *I. boliviensis* e *I. geoffrensis*. A espécie *I. geoffrensis* é subdividida em duas subsespécies: *I. geoffrensis geoffrensis* e *I. geoffrensis humboldtiana* (BEST; DA SILVA, 1989; RICE, 1998). Essa subdivisão ocorreu devido a divergências moleculares e morfológicas da espécie (HRBEK et

al., 2014). Entretanto, existem controvérsias em relação à classificação taxonômica usada para as espécies do gênero *Inia*, uma vez que as espécies recém descritas por Hrbek et al. (2014), como o *I. araguaiaensis*, ainda não são reconhecidas pelo comitê de taxonomia da *Society for Marine Mammalogy*, sendo aceito de maneira global, somente a espécie *I. geoffrensis*, subdividida em 3 subespécies (*I. g. geoffrensis*, *I. g. boliviensis* e *I. g. humboldtiana*).

O boto é considerado um animal solitário, onde raramente é observado em grupos de animais com mais de três indivíduos, porém duplas formadas pela mãe e o filhote são comuns e agregações podem ocorrer em áreas de alimentação, descanso e durante o período de acasalamento (BEST; DA SILVA, 1993; MARTIN; DA SILVA, 2006). Sua coloração pode variar de cinza-escuro a rosa brilhante, dependendo da idade e do sexo do animal. Embora os machos adultos e sexualmente ativos sejam significativamente mais rosados que as fêmeas, acredita-se que a coloração é dependente da temperatura, clareza da água e localização geográfica (DA SILVA, 2010).

Quanto à distribuição geográfica, o boto-vermelho é endêmico das bacias dos rios Amazonas e Orinoco. As populações desses animais são distribuídas por seis países da América do Sul (Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Peru, Venezuela) e nos rios Branco e Tacutu, ao longo da fronteira do Brasil com a Guiana, em uma área de aproximadamente sete milhões de Km² (BEST; DA SILVA, 1989; NORDIN; MEADE, 1986).

A distribuição da espécie é limitada principalmente por águas marinhas, corredeiras intransitáveis, cachoeiras e partes rasas e estreitas dos rios, gerando barreiras biogeográficas que podem separar populações e diferenciar espécies (BEST E DA SILVA, 1993). De maneira geral, os botos do gênero *Inia*, durante a estação das secas, ficam restritos aos grandes e profundos lagos e aos principais canais de rios do sistema Amazônico, desde o delta, próximo a Belém, até os principais afluentes como os rios Solimões, Branco, Negro e Tapajós (GRAVENA et al., 2014).

Em 2007 a espécie *I. geoffrensis* era classificada como “Vulnerável” (VU) de acordo com a Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN Red List), porém em 2008, foi reavaliada e classificada como “Dados Insuficientes” (DD) devido ao desconhecimento de estatísticas populacionais (IUCN, 2008). Entretanto, em junho de 2018, foi novamente reclassificada como “Em Perigo” (EN) de extinção (IUCN, 2018). Essa nova classificação está associada aos crescentes impactos antropogênicos, como o aumento de capturas, a degradação dos recursos naturais, perda de

hábitat e poluição dos ambientes aquáticos (IRIARTE et al., 2013; DA SILVA et al., 2018; MAREGA-IMAMURA et al., 2020). Além disso, sabe-se que os cetáceos de água-doce estão entre os cetáceos mais ameaçados de extinção, devido ao maior impacto das atividades humanas sobre os ambientes onde vivem (AVILA et al. 2018).

Figura 1 – Mapa de distribuição das espécies e subespécies do gênero *Inia*



Fonte: Hrbek et al. (2014)

O boto faz parte do folclore do povo amazônico, sendo relatado em histórias míticas e lendárias como um animal associado a poderes sobrenaturais. (CRAVARRO, 1999). Além disso, o nome boto-cor-de-rosa, termo usado pela mídia nacional e internacional, também gera destaque a espécie no ramo do turismo ecológico da região Amazônica (VIDAL et al., 2013). Embora o misticismo histórico desse animal evite a proximidade com o homem ribeirinho, a prática do ecoturismo está presente no estado do Amazonas, envolvendo atividades de observação e/ou interação com botos na natureza (IPE, 2009).

Os cetáceos são animais considerados carismáticos e relativamente fáceis de serem vistos em seu hábitat natural, por isso têm sido alvo de uma crescente demanda por interação

(REEVES et al., 2003). O boto-vermelho possui comportamento dócil e brando, busca interagir com humanos, se aproximando de embarcações regionais (barcos, canoas), durante as práticas cotidianas de pescadores e moradores que vivem às margens dos grandes rios amazônicos e seus afluentes (GRAVENA et al., 2008). Assim, devido ao seu tamanho, comportamento, hábito, apelo e endemismo na região Amazônica, a espécie é atrativa para o turismo interativo (ALVES et al., 2011).

As atividades turísticas possuem potencial econômico e podem gerar benefícios para o meio ambiente, contribuindo para a conservação de espécies selvagens (ORAMS, 2002). Entretanto, o crescimento rápido e desordenado sem planejamento e monitoramento da atividade pode ocasionar impactos negativos, como comprometimento ambiental e ameaças para turistas e muitas espécies animais (BOO, 2001; ROMAGNOLI et al., 2011). No estado do Amazonas, em algumas Unidades de Conservação, acontecem interações turísticas com botos na natureza como: observação, natação, contato direto, alimentação e brincadeiras (PARSONS et al., 2003; SCARPACI & DAYANTHI, 2003). Esse contato próximo acarreta impactos à saúde do ambiente aquático e traz sérias implicações na troca de micro-organismos, podendo levar à emergência de patógenos na população animal e riscos de transmissão de doenças zoonóticas, por exemplo, brucelose e leptospirose (MORENO et al., 2012; CARROLL et al., 2015).

Nesses locais, ocorrem rotatividade e competitividade entre os animais à procura de alimento, gerando consequências negativas, como agressividade entre os indivíduos, acidentes envolvendo turistas e oferta de alimentos de qualidade duvidosa ou que não fazem parte da dieta natural dos animais (ROMAGNOLI, 2009; VIDAL, 2011; VIDAL et al., 2013). Assim, considerando as consequências associadas ao modelo de turismo implementado, a escassez de informações que indiquem os impactos positivos e negativos deste tipo de turismo e a ausência de normatizações e monitoramento para o turismo com botos na Amazônia é extremamente necessária a realização de estudos que gerem informações que contribuam para a preservação e melhoria da saúde animal e ambiental (VIDAL et al., 2018).

Outras atividades antrópicas que ameaçam direta e indiretamente as populações de botos da Amazônia incluem as capturas acidentais por redes de pesca, a caça intencional por pescadores para uso da carne animal como isca ou devido à competição pelo pescado, aumento no tráfego de embarcações, desmatamento, assoreamento de rios, implantação de hidroelétricas e contínua poluição do ambiente aquático, por meio do despejo de resíduos de mineradoras, de indústrias, de fazendas e de esgotos domésticos (REEVES et al., 2000;

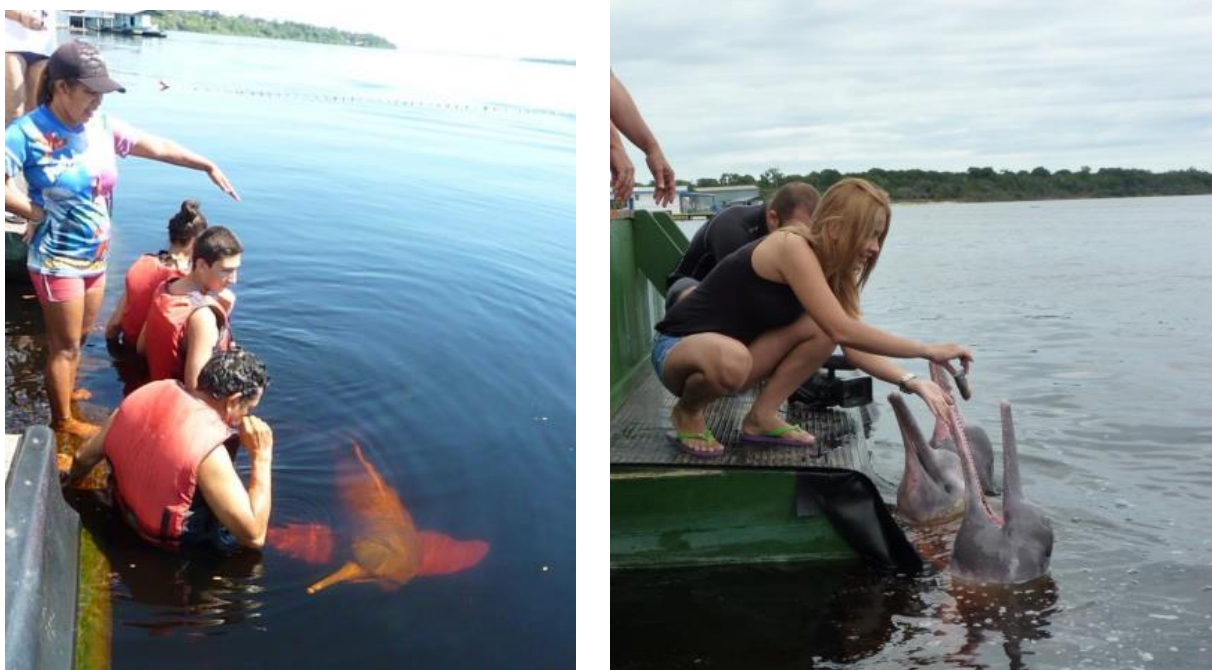
DAWSON et al., 2008). Assim, a poluição dos ambientes aquáticos possui um grande impacto sobre biodiversidade desses ecossistemas, por afetar a qualidade da água e, conseqüentemente, a saúde de organismos aquáticos (VÖRÖSMARTY et al., 2010).

2.2. Rio Negro e Rio Tapajós

O Rio Negro está localizado na bacia amazônica possuindo 2250 km de extensão, a maior bacia hidrográfica do mundo. Apresenta um dos maiores índices pluviométricos do mundo (2250–2500 mm por ano em Manaus) e geralmente exhibe baixas concentrações de sedimentos e nutrientes (VILLAR et al., 2009). As águas são ácidas (pH 3,9-5,4) devido à decomposição de detritos da vegetação da floresta tropical que libera ácidos, dando a característica particular de rio de águas negras (VIEIRA et al., 2016). Além disso, a presença de cobre e zinco em confluências do Rio Negro já foram relatadas, onde esses elementos metálicos podem ser absorvidos por sedimentos da matéria orgânica em suas águas negras, entrando em sistemas fluviais e lacustres (GUINOISEAU et al., 2018; CONSTANTINO et al., 2019).

Na região do Baixo Rio Negro, são crescentes as atividades de turismo interativo com o boto, onde se encontram sete casas flutuantes usadas para o ecoturismo, nas quais os visitantes podem ofertar alimentos e nadar com os animais (GRAVENA et al., 2019). O mais antigo destes empreendimentos, denominado Flutuante dos Botos, situa-se no Parque Nacional de Anavilhanas, no município de Novo Airão, Unidade de Conservação de Proteção Integral gerida pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio.

Figuras 2 - Turistas em interação com os botos em plataformas submersas sobre o Rio Negro, Parque Nacional de Anavilhanas. Amazonas, Brasil.



Fonte: Vidal et al. (2018)

O Rio Tapajós é um dos grandes afluentes ao sul do rio Amazonas, com aproximadamente 840 km de extensão. As margens dos rios e os lagos costeiros são inundados durante a estação chuvosa, de dezembro a maio, mas durante o restante do ano, os níveis de água diminuem e os lagos são parcial ou completamente secados (MORAES et al., 2020). A vegetação regional é predominantemente composta por florestas de sequeiro, que podem reduzir o fluxo de água e contaminantes durante a estação chuvosa, dando um aspecto claro e levemente ácido (pH 6,03-6,63) às águas do rio (EMBRAPA, 2014; LINO et al., 2019). Além disso, algumas áreas têm sido reconhecidas como barreiras biogeográficas que separam centros amazônicos e até populações animais (SALDANHA et al., 2019).

Na bacia do Rio Tapajós, o mercúrio é considerado um contaminante predominante no ecossistema aquático. Impactos antropogênicos como mineração e desmatamento (aumento da erosão) ao redor do curso do rio são as principais fontes de contaminação ambiental por diferentes metais, incluindo cobre, zinco e ferro (OESTREICHER et al., 2017; LINO et al., 2019). Assim, as fontes e qualidade da água representam importantes fatores à dinâmica e conservação de espécies aquáticas, podendo acarretar surtos causando declínio populacional, alta mortalidade e ainda a extinção de espécies ameaçadas (DO AMARAL et al., 2018).

2.3 Estudo da microbiota em cetáceos

Os micro-organismos colonizadores da pele e das superfícies mucosas, que compõem a microbiota de diferentes espécies animais, exercem um papel crucial por meio de vários mecanismos, como equilibrar os processos biológicos básicos, por exemplo, aquisição de nutrientes, modular o fenótipo metabólico e regular o desenvolvimento epitelial e a imunidade inata fornecendo benefícios para os seus hospedeiros (WANG et al., 2017). Além disso, a microbiota está relacionada ao processo de estabelecimento de doenças, fornecendo uma barreira física e protegendo seu hospedeiro contra patógenos estrangeiros através de exclusão competitiva e produção de substâncias antimicrobianas. Ainda, ela é essencial no desenvolvimento da mucosa intestinal e do sistema imunológico do hospedeiro (SEKIROV et al., 2010).

O conhecimento de micro-organismos simbióticos nos diferentes nichos do hospedeiro ajuda a entender a relação parasita-hospedeiro e suas atribuições em doenças infecciosas (MACPHERSON & HARRIS, 2004). As infecções são comumente causadas pela disfunção ou desequilíbrio da microbiota, chamada de disbiose (KRISS et al., 2018). Além disso, as doenças infecciosas de caráter bacteriano são as principais causas de mortalidade natural de mamíferos marinhos (KOCH et al., 2018).

Os primeiros estudos acerca da caracterização da microbiota de cetáceos tiveram início na década de 80, a partir de técnicas de cultivos microbiológicos convencionais (VEDROS et al., 1982). Entretanto, estudos sobre a microbiota de mamíferos aquáticos são escassos e limitados a poucas espécies de hospedeiros. Dentre os cetáceos, a espécie *Tursiops truncatus* (golfinho-nariz-de-garrafa) possui a microbiota mais estudada e mais bem caracterizada em populações de animais de cativeiro e de vida livre (LIMA et al., 2012). Até a presente data, desconhecem-se estudos demonstrando o isolamento de bactérias da microbiota de cavidades naturais de botos-vermelhos.

De maneira geral, as pesquisas que envolvem o isolamento bacteriano em cetáceos são limitadas e focadas na identificação e resistência aos antimicrobianos, porém possuem o potencial de aplicabilidade no monitoramento da contaminação ambiental, da resistência antimicrobiana e da saúde dos ecossistemas aquáticos (OBUSAN et al., 2018). Nesse contexto, apesar de grande parte dos estudos relatados terem sido realizados com animais em cativeiro, amostras de animais de vida livre apresentam maior relevância, uma vez que os resultados podem ser correlacionados a impactos antrópicos sobre a saúde de populações selvagens (NELSON et al., 2015; DURANTE et al., 2020).

Quanto as técnicas de coleta dos animais, métodos de colheita são priorizadas, principalmente por meio de *swabs* estéreis inseridos em cavidades e orifícios naturais, como cavidade oral, espiráculo, abertura genital, reto, além de fezes (HERMOSILLA et al., 2018; SCHAEFER et al., 2019). Além disso, outras formas de coleta incluem animais capturados por *bycatch*, termo usado para definir as espécies que são capturadas acidentalmente durante as pescarias ou encalhes, onde geralmente se prioriza a rápida colheita de amostras de órgãos íntegros para evitar contaminações (POTTER, 2013).

Diferentes abordagens para a identificação e caracterização da microbiota de cetáceos têm sido utilizadas, através de cultivos microbiológicos convencionais, metagenômica e sequenciamento genético (DUDEK et al., 2017; RUSSO et al., 2018). O isolamento de bactérias Gram-negativas tem sido relatado como predominante em amostras biológicas de várias espécies de mamíferos marinhos (WALLACE et al., 2013; STEWART et al., 2014; OBUSAN et al., 2018; SCHAEFER et al., 2019).

De maneira geral, os mamíferos aquáticos, incluindo aqueles de ambientes dulcícolas, podem atuar como animais sentinelas na avaliação da saúde dos ecossistemas aquáticos (BOSSART, 2011). Pelo fato desses animais estarem no topo da cadeia alimentar, possuem expectativa de vida longa e persistem em ambientes costeiros por um longo período, eles possuem o potencial de acúmulo de substâncias e micro-organismos em seus organismos (BOGOMOLNI et al., 2008). Assim, estudos que visam à caracterização da microbiota de cetáceos podem demonstrar o papel desses animais como reservatórios capazes de disseminar patógenos potencialmente zoonóticos, além da sua função como animais sentinela em rios, estuários dulcícolas e ambientes marinhos na análise da concentração e distribuição de resíduos humanos, permitindo a identificação do que é endêmico para os ambientes aquáticos e o que é introduzido pela atividade antrópica (MOORE, 2008; FURNESS et al., 2017).

2.4 Bactérias Gram-negativas

Recentemente, houve um aumento considerável no estudo dos efeitos que os micro-organismos comensais exercem sobre a saúde dos mamíferos (YOUNG; VINCENT, 2017). As bactérias Gram-negativas estando bem difundidas nos principais nichos dos hospedeiros, como pele e nos tratos geniturinário, gastrointestinal e respiratório, compõem a microbiota e desempenham um papel fundamental na saúde e nas doenças humanas e animais (SEKIROV et al. 2010).

2.4.1 Ordem *Enterobacterales*

Os bacilos Gram-negativos pertencentes à ordem *Enterobacterales*, composta atualmente por oito famílias, são os isolados bacterianos mais frequentemente encontrados recuperados de amostras clínicas (ADEOLU et al. 2016). Amplamente dispersos na natureza, esses organismos são encontrados no solo e na água, nas plantas e, como o nome da família indica, fazem parte também da microbiota do trato intestinal de humanos e animais. As bactérias dessa ordem demonstram características bioquímicas semelhantes, apesar de ocorrerem exceções, como fermentação de glicose, não apresentação de atividade da enzima citocromo oxidase e redução o nitrato a nitrito (KONEMAN et al., 2018).

Em 2016, uma nova classificação filogenética e taxonômica baseadas no genoma das enterobactérias foi proposta, no qual foram criadas famílias, como *Erwiniaceae*, *Yersiniaceae*, *Hafniaceae* e *Morganellaceae*, antigos membros da família *Enterobacteriaceae* (ADEOLU et al. 2016). Diversos membros dessa ordem já foram isolados de amostras biológicas de mamíferos aquáticos, com ênfase para os bacilos da família *Enterobacteriaceae* (WALLACE et al., 2013; SCHAEFER et al., 2019; SYLVAIN et al., 2019).

O gênero *Klebsiella* recebeu o nome em homenagem a Edwin Klebs. Esses bacilos também foram descritos por Carl Friedlander e inicialmente denominados "bacilo de Friedlander" em 1882, em pulmões de indivíduos que faleceram com pneumonia (FRIEDLANDER, 1882). As espécies de *Klebsiella* são amplamente distribuídas na natureza e no trato gastrointestinal de humanos e animais, apresentando características de bacilos Gram-negativos fermentadores de lactose e imóveis (MURRAY et al., 2020). Em ágar MacConkey, as colônias geralmente aparecem grandes, mucoides e roxas, indicando fermentação da produção da lactose e produção de ácidos. O aspecto mucóide dessas bactérias é característico por serem revestidas por uma cápsula composta de polissacarídeos que favorece a evasão do sistema imune do hospedeiro, evitando a fagocitose, além do processo de formação e de maturação de biofilmes (PACZOSA; MECSAS, 2016). Entretanto, nem todas as cepas são mucoides, e certas espécies de *Enterobacter* podem simular de perto as espécies de *Klebsiella* em testes de triagem (LEE et al., 2017).

A taxonomia do gênero *Enterobacter* teve um percurso conturbado. No passado as linhagens de bactérias desse gênero eram conhecidas como *Aerobacter aerogenes*. A nomenclatura do gênero foi alterada para *Enterobacter* por Hormaeche e Edwards apenas em 1960, apresentando originalmente 29 espécies e subespécies (HORMAECHE et al., 1960). Até 2017 as principais espécies representantes desse gênero eram *Enterobacter aerogenes* e

Enterobacter cloacae, sendo mais comumente encontradas em amostras clínicas. Entretanto, Tindall e colaboradores (2017), reclassificaram a espécie *Enterobacter aerogenes* em *Klebsiella aerogenes*, através de técnicas de sequenciamento genômico.

Espécies de *Enterobacter* são amplamente distribuídos na água, no solo, nos esgotos e vegetais, além de fazerem parte da microbiota entérica comensal. Essas bactérias compartilham semelhanças macro morfológicas com o gênero *Klebsiella*, mas podem ser diferenciadas por serem móveis e positivas no teste de ornitina descarboxilase (KONEMAN et al, 2018). Quanto aos fatores de virulência, cepas de *Enterobacter cloacae* podem carregar genes para a produção de β -lactamases codificada por cromossomos que pode ser induzida pelo uso de antibióticos e já foram relatadas serem capazes de produzir toxinas Shiga-like (CAO et al., 2017; CARTER et al., 2017).

O gênero *Morganella* foi criado através de estudos genéticos realizados por Brenner e colegas em 1978, o principal representante anteriormente designado *Proteus morganii* foi transferido para o novo gênero *Morganella* como *M. morganii* (BERGEY et al., 1984). O padrão de provas bioquímicas características desse gênero é citrato negativo, de sulfeto de hidrogênio negativo e fenilalanina desaminase positivo. *M. morganii* é considerado um patógeno humano incomum e é amplamente distribuído no ambiente e na flora intestinal normal de humanos, mamíferos e répteis (LIU et al, 2016). Os fatores de virulência naturais dessa espécie incluem sistema de secreção tipo III, protease IgA, urease, sistema de aquisição de ferro, dentre outros (BANDY, 2020).

2.4.2 Bacilos Gram-negativos não-fermentadores

No diagnóstico microbiológico, algumas características indicam a suspeita de um bacilo Gram-negativo membro do grupo dos não-fermentadores como não fermentar glicose, produzir citocromo oxidase e falhar do crescimento em ágar MacConkey. Assim, na rotina laboratorial, testes de triagem podem ser realizados para confirmação dessas suspeitas, por exemplo, teste do metabolismo Oxidativo/Fermentativo (O.F.) e em fitas de oxidase (KONEMAN et al, 2018).

O gênero *Pseudomonas* compartilha as características de serem bacilos Gram-negativos, ubíquos, não fermentadores, de maioria móveis e aeróbios estritos. As espécies desse gênero são capazes de oxidar a glicose e outros carboidratos (MORADALI et al., 2017). Em ágar MacConkey, a identificação rápida de cepas de *P. aeruginosa* pode ser feita de acordo com a observação de características como morfologia típica das colônias, produção de

pigmentos difusíveis, presença de odor frutado e oxidase positiva (MULET et al., 2017). A patogenicidade de membros desse gênero é complicada e complexa, uma vez que o tratamento de infecções é dificultado devido ao estreito número de antimicrobianos eficazes e pela produção de uma ampla variedade de fatores de virulência como fosfolipases, proteases e hemolisinas, além da produção de alginato, um polissacarídeo associado ao desenvolvimento de uma característica mucoide das colônias e à formação de biofilmes (ROCHA et al., 2019).

Outros gêneros como *Stenotrophomonas*, criado em 1993, para acomodar a antiga espécie *Pseudomonas maltophilia*, hoje reconhecida como *S. maltophilia*, são bacilos Gram-negativos, não fermentadores, móveis, também considerados ubíquos, sendo recuperadas de água, solo e esgotos (AN; BERG, 2018). Essa espécie pode ser facilmente distinguida de outras espécies de *Pseudomonas* por serem citocromo oxidase negativas, além das colônias podem aparecer amarelo pálido ou cinza lavanda no meio de ágar-sangue de carneiro. Ocasionalmente, causa infecções oportunistas e está emergindo como um importante patógeno adquirido no hospital, comumente sendo isolada em pacientes com infecções do trato respiratório (BROOKE et al., 2017).

2.5 Resistência antimicrobiana em bactérias de mamíferos aquáticos

A resistência antimicrobiana é um problema complexo que ameaça à saúde humana e animal, economia e segurança nacional e global (HUGHES, 2011). À medida que a resistência aos antibióticos aumenta, a probabilidade de tratar com sucesso infecções causadas por patógenos bacterianos comuns continua a diminuir, resultando em aumento da morbidade e mortalidade (HAWKEY; JONES, 2009). De acordo com o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) cerca de 2 milhões de infecções resistentes a medicamentos ocorrem anualmente, ocasionando 23.000 mortes e 20 bilhões de dólares em custos diretos anuais em saúde nos Estados Unidos (CDC, 2013). Por esse motivo, a Organização Mundial da Saúde (OMS) incluiu a resistência antimicrobiana como uma das dez principais ameaças à saúde global em 2019 (WHO, 2019).

Os ambientes aquáticos têm o potencial de desempenhar um papel significativo no surgimento da resistência antimicrobiana, especialmente em áreas altamente impactadas pelas atividades humanas (TELLO et al. 2012). Esses ecossistemas aquáticos recebem antibióticos e diversos compostos químicos de fontes de origem humana, como efluentes urbanos, liberados de esgotos e fossas sépticas, resíduos de hospitais e instalações agrícolas e aquícolas (AVILA et al., 2018; DA SILVA et al., 2019). Assim, altas concentrações ambientais de compostos

antimicrobianos em ambientes aquosos criam uma pressão seletiva em bactérias que residem nesses locais, sendo constantemente expostas e ocasionando alterações no perfil de sensibilidade antimicrobiana de micro-organismos (CARROLL et al., 2015)

Esses ecossistemas podem acumular patógenos bacterianos, atuando como reservatórios de genes de resistência e facilitando a troca desses genes entre espécies (RIZZO et al., 2013). A ocorrência de bactérias resistentes a antibióticos isoladas da microbiota de animais aquáticos é multifatorial (GAW et al., 2014). Apesar do uso profilático de antibióticos favorecer a ocorrência de resistência bacteriana no tratamento de enfermidades de animais de cativeiro, fatores sociais, econômicos e de saneamento ambiental, além da transmissão indireta de micro-organismos em ambientes impactados pela atividade humana fornecem condições que podem promover o surgimento de bactérias resistentes em animais selvagens de vida livre (BOGOMOLNI et al., 2008; STEWART et al., 2014).

Em ambientes contaminados por diferentes compostos químicos como, antibióticos, analgésicos, antidepressivos, anti-hipertensivo e metais pesados, a exposição crônica à doses subtóxicas, potencialmente mutagênicas, pode induzir alterações fenotípicas nos microrganismos que compõem a microbiota dos animais levando a superexpressão e persistência de genes de resistência a antimicrobianos (ROSE et al., 2009; DI CESARE et al., 2016). Assim, vários mecanismos de aquisição de resistência já foram identificados em bactérias Gram-negativas, por exemplo, a transmissão mediada por plasmídeos é o mecanismo mais comum de transferência horizontal de genes para a disseminação de resistência entre bactérias (RADHOUANI et al., 2014; CARROLL et al., 2015).

Em enterobactérias, mecanismos mediados por genes plasmidiais, por exemplo, para produção de enzimas como beta-lactamases e macrolídeos esterases e fosfotransferases, são capazes de hidrolisar o anel beta-lactâmico de cefalosporinas e modificar a estrutura de macrolídeos, respectivamente (IREDELL et al., 2016; GOMES et al., 2017). O aumento do isolamento de bactérias da ordem Enterobacterales, *Pseudomonas* spp. e *Acinetobacter* spp resistentes à cefalosporina de amplo espectro foi observado nos últimos anos, nas quais se tornam um problema de saúde pública devido ao uso limitados de agentes antimicrobianos para o tratamento de infecções (BARTLEY et al., 2019). Além disso, o surgimento de enzimas denominadas metalo-beta-lactamase, podendo ser expressas pelos mesmos mecanismos, levam ao surgimento de bacilos Gram-negativos resistentes aos antibióticos carbapenêmicos, considerados opções terapêuticas no tratamento de infecções hospitalares graves (PATHAK et al., 2017). Outros mecanismos de resistência como a expressão de genes

para a produção de bombas de efluxo, que são máquinas defensivas da célula bacteriana que expulsam ativamente substâncias tóxicas do citoplasma, incluindo metais e drogas antimicrobianas que atuam intracelularmente como aminoglicosídeos, fluorquinolonas e tetraciclina, foram relatadas em bactérias ambientais de ambientes contaminados (SOUNDY; DAY, 2020; PAL et al., 2020).

Acerca da multirresistência bacteriana em isolados Gram-negativos de cetáceos, estudos revelam uma frequência maior de resistência a drogas do grupo dos beta-lactâmicos e macrolídeos (ROSE et al., 2009; STEWART et al., 2014; SCHAEFER et al., 2019). Apesar disso, pesquisas sistemáticas de caracterização da microbiota de cetáceos de vida livre em áreas costeiras da Florida (EUA), altamente impactadas pela atividade humana, o isolamento de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina já foi relatado em três animais da espécie *Tursiops truncatus* (SCHAEFER et al., 2009). Ademais, o isolamento de bactérias Gram-negativas resistentes a antibióticos do grupo das fluorquinolonas, cefalosporinas, aminoglicosídeos e tetraciclina também já foram relatadas em cetáceos de vida livre (STEWART et al., 2014; HERMOSILLA et al., 2018; OBUSAN et al., 2018). Assim, a proximidade das atividades humanas influencia no aparecimento de resistência antimicrobiana em animais selvagens, tornando-se um problema mundial na medicina humana e veterinária (BOSSART, 2011). Embora os cetáceos possam ser disseminadores de microrganismos zoonóticos resistentes, rotas de transmissão são limitadas às pessoas que possuem contato direto e que compartilham áreas de convívio com esses animais. Além disso, patógenos zoonóticos de mamíferos marinhos não são amplamente distribuídos nas populações humanas (BOGOMOLNI et al., 2008; RADHOUANI et al., 2014).

Portanto, os mamíferos aquáticos exercem um papel crucial como animais sentinelas no entendimento das interações entre humanos, animais e meio ambiente, indicando o surgimento de doenças emergentes, resistência antimicrobiana e patógenos virulentos (OBUSAN et al., 2018). Entretanto, estudos sobre a ocorrência de resistência antimicrobiana na fauna selvagem aquática ainda são escassos, apresentando dados limitados a respeito da dinâmica de agentes infecciosos no monitoramento da saúde desses animais (MOORE, 2008. NELSON et al. 2015). Como resultado, é necessário entender a importância crucial da abordagem *One Health* para controlar o surgimento de resistência antimicrobiana, que incorpora uma resposta integrada e multissetorial humana, animal, ambiental, ecossistêmica e da fauna selvagem (WHITE E HUGHES, 2019).

2.6 Fatores de virulência

A virulência de um micro-organismo geralmente não é atribuível a um único fator. Fatores de virulência bacteriana são componentes estruturais ou produtos produzidos (não estruturais) por bactérias que permitem que o organismo prejudique o hospedeiro de alguma maneira (JOHNSON; BECK et al., 2018). A virulência é verificada em muitas bactérias provenientes do ambiente marinho, principalmente de cepas de *Vibrio* spp., quando as alterações genéticas que levaram à aquisição de genes de virulência irão resultar em uma vantagem para a sua sobrevivência num determinado nicho (HUGHES et al., 2013). Assim, cepas mais virulentas podem surgir ocasionando surtos e infecções graves em organismos aquáticos.

2.6.1 Biofilmes bacterianos

No século XVII, Antoine Von Leeuwenhoek, pela primeira vez, observou um tipo de estrutura em seus próprios dentes, uma descoberta que hoje denomina-se biofilme dentários (GEST, 2004). Em seguida, Zobell, em 1943, declarou que “a água do mar circundante tem menos número de bactérias do que na superfície” e Heukelekian e Heller observaram o “Efeito Garrafa” dos microrganismos marinhos, constatando que crescimento e a atividade aumentavam quando eram fixados a uma superfície. Entretanto, a teoria de biofilmes bacterianos foi proposta apenas em 1978, por Costerton e colaboradores (ZOBELL, 1943; HEUKELEKIAN; HELLER, 1940; COSTERTON; LAPPIN-SCOTT, 1995).

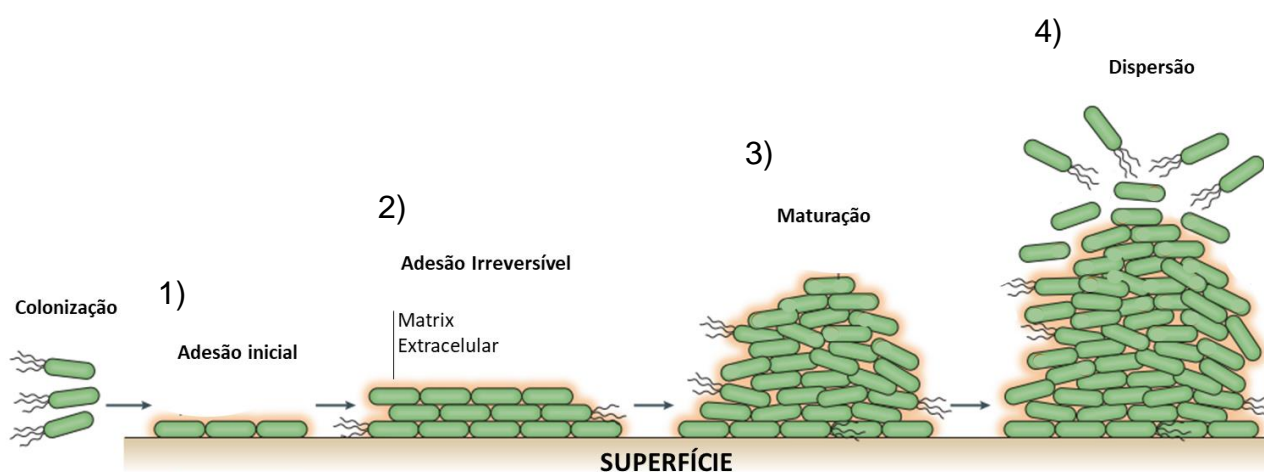
Define-se biofilme como uma comunidade tridimensional microbiana de células sésseis, aderidas a uma superfície biótica ou abiótica imersas em uma matriz extracelular composta de polissacarídeos hidratados, proteínas e DNA (VENKATESAN et al., 2015). A estrutura de biofilme é complexa, no qual micro-organismos imersos em matriz possuem um tipo especial de sinalização, conhecido como *quorum sensing* (JAMAL et al., 2018). Essas moléculas são responsáveis por coordenar desde a densidade populacional à expressão de fatores de virulência (BALCÁZAR et al., 2007).

Em geral, os biofilmes bacterianos demonstram uma maior sobrevivência e resistência a estressores ambientais e químicos, por exemplo, antibióticos, além da proteção conferida pela matriz polissacarídica contra as defesas do sistema imunológico do hospedeiro (KUMAR et al., 2017). Entretanto em habitats aquáticos, os biofilmes se desenvolvem em substratos bentônicos, como pedras e areia de leitos e em macro e microagregados flutuantes, participando ativamente da decomposição da matéria orgânica (SIMON et al., 2002). Assim,

comunidades de biofilme podem ser utilizadas como parâmetros para avaliar a qualidade geral da água e o status ecológico do sistema, sendo bons indicadores da resposta à poluição antropogênica de ambientes aquáticos (SABATER et al., 2007).

Na formação do biofilme, as células microbianas aderem à superfície através de seus apêndices, como fímbrias e flagelos, e podem se ligar através de outras forças físicas, como forças de van der Waal e interações eletrostáticas (GARRETT et al, 2008). Em superfícies bióticas, como mucosas de animais, inicialmente há uma predominância na produção de exopolissacarídeos, os quais consistem principalmente de polissacarídeos, que é o principal componente da adesão celular no biofilme (BERNE et al., 2018).

Figuras 3–Representação esquemática da formação de biofilme. A formação de um biofilme ocorre em várias etapas, compreendendo adesão, desenvolvimento, maturação e dispersão da comunidade bacteriana. (1) No início da formação de biofilme, células móveis com flagelos se aderem e diferenciam em células não móveis. (2) Inicia-se a produção de matriz, que param de se separar e formam cadeias cercadas por matriz extracelular. (3) Nos biofilmes em maturação, as células aumentam a densidade do biofilme e mais produção de matriz extracelular polimérica para o amadurecimento do biofilme. (4) Nos biofilmes envelhecidos, as células quebram a matriz extracelular dando início a dispersão no meio ambientes para colonização de novos sítios.



Fonte: Modificado de Vlamakis et al. (2013)

2.6.2 *Proteases*

As proteases representam uma classe de enzimas que desempenham um importante papel em processos fisiológicos. Elas hidrolisam ligações peptídicas de proteínas e peptídeos para produzir peptídeos menores e aminoácidos livres (GUPTA, 2017). Essas enzimas estão envolvidas em processos fisiológicos, como coagulação sanguínea e morte celular, podendo ser classificadas quanto à natureza química do sítio catalítico e mecanismo de ação, como as serina proteases, proteases de cisteína, aspártico protease, treonina protease e metaloproteases. Cada classe de proteases tem seu conjunto específico de aminoácidos no local ativo (MURI, 2014).

A produção de proteases é considerada um fator de virulência não estrutural, estando envolvidas na invasão e lesão tecidual. Além disso, algumas bactérias são capazes de produzir proteases que hidrolisam e inativam imunoglobulinas secretórias, por exemplo, IgA (AYALEW et al., 2019).

2.6.3 *Sideróforos*

O ferro é um dos nutrientes essenciais para todos os microrganismos, esse elemento é considerado abundante na natureza, porém não é facilmente disponível no estado preferido (SAHA et al., 2013). Na presença de oxigênio, ele sofre rápida oxidação formando oxi-hidróxido férrico insolúvel, quase indisponível para o aproveitamento bacteriano. As bactérias, principalmente aeróbicas, e os fungos produzem um quelante de ferro em condições limitadoras de ferro conhecidas como sideróforos (HOLDEN; BACHMAN, 2015; AHMED et al., 2014).

A origem da palavra sideróforo é de uma palavra grega (*sideros* = ferro, *foros* = transportador) que significa transportador ou portador de ferro. Sideróforos são compostos orgânicos com baixas massas moleculares, que funcionam como agentes quelantes de metais para capturar o ferro férrico insolúvel de diferentes habitats (SINHA; PARLI, 2020) De maneira geral, eles podem ser classificados em 3 categorias: catecolados, hidroxamatos e a mistura dos dois. Alguns exemplos de sideróforos produzidos por bactérias Gram-negativas incluem os catecolados: enterobactina (*E. coli*), vibriobactina (*Vibrio cholera*), os hidroxamatos: alcaligina (*Alcaligenes denitrificans*) e mistos: pioverdina (*P. aeruginosa*) (SAHA et al., 2016; SCHALK et al., 2020).

2.6.4 Hemolisinas

Hemolisinas são enzimas capazes de causar lesões e morte de diversas células, como eritrócitos, leucócitos, hepatócitos e plaquetas. De acordo com a diferença de estrutura molecular, maneira de ligação celular e mecanismo de formação de poros da membrana, a maioria das hemolisinas bacterianas é classificada como toxinas pertencentes à família das toxinas formadora de poros ou da família de citolisinas dependentes de colesterol (LIN et al., 2018). Muitos patógenos bacterianos podem produzir hemolisinas que desempenham papéis patogênicos importantes durante infecção, causando danos na membrana, lise ou ruptura celular e alterações patológicas associadas a desequilíbrios de íons (MURRAY et al., 2020).

Os cocos Gram-positivos se destacam na produção de hemolisinas, sendo classificados quanto ao padrão de hemólise em ágar sangue de carneiro (5%). Os padrões de hemólise são divididos de acordo com o lise de hemácias no ágar, sendo hemólise parcial podendo ser vista coloração esverdeada (alfa), hemólise completa ao redor das colônias (beta) e sem mudanças no meio ao redor da colônia (gama) (KONEMAN et al, 2018). As hemolisinas ocorrem em bactérias Gram-negativas, por exemplo, hemolisina Hly A em cepas de *E. coli* enteroinvasora e hemolisina Kanagawa em *Vibrio parahaemolyticus* podendo ocasionar distúrbios entéricos hemorrágicos (CAI et al., 2018; RUANO-GALLEGO et al., 2019).

Assim, estudos sistemáticos demonstrando o isolamento de bactérias da microbiota de botos-vermelhos da espécie *Inia geoffrensis* são escassos, tampouco sobre fatores de virulência como formação de biofilmes, produção de proteases, sideróforos e hemolisinas das mesmas.

3 HIPÓTESES

1. As bactérias da ordem Enterobacterales são as mais prevalentes nas mucosas de botos da espécie *I. geoffrensis*;
2. As bactérias Gram-negativas isoladas de botos-vermelhos de vida livre apresentam baixa prevalência de resistência aos antimicrobianos;
3. As bactérias Gram-negativas isoladas de botos-vermelhos de vida livre produzem fatores de virulência.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Caracterizar as bactérias Gram-negativas quanto a espécie, sensibilidade antimicrobiana e produção de fatores de virulência da microbiota de diferentes sítios anatômicos de botos da espécie *I. geoffrensis*.

4.2 Objetivos específicos

1. Identificar as bactérias Gram-negativas da microbiota de diferentes sítios anatômicos de botos da espécie *I. geoffrensis*;
2. Avaliar a sensibilidade antimicrobiana de bactérias Gram-negativas obtidas de diferentes sítios anatômicos de botos da espécie *I. geoffrensis*;
3. Analisar a produção de fatores de virulência: biofilmes, proteases, sideróforos e hemolisinas de bactérias Gram-negativas obtidas de diferentes sítios anatômicos de botos da espécie *I. geoffrensis*.

5 METODOLOGIA

5.1 Aspectos éticos e licenças ambientais

A autorização deste estudo foi concedida pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), licenças nº 35950-1 e nº 60171-1, pelo Centro de Unidades de Conservação do Estado do Amazonas, autorização Nº 08/2015-CEUC / SDS, e pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará, sob o número 12639479-2. As autorizações para o estudo Rio Negro foram concedidas ao VMFS pelo ICMBio / SISBio (2014-2018) 13157-1 a 13157-4 e Comitê de Ética no Uso de Animais do INPA (CEUA-INPA 025/2014). A pesquisa foi realizada no laboratório de bacteriologia - Grupo Aplicado em Microbiologia Médica (GrAMM).

5.2 Áreas de estudo e coleta das amostras

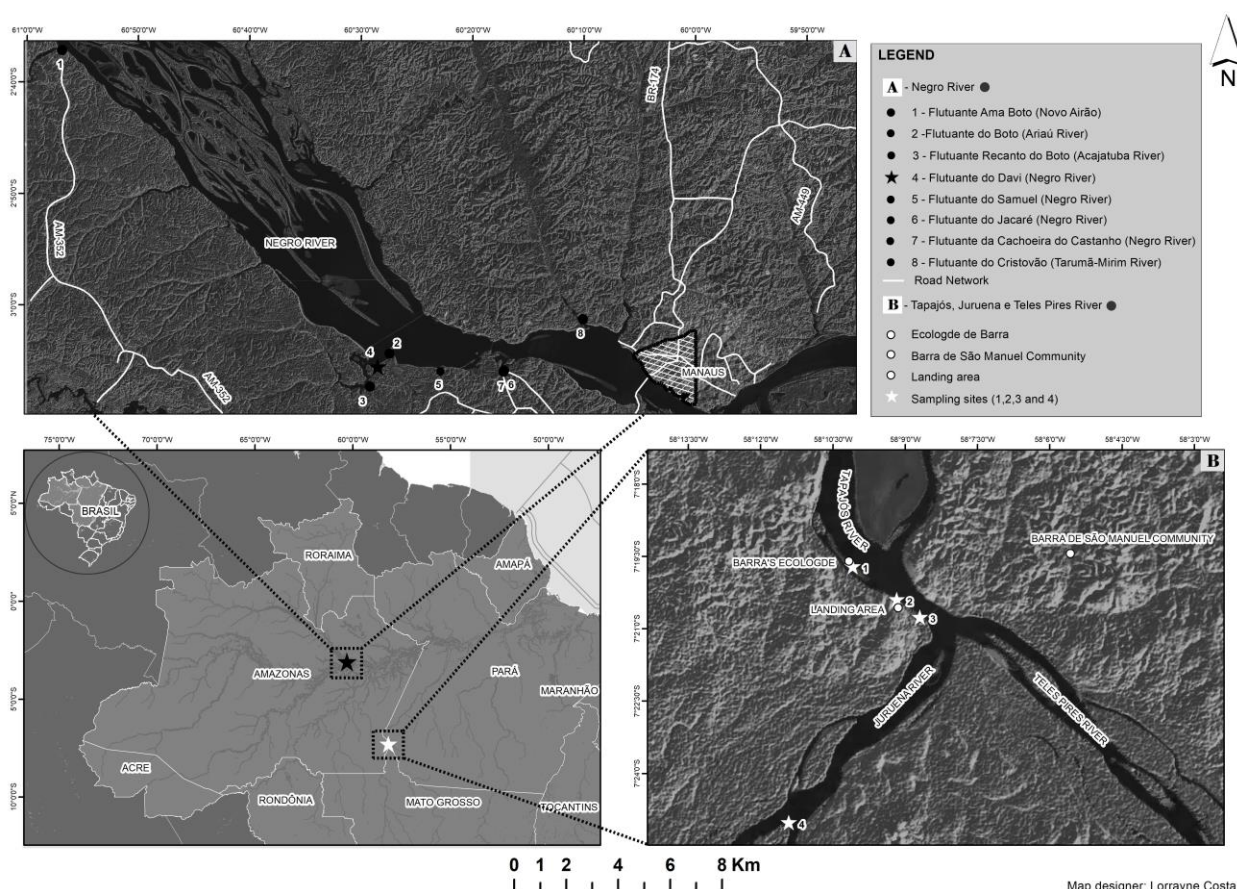
As amostras foram coletadas por meio da inserção de *swabs* estéreis em cada sítio anatômico (cavidade oral, espiráculo, abertura genital e reto) de 21 botos do rio Amazonas. Os *swabs* foram colocados em meio de transporte Stuart até o processamento. Botos de vida

livre de duas populações diferentes foram capturados para fins científicos e imediatamente soltos após a amostragem, de acordo com a metodologia proposta por da Silva e Martin (2000).

Entre os 21 botos, 13 machos foram capturados para estudos de genética e ecologia populacional, em fevereiro de 2015, em área localizada na Área de Proteção Ambiental da Margem Direita do Rio Negro, município de Iranduba / AM (coordenadas -3.245327, -60.099681), pelas equipes da Associação Amigos do Peixe-boi (AMPA) e do Laboratório de Mamíferos Aquáticos do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (LMA / INPA). Os outros oito animais, seis machos e duas fêmeas, foram capturados para fixação de etiquetas de satélite para estudos ecológicos, em outubro de 2017, no Parque Nacional do Juruena, na bacia do Rio Tapajós (coordenadas -7.416914, -58.190239), na divisa dos estados do Mato Grosso, Pará e Amazonas. A Figura 4 mostra a localização geográfica dos locais de coleta.

Os animais capturados foram sexados, medidos e avaliados quanto ao seu estado geral de saúde, observando a condição da pele e a presença de lesões externas e determinando sua pontuação corporal, com base na circunferência corporal, cobertura de gordura, condição muscular e presença de protuberâncias ósseas nas costelas e região escapular e / ou depressão pós-nucal (CASTRILLON; NASH, 2020).

Figura 04 – Localização geográfica dos locais de coleta de amostras de botos-vermelhos. **A** - Existem oito plataformas flutuantes onde os botos do rio Amazonas são abastecidos no baixo Rio Negro (estrela e círculos, imagem superior esquerda). A amostragem foi coletada em 2015, no flutuante Davi (estrela, imagem superior esquerda). **B** - No Rio Tapajós, as plataformas flutuantes ficavam no Ecologde da Barra, que incluía quatro locais de captura (estrela, imagem inferior direita), que incluía quatro locais de captura (estrela, imagem inferior



5.3 Isolamento e identificação microbiana

As amostras coletadas dos sítios anatômicos foram semeadas em ágar MacConkey, imediatamente após a coleta, durante a expedição. As placas foram incubadas a 35 °C, por 24 h, para recuperação das bactérias Gram-negativas. As placas foram observadas e as colônias com diferentes morfotipos foram transferidas para microtubos de 2 mL contendo meio mínimo semissólido (0,3% de extrato de carne, 1% de peptona, 0,5% de cloreto de sódio e 0,4% de ágar) e incubadas a 35 °C, por 24 h. Em seguida, os microtubos foram armazenados em refrigeradores à temperatura ambiente e encaminhados ao Laboratório de Bacteriologia do Grupo de Microbiologia Médica Aplicada (GrAMM) da Universidade Federal do Ceará (UFC).

No Laboratório de Bacteriologia GrAMM, os microrganismos contidos nos microtubos foram semeados em ágar MacConkey para o reisolamento. Em seguida, as colônias puras foram submetidas a testes de triagem: teste de oxidação / fermentação de glicose e produção de citocromo oxidase. Na suspeita de bactérias da ordem Enterobacterales (positivo para fermentação e oxidação de glicose e negativo para produção de citocromo oxidase), foi realizada uma bateria de testes bioquímicos para identificação: *Triple Sugar Iron*

(TSI), Voges-Proskauer (VP), Sulfato / Indol / Motilidade (SIM), citrato de Simmons, fenilalanina desaminase, produção de urease e descarboxilação de lisina e ornitina. Isolados com identificação manual inconclusiva foram avaliados pelo sistema automatizado MicroScanWalkAway®. Em relação aos isolados não fermentadores e / ou produtores de oxidase, a identificação foi realizada pelo sistema automatizado MicroScanWalkAway®. Quando a identificação bioquímica não foi alcançada, os isolados foram identificados por MALDI-TOF MS Autoflex III (Bruker Daltonics, Billerica, EUA).

5.4 Teste de sensibilidade antimicrobiana

A sensibilidade antimicrobiana dos isolados foi avaliada por ensaios de difusão em disco (KIRBY-BAUER, 1996), de acordo com a metodologia recomendada pelo documento M100 do Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2018). O protocolo incluiu inóculo bacteriano padronizado a 0,5 na escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC / mL) e semeadura em ágar Mueller-Hinton. Em seguida, os discos antimicrobianos foram colocados na superfície do ágar e as placas incubadas a 37 °C por 16-18 horas para Enterobacterales e *Pseudomonas* e por 20-24 horas para os gêneros *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas* e *Aeromonas*.

Os antimicrobianos foram escolhidos de acordo com as recomendações do CLSI para microrganismos Gram-negativos. Para isolados da ordem Enterobacterales, foram usados os seguintes antimicrobianos: piperacilina / tazobactam (100/10 µg), amoxicilina / clavulanato (20/10 µg), cefalotina (30 µg), cefuroxima (30 µg), ceftriaxona (30 µg), cefepime (30 µg), meropenem (10 µg), gentamicina (10 µg), amicacina (30 µg), tetraciclina (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), trimetoprim / sulfametoxazol (1,25 / 23,75 µg) e cloranfenicol (30 µg). Para os isolados do gênero *Pseudomonas*, os antimicrobianos piperacilina / tazobactam (100/10 µg), ceftazidima (30 µg), cefepime (30 µg), meropenem (10 µg), gentamicina (10 µg), amicacina (30 µg), ciprofloxacina (5 µg) µg e levofloxacina (5 µg), enquanto para a espécie de *Stenotrophomonas maltophilia* foram testados apenas trimetoprim / sulfametoxazol (1,25 / 23,75 µg) e levofloxacina (5 µg). Para as espécies de *Acinetobacter* e *Aeromonas*, piperacilina / tazobactam (100/10 µg), cefuroxima (30 µg), ceftriaxona (30 µg), cefepime (30 µg), ceftazidima (30 µg), meropenem (10 µg), gentamicina (10 µg), amicacina (30 µg), tetraciclina (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), trimetoprim / sulfametoxazol (1,25 / 23,75 µg).

Após o período de incubação, as zonas de inibição foram medidas e as cepas foram classificadas como suscetíveis (S), intermediárias (I) ou resistentes (R), de acordo com o CLSI (2018). Espera-se que os isolados classificados como intermediário (I) tenham taxas de

resposta mais baixas a determinados agentes antimicrobianos, sugerindo sensibilidade reduzida (CLSI, 2020). Como controle de qualidade dos discos antimicrobianos, foi incluída a cepa de referência *Escherichia coli* ATCC 25922, cujos resultados foram interpretados de acordo com o CLSI (2018).

A susceptibilidade aos antimicrobianos foi analisada com base em nove categorias: 1) beta-lactâmicos, 2) penicilina e inibidores de beta-lactamase, 3) cefalosporinas de 1^a e 2^a geração, 4) cefalosporinas de 3^a geração, 5) cefalosporinas de 3^a e 4^a gerações, 6) 4^a cefalosporinas geração e carbapenêmicos, 7) cefalosporinas de 3^a e 4^a geração e carbapenêmicos, 8) aminoglicosídeos e 9) fluorquinolonas.

5.5 Produção de fatores de virulência

5.5.1 Formação de Biofilmes

Para avaliar a capacidade de formação de biofilmes pelas cepas bacterianas (n=132), inicialmente, as culturas foram crescidas em placas de BHI ágar, incubadas a 37 °C, por 24 horas. Posteriormente, placas de poliestireno com 96 poços de fundo chato foram preenchidas com 175 µL de BHI caldo enriquecido com 1% de glicose. Em seguida, foram adicionados aos poços das placas 25 µL do inóculo bacteriano feito a partir de colônias crescidas por 24 horas, em ágar BHI, em solução salina estéril, na escala de 0,5 de McFarland. As placas foram, então, incubadas a 37 °C, por 48 horas, para o desenvolvimento de biofilme, e a biomassa foi quantificada pela técnica de coloração com cristal violeta (BANDEIRA et al. 2013). A retenção do cristal violeta pelo biofilme aderido aos poços foi mensurada por espectrofotometria, através de um espectrofotômetro leitor de microplacas por absorvância ELx800® (BioteK, EUA) em um comprimento de onda definido de 490 nm (OD490). Poços livres de inóculo bacterianos foram inclusos, como controle de esterilidade e as cepas de referência *E. coli* ATCC® 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853 foram incluídas como controle para a formação de biofilmes. Os testes foram realizados em quadruplicada, em dois momentos distintos.

Foram consideradas formadoras de biofilmes as bactérias cujos resultados de OD490 foram maiores que o ponto de corte de densidade óptica (ODc), definido como a média de OD490 dos poços controle de esterilidade, acrescida de três desvios padrão da média. Assim, as bactérias testadas foram classificadas como não-formadoras ($OD490 \leq ODc$), fracas

($ODc < OD490 \leq 2 \times ODc$), moderadas ($2 \times ODc < OD490 \leq 4 \times ODc$) e fortes ($OD490 > 4 \times ODc$) produtoras de biofilme (STEPANOVIĆ et al., 2000).

5.5.2 Fatores de virulência na forma planctônica e em biofilme

Nessa etapa, foi quantificada a produção de proteases, sideróforos e hemolisinas pelas bactérias (n=132) nas formas planctônicas e em biofilme. Para o crescimento na forma planctônica, tubos de vidro foram preenchidos com 875 µL de BHI caldo enriquecido com 1% de glicose e 125 µL do mesmo inóculo bacteriano utilizado para formação de biofilmes, mantendo-se, assim, a proporção meio de cultura:inóculo (7:1), utilizada para a formação de biofilmes. Para a formação dos biofilmes, foi utilizada a metodologia descrita na seção anterior. As bactérias, tanto na forma planctônica e de biofilme, foram incubadas a 37 °C, por 48 horas. Assim, os sobrenadantes do crescimento nos tubos e em placas de 96 poços (quatro poços por cepa) contendo os biofilmes foram transferidos para microtubos e centrifugados a 10.000 G, por 10 minutos, para a separação do sobrenadante.

5.5.2.1 Proteases

Para avaliação da atividade proteolítica, a azoalbumina foi utilizada como substrato. Sobrenadantes (200 µL) de culturas planctônicas e de biofilmes foram incubados com um volume igual de solução de azoalbumina a 0,3%, a 37 °C, por 3 h. A reação enzimática foi parada com a adição de ácido tricloroacético a 5%, seguida de agitação e centrifugação a 10.000 G, por 10 min. Em placas de fundo chato, foram misturados 100 µL de NaOH 0,5 M com o mesmo volume do sobrenadante (WONGTRAKOONGATE et al., 2012). Em seguida, a leitura foi realizada a 405 nm (A405) utilizando o mesmo espectrofotômetro. Os sobrenadantes dos controles de esterilidade (planctônicos e biofilme) foram utilizados como controle negativo. A atividade proteolítica foi determinada através do cálculo modificado do modelo para fosfolipase (SIDRIM et al. 2010; BRILHANTE et al. 2011). Quando $A405nm \leq \text{controle negativo (NC)} + \text{desvio padrão (SD)}$, os isolados foram negativos para a produção de proteases, entre $NC + SD < A405nm \leq 1,56 \times (NC + SD)$ os isolados foram positivos e $A405nm > 1,56 \times (NC + SD)$, os isolados foram fortemente positivos para a atividade proteolítica. Os ensaios foram realizados em triplicata, em dois momentos diferentes.

5.5.2.2 Sideróforos

Para a quantificação de sideróforos na forma planctônica e em biofilme foi utilizada a solução CAS (hexadecil trimetil amônio 0,6 mM, FeCl₃·6H₂O 0,015 mM, Chrome Azural S 0,15 mM, piperazina anidra 50 mM e HCl 0,75 M) (SCHWYN; NEILANDS, 1987). Assim, 100 µL do sobrenadante do crescimento planctônicas e de biofilmes foram incubados com um volume igual de solução de CAS a 28 °C, por 15 minutos, na ausência de luz. Em seguida, a solução foi avaliada por espectrofotometria a 630 nm (A₆₃₀). Os sobrenadantes dos controles de esterilidade (planctônicos e biofilmes) foram utilizados como controle negativo. Assim, a produção de sideróforos dos isolados foram considerados negativos quando $A_{630nm} \leq \text{controle negativo (NC)} + \text{desvio padrão (SD)}$. Quando $\text{NC} + \text{SD} < A_{630nm} \leq 2 \times (\text{NC} + \text{SD})$ foram positivos e $A_{630nm} > 2 \times (\text{NC} + \text{SD})$ forte positivos. Os ensaios foram realizados em triplicata, em dois momentos diferentes.

5.5.2.3 Hemolisinas

Para determinação da atividade hemolítica na forma planctônica e em biofilme foram realizados ensaios com sangue de carneiro fresco desfibrinado. Sobrenadantes (100 µL) de culturas planctônicas e de biofilmes foram misturados com uma solução contendo 25 µL de sangue e 875 µL de PBS (solução sangue) e incubados em banho-maria a 37° C por 30 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 5.000 G, a 4 °C, por 1 minuto. O sobrenadante (200 µL) foi retirado e medido por espectrofotometria a 450 nm (A₄₅₀). Os sobrenadantes dos controles de esterilidade (planctônicos e biofilmes) foram incubados com a solução sangue e utilizados como controle negativo. A solução de Triton X-100 2% foi incubada com a solução sangue e utilizada como controle positivo, definida como 100% de hemólise (TANG et al., 2019). Os ensaios foram realizados em quadruplicata em dois momentos diferentes. A atividade hemolítica foi expressa como uma porcentagem de hemólise, que foi calculada usando a seguinte equação: $\text{hemólise (\%)} = [(A_{450nm} \text{ cepa teste} - A_{450nm} \text{ controle negativo}) / (A_{450nm} \text{ controle positivo} - A_{450nm} \text{ solução sangue})] \times 100$ (PHANSRI et al., 2011). Foram considerados negativos os isolados que apresentaram porcentagem de atividade hemolítica menor ou igual a zero.

5.6 Análises Estatísticas

O teste do qui-quadrado e o teste exato de Fisher foram usados para analisar a distribuição de frequência das espécies bacterianas recuperadas entre os indivíduos pertencentes às duas populações testadas. Além disso, os isolados foram categorizados como

sensíveis ou não sensíveis, o que incluiu os isolados que apresentaram resistência intermediária ou resistência a pelo menos um dos antimicrobianos testados. A frequência de resultados sensíveis e não sensíveis foi analisada entre espécies bacterianas e entre bactérias recuperadas de indivíduos pertencentes às duas populações, incluindo apenas grupos de dados (espécie, gênero ou ordem) com tamanho de amostra superior a 3 ($n > 3$). Além disso, os antimicrobianos foram analisados como categorias de classes de antimicrobianos, conforme descrito na seção Materiais e Métodos. Essas categorias foram utilizadas para comparar os perfis de sensibilidade aos antimicrobianos de isolados recuperados de indivíduos do Rio Negro e do Rio Tapajós. Para a análise da capacidade das cepas de formar biofilme, assim como dos fatores de virulência foi inicialmente calculada a média aritmética dos dados em duplicata. Nos grupos de dados que apresentaram simetria e variâncias semelhantes foi utilizado o teste de t de Student (dois grupos de dados). Quando os dados se apresentaram afastados da distribuição gaussiana foi utilizado o tratamento não paramétrico dos dados, sendo utilizado o Teste de Wilcoxon (2 grupos de dados pareados), o Teste de Mann-Whitney (2 grupos de dados não pareados), ou o Teste de Kruskal-Wallis seguido do teste post hoc de Dunn (3 ou mais grupos de dados não pareados). O software utilizado para a análise estatística foi o GraphPad Prism 7.0 e as hipóteses foram testadas com nível de significância de 5%.

6 RESULTADOS

6.1 Animais capturados

Os botos do Rio Negro eram todos machos, seis jovens e sete adultos, apresentavam boa pontuação corporal e eram aparentemente saudáveis. Dois animais apresentavam lesões cutâneas superficiais, provavelmente por interações intraespecíficas agressivas e um apresentava fratura consolidada na mandíbula. Esses indivíduos participam da interação turística com humanos e recebem regularmente peixes inteiros e / ou fatiados das mãos de um treinador.

Os animais do Rio Tapajós incluíam duas fêmeas, uma adulta e uma juvenil, e 6 machos, cinco adultos e um juvenil, todos com bom escore corporal e aparentemente saudáveis.

6.2 Isolados bacterianos

Em relação à recuperação bacteriana dos 13 indivíduos da população do Rio Negro, 8/13 animais apresentaram crescimento bacteriano em amostras da cavidade oral, dos quais 1/13 apresentou colonização mista (2 espécies); 8/13 animais apresentaram crescimento bacteriano em amostras de espiráculo, dos quais 4/13 demonstraram colonização mista (2 a 5 espécies); 10/13 animais apresentaram crescimento bacteriano nas amostras da cavidade genital, dos quais 4/13 apresentaram colonização mista (2 ou 3 isolados), e 9/13 animais apresentaram crescimento bacteriano nas amostras do reto, dos quais 5 tiveram colonização mista (3 ou 4 espécies).

Quanto aos indivíduos da população do Rio Tapajós, isolados bacterianos foram recuperados dos quatro sítios anatômicos dos oito animais testados (8/8 positividade para recuperação bacteriana), dos quais 3/8 apresentaram colonização mista (2 ou 3 espécies) em amostras da cavidade oral; 4/8 tiveram colonização mista (2 ou 3 espécies) em amostras de espiráculo; 5/8 tiveram colonização mista (2 a 3 espécies) em amostras da cavidade genital, e 6/8 tiveram colonização mista (2 ou 3 espécies) em amostras do reto. É importante ressaltar que isolados pertencentes à mesma espécie recuperados do mesmo animal, mas de sítios anatômicos diferentes, foram contabilizados como isolados bacterianos diferentes. No entanto, isolados da mesma espécie recuperados do mesmo animal, do mesmo sítio anatômico e com o mesmo perfil de suscetibilidade foram contabilizados como um único isolado.

Um total de 132 isolados Gram-negativos foram recuperados de 21 boto-vermelhos. Destas, 71 cepas foram isoladas de 13 indivíduos do Rio Negro e 61 cepas de 8 botos capturados no Rio Tapajós. Colonização mista foi observada em 44% (37/84) dos locais analisados. No geral, 23/132 isolados (17,4%) foram obtidos da cavidade oral, 35/132 (26,5%) do espiráculo, 33/132 (25%) da abertura genital e 41/132 (31,1%) do reto, sem diferenças significativas na recuperação bacteriana na comparação dos sítios anatômicos.

Os 132 isolados foram distribuídos em 21 gêneros e 28 espécies bacterianas (Tabela 1). Bactérias da ordem Enterobacterales foram as mais frequentemente isoladas neste estudo, sendo os gêneros *Enterobacter*, *Morganella* e *Klebsiella* os mais prevalentes. Em relação às duas populações, *Klebsiella pneumoniae* ($P < 0,01$), *Escherichia coli* e *Pantoea agglomerans* ($P < 0,05$) foram mais prevalentes em botos pertencentes à população do Rio Negro, enquanto *Morganella morganii* ($P < 0,01$) e *Pseudomonas aeruginosa* ($P < 0,05$) foram mais prevalentes em botos da população do Rio Tapajós. Além disso, bacilos Gram-negativos não fermentadores de glicose foram significativamente mais prevalentes ($P < 0,05$) em animais da

população de Tapajós, enquanto isolados da ordem Enterobacterales foram igualmente prevalentes em ambas as populações.

6.3 Teste de sensibilidade antimicrobiana

Dez isolados, classificados como microrganismos ambientais, das espécies *Alcaligenes faecalis*, *Myroides* spp., *Rhizobium radiobacter*, *Wautersiella falsenii*, *Cupriavidus pauculus*, *Chromobacterium violaceum* e *Ochrobactrum anthropi* não foram avaliados quanto à susceptibilidade, devido à ausência de pontos de corte interpretativos. Assim, um total de 122 isolados foi avaliado.

Entre os 21 botos amostrados neste estudo, 14 (66,6%) tinham pelo menos um isolado bacteriano resistente a no mínimo um agente antimicrobiano, e oito (38,1%) abrigavam isolados resistentes a dois antimicrobianos. A abertura genital foi o sítio anatômico de onde foi recuperado o maior número de isolados resistentes ($P < 0,01$). Dos 122 isolados (69 do Rio Negro e 53 do Rio Tapajós), 59 (48,4%) foram classificados como sensível a todos os antimicrobianos testados, enquanto 63 (51,6%) foram classificados como não-susceptíveis (resistência intermediária e resistência) a pelo menos um antimicrobiano, dos quais 35 (28,7%) apresentaram resistência intermediária a pelo menos um agente e 28 (22,9%) apresentaram resistência a pelo menos um agente. Dos isolados intermediários, 26/35 (74,3%) apresentaram resistência intermediária a um antimicrobiano, enquanto 9/35 (25,7%) apresentaram resistência intermediária a dois ou mais agentes. Dos isolados resistentes, 18/28 (64,3%) foram resistentes a apenas um antimicrobiano e 10/28 (35,7%) foram resistentes a dois antimicrobianos, todos pertencentes à ordem Enterobacterales (Tabela 2). Considerando os isolados de animais de ambas as populações, as espécies *E. coli* e *P. agglomerans* apresentaram maior frequência de resistência aos antimicrobianos testados do que as demais espécies ($P < 0,05$). A cefalotina foi a droga a que se observaram resultados mais resistentes e intermediários ($P < 0,0001$).

Dos isolados bacterianos de animais da população do Rio Negro, 35/69 (50,7%) foram classificados como susceptíveis a todos os antimicrobianos, enquanto 34/69 foram classificados como não-susceptíveis, ou seja, 19/69 (27,6%) apresentaram resistência intermediária a pelo menos um agente e 15/69 (21,7%) eram resistentes a pelo menos um antimicrobiano (Tabela 3), dos quais 11/15 eram resistentes a um e 4/15 eram resistentes a dois agentes. Entre as espécies recuperadas de animais do Rio Negro, *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. agglomerans* apresentaram maior resistência que as demais espécies ($P < 0,0001$). Em

relação aos isolados de animais da população do Rio Tapajós, 24/53 (45,3%) foram susceptíveis a todos os antimicrobianos, enquanto 29/53 (54,7%) foram não-susceptíveis, ou seja, 16/53 (30,2%) apresentaram resistência intermediária a pelo menos um antimicrobiano e 13/53 (24,5%) eram resistentes a pelo menos um agente (Tabela 4), dos quais 7/13 eram resistentes a um e 6/13 eram resistentes a dois antimicrobianos. Entre as espécies recuperadas de animais do Rio Tapajós, *E. cloacae* e *M. morgani* apresentaram maior frequência de resistência aos antimicrobianos testados do que as demais espécies ($P < 0,05$).

Por fim, os isolados bacterianos de animais da população do Rio Tapajós foram menos susceptíveis do que os do Rio Negro às seguintes categorias de antimicrobianos: beta-lactâmicos ($P < 0,0001$), penicilina + inibidores de beta-lactamase ($P < 0,05$), 1ª e 2ª cefalosporinas de geração ($P < 0,01$), cefalosporinas de 3ª e 4ª geração ($P < 0,0001$), cefalosporinas de 4ª geração e carbapenêmicos ($P < 0,001$), cefalosporinas de 3ª e 4ª geração e carbapenêmicos ($P < 0,001$) e aminoglicosídeos ($P < 0,05$).

6.4 Fatores de virulência

6.4.1 Biofilmes

Das 132 bactérias Gram-negativas, 56,8 % (75/132) foram classificadas como não-formadoras de biofilmes, enquanto 16,7 % (22/132) foram classificadas como fracas formadoras, 11,4 % (15/132) como moderadas formadoras e 15,1 % (20/132) como forte formadoras, totalizando em 57 (43,2 %) as cepas formadoras de biofilmes. As espécies de bactérias que apresentaram as maiores porcentagens de isolados produtores de biofilme foram *Pseudomonas* spp., *Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp. (Tabela 5). Entretanto, diferenças significativas foram observadas para os gêneros *Pseudomonas* e *Stenotrophomonas*, que apresentaram maior formação de biofilmes entre os isolados do Rio Tapajós e os gêneros *Enterobacter* e *Klebsiella* entre os isolados do Rio Negro ($P < 0,05$). Entre as duas populações, foi observada uma maior prevalência de cepas formadoras de biofilmes nos isolados de animais do Rio Negro (53,5%), quando comparados aqueles isolados dos animais do Rio Tapajós (31,1%). Nesse estudo, não foi observada relação entre a formação de biofilmes e a resistência antimicrobiana, mas observaram-se maiores valores de absorvância no grupo de bactérias sensíveis às drogas testadas ($P < 0,005$).

6.4.2 Proteases, sideróforos e hemolisinas

Dentre as cepas analisadas para a atividade proteolítica na forma planctônica, 66,7 % (88/132) foram negativas ($A_{405nm} \leq NC+SD$), 28 % (37/132) foram positivos ($NC+SD < A_{405nm} \leq 1,56x(NC+SD)$) e 5,3 % (7/132) foram fortes positivos ($A_{405nm} > 1,56x(NC+SD)$). Em biofilme, foi observado que 50 % (66/132) foram negativos, 43,2 % (57/132) foram positivos, e 6,8 % (9/132) foram forte positivos. As espécies bacterianas que apresentaram maior atividade proteolítica foram *Pseudomonas* spp. e *Stenotrophomonas* spp. Entre os isolados das duas populações foi observado de maneira geral uma produção maior de proteases pelas bactérias em biofilme do que na forma planctônica ($P < 0,05$).

Dentre os isolados avaliados para a produção de sideróforos, na forma planctônica, 59,1 % (78/132) foram negativos ($A_{630nm} \leq NC+SD$), 40,9 % (54/132) foram positivos ($NC+SD < A_{630nm} \leq 2x(NC+SD)$), nenhuma cepa foi forte positivo ($A_{630nm} > 2x(NC+SD)$). Em relação à produção de sideróforos por biofilmes, foi observado que 39,4 % (52/132) foram negativos, 56,1 % (74/132) foram positivos e 4,5 % (6/132) foram fortes positivos. As espécies bacterianas fortes produtoras de sideróforos foram *Enterobacter cloacae*, *Morganella morganii* e *E. coli*, assim como *Cupriavidus pauculus* e *Myroides* spp.. Todas as fortes produtoras estavam em biofilme ($n=6$) e cinco delas (5/6) foram isoladas de animais do Rio Tapajós. Dentre os isolados foi observada maior produção de sideróforos em biofilme quando comparada na forma planctônica ($P < 0,0001$).

Na avaliação da produção de hemolisinas na forma planctônica, 50,75 % (67/132) foram considerados negativos ($A_{450nm} \leq NC+SD$), 40,15% (53/132) foram ≤ 10 % de hemólise, 9,1 % (12/132) e > 10 % de atividade hemolítica. Em biofilme, foi observado que 33,3% (44/132) foram negativos, 56,1 % (74/132) apresentaram ≤ 10 % de hemólise e 10,6 % (14/132) > 10 % de atividade hemolítica. As espécies bacterianas que apresentaram taxas > 20 % de atividade hemolítica foram *Pseudomonas aeruginosa*, *Morganella morganii* e *Proteus mirabilis*. Apenas nos isolados da população Tapajós foram observadas diferenças estatísticas com maior produção de hemolisinas por biofilmes do que na forma planctônica ($P < 0,01$). A descrição dos fatores de virulência nas formas planctônica e de biofilme dos micro-organismos das duas populações avaliadas está representada na Tabela 06.

Quando comparada os a produção de fatores de virulência pelos isolados das duas populações foi observado que as bactérias da população Tapajós produziram mais proteases do que as da população do Rio Negro ($P < 0,05$). Além disso, quando comparados os micro-organismos da ordem Enterobacteriales, nas duas populações, foi verificado uma maior

produção de sideróforos, tanto na forma planctônica como de biofilmes, pelos dos isolados da população do Rio Tapajós ($P < 0,05$).

Tabela 1. Isolados bacterianos de diferentes sítios anatômicos de duas populações de botos-vermelhos (*I. geoffrensis*) de vida livre.

Grupos Bacterianos	Sítios Anatômicos										TG
	O	E	G	R	T	O	E	G	R	T	
	População Rio Negro					População Rio Tapajós					
Ordem Enterobacterales											
<i>Enterobacter cloacae</i>	3	5	1	5	14	5	3	4	1	13	27
<i>Enterobacter amnigenus</i>	-	-	-	-	0	-	-	1	-	1	1
<i>Morganella morganii</i>	-	1	1	4	6	2	6	3	6	17	23
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	4	6	4	16	1	-	1	1	3	19
<i>Klebsiella aerogenes</i>	1	-	-	3	4	1	-	-	-	1	5
<i>Escherichia coli</i>	-	2	1	4	7	-	-	-	-	0	7
<i>Pantoea agglomerans</i>	-	3	3	1	7	-	-	-	-	0	7
<i>Pantoea</i> spp.	-	-	1	-	1	-	-	-	-	0	1
<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-	-	0	-	-	-	2	2	2
<i>Proteus vulgaris</i>	1	1	-	1	3	-	-	-	-	0	3
<i>Citrobacter braakii</i>	-	-	-	-	0	-	1	-	-	1	1
<i>Citrobacter freundii</i>	-	-	-	-	0	-	-	-	1	1	1
<i>Providencia stuartii</i>	-	-	-	-	0	1	-	-	-	1	1
<i>Providencia rettgeri</i>	-	1	-	-	1	-	-	-	-	0	1
<i>Serratia marcescens</i>	-	1	-	-	1	-	-	1	-	1	2
<i>Edwardsiella tarda</i>	1	-	-	1	2	-	-	-	-	0	2
Total	8	18	13	23	62	10	10	10	11	41	103
BGN Não-fermentadores											
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	1	-	-	1	1	1	1	3	6	7
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	-	1	-	1	-	-	1	-	1	2
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-	-	-	1	1	-	2	3	-	5	6
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	-	3	-	3	-	-	-	-	0	3
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	-	-	-	-	0	1	1	1	-	3	3
Total	0	1	4	1	6	2	4	6	3	15	21
Outras											
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	-	-	1	1	-	-	-	-	0	1
<i>Alcaligenes faecalis</i>	-	1	-	-	1	-	-	-	-	0	1
<i>Myroides</i> spp.	-	-	-	-	0	-	1	-	1	2	2
<i>Rhizobium radiobacter</i>	-	-	-	-	0	1	-	-	-	1	1
<i>Wautersiella falsenii</i>	-	-	-	-	0	-	-	-	1	1	1
<i>Cupriavidus pauculus</i>	-	-	-	-	0	1	-	-	-	1	1
<i>Chromobacterium violaceum</i>	1	-	-	-	1	-	-	-	-	0	1
Total	1	1	0	1	3	2	1	0	2	5	8

O sítio oral; E espiráculo; G abertura genital; R reto; T total de isolados; TG total geral de isolados bacterianos. BGN Bacilos Gram-negativos

Tabela 2. Número de isolados bacterianos resistentes recuperados de sítios anatômicos de 21 botos do rio Amazonas.

Número de isolados resistentes	Botos por população		Total
	Rio Negro	Rio Tapajós	
Sem isolados resistentes	6	1	7
Pelo menos um isolado resistente	3	3	6
Pelo menos dois isolados resistentes	4	4	8
Total	13	8	21

Tabela 3. Resultados intermediários e resistentes dos isolados bacterianos recuperados de botos do rio Amazonas (*Inia geoffrensis*) da população do Rio Negro.

População Rio Negro																												
Grupo bacteriano	N	Agentes Antimicrobianos																										
		PPT		AMC		CFL		CRX		CRO		CPM		MER		GEN		AMI		TET		CIP		SUT		CLO		
Enterobacterales	62	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	
<i>Enterobacter cloacae</i>	14	0	0	IR	IR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Morganella morganii</i>	6	0	0	IR	IR	IR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	16	0	0	0	1	0	10	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	
<i>Klebsiella aerogenes</i>	4	0	0	IR	IR	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Escherichia coli</i>	7	0	0	0	0	1	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Pantoea agglomerans</i>	7	0	0	2	0	7	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
<i>Pantoea spp.</i>	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Proteus vulgaris</i>	3	0	0	0	0	IR	IR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	IR	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Providencia rettgeri</i>	1	0	0	IR	IR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	IR	0	0	0	0	0	1		
<i>Serratia marcescens</i>	1	0	0	IR	IR	IR	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0		
<i>Edwardsiella tarda</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
BGN Não-fermentadores	N	PPT		CRX		CAZ		CRO		CPM		MER		GEN		AMI		TET		CIP		LEV		SUT				
	6	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	0	0	IR	0	0	IR	0	0	0	0	0	0	0	0	IR	0	0	0	0	0	0	0	0	IR			
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1	0	0	IR	0	0	IR	0	1	0	0	0	0	0	0	IR	0	0	0	0	0	0	0	0	IR			
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1	IR	IR	NT	IR	NT	IR	IR	IR	IR	IR	IR	IR	IR	IR	IR	IR	IR	IR	IR	IR	IR	IR	IR				
<i>Acinetobacter baumannii</i>	3	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NT			
Outras																												
<i>Aeromonas hydrophila</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NT	1	0

N: número de isolados; PPT: piperacilina / tazobactam; AMC: amoxicilina / clavulanato; CFL: cefalotina; CRX: cefuroxima; CRO: ceftriaxona; CPM: cefepime; MER: meropenem; GEN: gentamicina; AMI: amicacina; TET: tetraciclina; CIP: ciprofloxacina; SUT: trimetoprima / sulfametoxazol; CLO: cloranfenicol; CAZ: ceftazidima; LEV: levofloxacina; R: resistente; I: intermediário; IR: resistência intrínseca; NT: não testado pois o antimicrobiano não é recomendado para a espécie bacteriana; BGN: bacilos Gram-negativos.

Tabela 4. Resultados intermediários e resistentes dos isolados bacterianos recuperados de botos do rio Amazonas (*Inia geoffrensis*) da população do Rio Tapajós.

População Rio Tapajós																											
Grupo Bacteriano	N	Agentes Antimicrobianos																									
		PPT		AMC		CFL		CRX		CRO		CPM		MER		GEN		AMI		TET		CIP		SUT		CLO	
Enterobacterales	41	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I
<i>Enterobacter cloacae</i>	13	0	1	IR	IR	2	8	1	1	1	3	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0
<i>Enterobacter amnigenus</i>	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Morganella morganii</i>	17	0	3	IR	IR	IR	1	2	0	6	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Klebsiella aerogenes</i>	1	0	0	IR	IR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Proteus mirabilis</i>	2	0	0	2	0	2	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	IR	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Citrobacter braakii</i>	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Citrobacter freundii</i>	1	0	0	IR	IR	IR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Providencia stuartii</i>	1	0	0	IR	IR	0	0	0	0	0	0	0	0	IR	0	0	IR	0	0	0	0	0	0	1	0		
<i>Serratia marcescens</i>	1	0	0	IR	IR	IR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
BGN Não-fermentadores	N	PPT		CRX		CAZ		CRO		CPM		MER		GEN		AMI		TET		CIP		LEV		SUT			
	12	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6	0	0	IR	0	0	IR	0	0	0	1	0	0	0	0	IR	0	0	0	0	0	0	IR				
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1	0	0	IR	0	0	IR	0	0	0	0	0	0	0	0	IR	0	0	0	0	0	0	IR				
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	5	IR		IR	NT		IR	NT		IR		IR		IR		IR		IR		NT		0	0	2	0		

N: número de isolados; PPT: piperacilina / tazobactam; AMC: amoxicilina / clavulanato; CFL: cefalotina; CRX: cefuroxima; CRO: ceftriaxona; CPM: cefepime; MER: meropenem; GEN: gentamicina; AMI: amicacina; TET: tetraciclina; CIP: ciprofloxacina; SUT: trimetoprima / sulfametoxazol; CLO: cloranfenicol; CAZ: ceftazidima; LEV: levofloxacina; R: resistente; I: intermediário; IR: resistência intrínseca; NT: não testado pois o antimicrobiano não é recomendado para a espécie bacteriana; BGN: bacilos Gram-negativos.

Tabela 5. Produção de biofilmes por bactérias Gram-negativas isoladas de botos-vermelhos (*I. geoffrensis*)

Grupos Bacterianos	Produção de Biofilmes							
	N-F	Fr	Mo	Fo	N-F	Fr	Mo	Fo
	População Rio Negro				População Rio Tapajós			
Ordem Enterobacterales								
<i>Enterobacter cloacae</i>	2	8	2	2	12	1	-	-
<i>Enterobacter amnigenus</i>	-	-	-	-	1	-	-	-
<i>Morganella morganii</i>	6	-	-	-	15	1	-	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	2	2	6	2	-	1	-
<i>Klebsiella aerogenes</i>	2	2	-	-	1	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	6	-	1	-	-	-	-	-
<i>Pantoea agglomerans</i>	4	-	1	2	-	-	-	-
<i>Pantoea</i> spp.	1	-	-	-	-	-	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-	-	2	-	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	2	1	-	-	-	-	-	-
<i>Citrobacter braakii</i>	-	-	-	-	1	-	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	-	-	-	1	-	-	-
<i>Providencia stuartii</i>	-	-	-	-	1	-	-	-
<i>Providencia rettgeri</i>	-	1	-	-	-	-	-	-
<i>Serratia marcescens</i>	-	1	-	-	-	1	-	-
<i>Edwardsiella tarda</i>	-	-	1	1	-	-	-	-
Total	29	15	7	11	36	3	1	1
BGN Não-fermentadores								
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	-	-	-	2	1	2	1
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	-	1	-	-	-	-	1
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-	-	-	1	-	-	3	2
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1	-	-	2	-	-	-	-
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	-	-	-	-	2	-	1	-
Total	2	0	1	3	4	1	6	4
Outros								
<i>Aeromonas hydrophila</i>	1	-	-	-	-	-	-	-
<i>Alcaligenes faecalis</i>	1	-	-	-	-	-	-	-
<i>Myroides</i> spp.	-	-	-	-	1	1	-	-
<i>Rhizobium radiobacter</i>	-	-	-	-	1	-	-	-
<i>Wautersiella falsenii</i>	-	-	-	-	-	1	-	-
<i>Cupriavidus pauculus</i>	-	-	-	-	-	1	-	-
<i>Chromobacterium violaceum</i>	-	-	-	1	-	-	-	-
Total	2	0	0	1	2	3	0	0

N-F: não-formador, **Fr:** fraco formador, **Mo:** moderado formador, **Fo:** forte formador de biofilmes, **BGN:** Bacilos Gram-negativos.

Tabela 6. Fatores de virulência: produção de proteases, sideróforos e hemolisinas pelos isolados de *botos-vermelhos* (*I. geoffrensis*)

Espécie Bacteriana	Fatores de virulência																	
	Planctônico									Biofilme								
	Proteases			Sideróforos			Hemolisinas			Proteases			Sideróforos			Hemolisinas		
	-	+	++	-	+	++	-	≤10%	>10%	-	+	++	-	+	++	-	≤10%	>10%
	População Rio Negro																	
<i>Enterobacter</i> spp.	7	7	-	9	5	-	10	4	-	4	10	-	1	13	-	7	7	-
<i>Morganella morganii</i>	5	1	-	5	1	-	2	-	4	4	2	-	3	3	-	1	4	1
<i>Klebsiella</i> spp.	15	5	-	10	10	-	13	6	1	12	8	-	6	14	-	12	7	1
<i>Escherichia coli</i>	6	1	-	4	3	-	5	-	2	4	3	-	2	4	1	-	5	2
<i>Pantoea</i> spp.	2	6	-	7	1	-	2	5	1	5	3	-	6	2	-	4	4	-
<i>Proteus</i> spp.	3	-	-	2	1	-	3	-	-	2	1	-	2	1	-	1	-	2
<i>Providencia</i> spp.	-	1	-	1	-	-	-	-	1	-	1	-	1	-	-	-	1	-
<i>Serratia marcescens</i>	1	-	-	-	1	-	-	1	-	1	-	-	-	1	-	-	-	1
<i>Edwardsiella tarda</i>	2	-	-	1	1	-	1	1	-	2	-	-	-	2	-	1	1	-
<i>Pseudomonas</i> spp.	1	-	1	2	-	-	2	-	-	-	1	1	2	-	-	-	2	-
<i>Stenotrophomonas</i>	-	1	-	1	-	-	-	1	-	-	-	1	-	1	-	-	1	-
<i>Acinetobacter baumannii</i>	3	-	-	3	-	-	1	2	-	2	1	-	3	-	-	-	2	1
<i>Aeromonas hydrophila</i>	1	-	-	-	1	-	1	-	-	1	-	-	-	1	-	1	-	-
<i>Alcaligenes faecalis</i>	1	-	-	-	1	-	1	-	-	1	-	-	1	-	-	1	-	-
<i>Chromobacterium violaceum</i>	-	1	-	1	-	-	1	-	-	-	1	-	1	-	-	1	-	-
Total	47	23	1	46	25	0	42	20	9	38	31	2	28	42	1	29	34	8
	População Rio Tapajós																	
<i>Enterobacter</i> spp.	11	3	-	5	9	-	6	8	-	8	6	-	4	8	2	5	9	-
<i>Morganella morganii</i>	15	1	1	7	10	-	8	8	1	10	6	1	4	12	1	3	12	2
<i>Klebsiella</i> spp.	3	1	-	1	3	-	2	2	-	2	2	-	1	3	-	2	2	-
<i>Proteus</i> spp.	2	-	-	-	2	-	-	1	1	1	1	-	-	2	-	-	1	1
<i>Citrobacter</i> spp.	2	-	-	1	1	-	-	2	-	2	-	-	1	1	-	-	2	-
<i>Providencia</i> spp.	1	-	-	1	-	-	1	-	-	1	-	-	1	-	-	1	-	-
<i>Serratia marcescens</i>	-	1	-	1	-	-	-	-	1	-	1	-	-	1	-	-	1	-
<i>Pseudomonas</i> spp.	-	2	5	7	-	-	2	5	-	-	2	5	6	1	-	1	4	2
<i>Stenotrophomonas</i>	-	5	-	4	1	-	1	4	-	-	4	1	5	-	-	3	2	-
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	3	-	-	1	2	-	3	-	-	2	1	-	-	3	-	-	2	1
<i>Myroides</i> spp.	2	-	-	1	1	-	1	1	-	1	1	-	1	-	1	-	2	-
<i>Cupriavidus pauculus</i>	1	-	-	1	-	-	-	1	-	-	1	-	-	-	1	-	1	-
<i>Rhizobium radiobacter</i>	-	1	-	1	-	-	-	1	-	-	1	-	1	-	-	-	1	-
<i>Wautersiella falsenii</i>	1	-	-	1	-	-	1	-	-	1	-	-	-	1	-	-	1	-
Total	41	14	6	32	29	0	25	33	3	28	26	7	24	32	5	15	40	6

- Negativo, + Positivo, ++ Forte positivo ≤10% de atividade hemolítica, >10% de atividade hemolítica

7 DISCUSSÃO

A presente pesquisa foi pioneira nos estudos sobre a sensibilidade antimicrobiana e fatores de virulência de bactérias de cavidades naturais de botos do rio Amazonas de vida livre. Estudos sobre a saúde dos cetáceos de água doce e informações sobre os aspectos de saúde dos botos do rio Amazonas ainda são escassos (SÁNCHEZ-SARMIENTO et al., 2018; SACRISTÁN et al., 2019). Esta espécie ameaçada de extinção está incluída no Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Mamíferos Aquáticos da Amazônia Ameaçados (PAN Mamíferos Aquáticos da Amazônia) (TAYLOR et al., 2018; ICMBio, 2019) e mais pesquisas sobre a saúde da população seriam benéficas para a conservação das espécies. Assim, devido à ausência de estudos sobre a susceptibilidade aos antimicrobianos da espécie, os dados obtidos neste estudo foram comparados com dados descritos para outros mamíferos aquáticos de vida livre.

Bactérias Gram-negativas foram relatadas como prevalentes em amostras biológicas de várias espécies de mamíferos marinhos (WALLACE et al., 2013; STEWART et al., 2014; OBUSAN et al., 2018; SCHAEFER et al., 2019). No presente estudo, apenas bactérias Gram-negativas foram isoladas, devido à dificuldade de coleta em campo e ao fato de essas bactérias serem mais comumente associadas ao surgimento de resistência antimicrobiana. Os microrganismos mais frequentemente isolados foram *Enterobacter* spp., *Morganella* spp., *Klebsiella* spp. e *Pseudomonas* spp., comumente encontrados na microbiota intestinal de mamíferos e associados ao meio aquático. Em cetáceos de vida livre, por exemplo, essas bactérias foram relatadas anteriormente no trato gastrointestinal e respiratório de baleias minke encalhadas (*Balaenoptera acutorostrata*), acidentalmente capturadas boto-do-mar (*Phocoena phocoena*) e várias espécies de golfinhos, como o golfinho-nariz-de-garrafa (*Tursiops truncatus*), golfinho-comum de bico curto (*Delphinus delphis*), golfinho-do-atlântico (*Lagenorhynchus acutus*) e golfinho-listrado (*Stenella coeruleoalba*) (BOGOMOLNI et al., 2008; STEWART et al., 2014; SCHAEFER et al., 2019). Além de cetáceos, estudos envolvendo pinípedes, incluindo focas (*Phoca vitulina*) em reabilitação e leões marinhos de vida livre (*Otaria flavescens*), também demonstraram o predomínio de bactérias da ordem Enterobacterales e do gênero *Pseudomonas*, como parte de sua microbiota retal (WALLACE et al., 2013; HERMOSILLA et al., 2018).

K. pneumoniae, *E. coli* e *P. agglomerans* foram mais prevalentes nos botos do Rio Negro, enquanto *M. morgani* e *P. aeruginosa* foram mais prevalentes nos animais da

população do Rio Tapajós. Essas diferenças podem estar associadas às propriedades físico-químicas do ambiente de água doce onde esses golfinhos foram capturados, o que pode influenciar a composição microbiana. O Rio Tapajós, por exemplo, é predominantemente cercado por floresta seca de terras altas, o que pode reduzir o fluxo de água e contaminantes durante o período chuvoso, dando às águas do rio um aspecto límpido e leve acidez (pH 6,03-6,63) (EMBRAPA, 2014; LINO et al. 2019). O Rio Negro, por outro lado, apresenta baixa concentração de sedimentos e nutrientes (VILLAR et al., 2009) e alta acidez (pH 3,9-5,4), devido à decomposição da vegetação da floresta tropical, que libera ácidos húmicos, dando sua cor de um rio de águas negras (VIEIRA et al., 2016). Assim, as análises microbiológicas da água do rio, incluindo a composição do microbioma e os impactos da atividade antrópica no microbioma da água, podem ajudar a resolver esta questão.

Neste estudo, a prevalência de isolados não sensíveis (intermediário e resistente) foi de 51,6% (63/122), dos quais 55,6% (35/63) apresentaram resistência intermediária e 44,4% (28/63) apresentaram resistência a pelo menos um agente antimicrobiano. Dos isolados resistentes, 8,2% (10/122) foram resistentes a dois antimicrobianos, todos pertencentes à ordem Enterobacterales e que apresentaram mais resultados de resistência à cefalotina.

Estudos revelam maior frequência de resistência aos antimicrobianos das classes macrolídeo e beta-lactâmico, sendo também observada no presente estudo menor sensibilidade a estes últimos, evidenciada pelas maiores taxas de resistência observadas para cefalotina, cefuroxima e cefepima. Esses achados corroboram os resultados de Rose et al. (2009), que relatou altas taxas de resistência (> 60%) à ampicilina e cefalotina em mamíferos marinhos (golfinhos, baleias, botos e focas) e outros animais marinhos, e Schaefer et al. (2019), que observaram taxas de resistência para ampicilina, amoxicilina / clavulanato e cefalotina acima de 50% em golfinhos-nariz-de-garrafa.

O ecossistema aquático recebe antibióticos e diversos compostos químicos de diferentes origens, como efluentes urbanos, industriais, agrícolas e da aquicultura (ABDULLAHI e IBRAHIM, 2017). Assim, as bactérias que residem nesses ambientes estão constantemente expostas a antimicrobianos e outros compostos, causando pressão seletiva e levando à resistência bacteriana (HUSSAIN, 2019). Na bacia amazônica, por exemplo, taxas de resistência antimicrobiana acima de 85% têm sido relatadas entre bactérias Gram-negativas recuperadas das águas dos lagos Água Preta e Bolonha, localizados na cidade de Belém, estado do Pará, ambos lagos de água negra, com destaque da ordem Enterobacterales e dos gêneros *Pseudomonas* e *Acinetobacter* (FREITAS et al., 2019; ALVES et al., 2020).

Os animais aquáticos têm uma interação íntima com seu ambiente circundante, portanto, com os microrganismos que ali coexistem (EGERTON et al., 2018). Nesse contexto, a presença de bactérias multirresistentes no ambiente aquático indica sua presença na microbiota de animais aquáticos, demonstrando que o ambiente atua como reservatório de genes de resistência bacteriana (FURNESS et al., 2017). Assim, contaminantes na água, como metais pesados, têm o potencial de induzir alterações fenotípicas e causar superexpressão e persistência de genes de resistência antimicrobiana em microrganismos que colonizam o ambiente ou animais aquáticos (DI CESARE et al., 2016).

No presente estudo, embora não tenham sido observadas diferenças gerais nas taxas de resistência antimicrobiana entre isolados de golfinhos dos rios Negro e Tapajós, isolados de animais da população do Rio Tapajós apresentaram maior frequência de resultados não sensíveis (intermediários e resistentes) ao beta-lactamâmicos e aminoglicosídeos do que os de animais da população do Rio Negro.

Os indivíduos da população do Rio Tapajós analisados neste estudo foram capturados dentro de uma área protegida, distante dos centros urbanos, próximo a uma comunidade indígena e uma pequena aldeia. Porém, atividades antrópicas, como mineração, lavoura e construção de barragens (PAVANATO et al., 2016; LOBO et al., 2017), têm impactado fortemente a bacia do Rio Tapajós, contribuindo para o aumento da erosão do curso do rio e contaminação ambiental com diferentes metais, principalmente mercúrio (OESTREICHER et al., 2017; LINO et al., 2019), que podem ter favorecido pressões seletivas, contribuindo para maiores taxas de resistência antimicrobiana. Por outro lado, considerando que as bactérias coliformes (*K. pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* e *E. coli*) foram as espécies mais prevalentes recuperadas dos botos do Rio Negro, pode-se supor que a área estudada, a aproximadamente 50 Km da cidade de Manaus, está contaminado principalmente com poluentes biológicos, como esgoto urbano, e que os poluentes químicos podem não ser tão relevantes nesta região, diminuindo a pressão seletiva sobre a população bacteriana.

A relação entre aquisição microbiana de resistência a antibióticos e resistência a metais pesados tem sido relacionada a dois mecanismos principais: co-resistência e resistência cruzada. A co-resistência está associada à presença de genes de resistência a antimicrobianos ou metais pesados no mesmo plasmídeo, conferindo resistência a antimicrobianos e metais pesados, mesmo quando apenas um agente de seleção (antibióticos ou metais pesados) está presente. A resistência cruzada, em paralelo, ocorre quando compostos diferentes seguem os mesmos caminhos ou caminhos semelhantes dentro da célula bacteriana, como observado

para a utilização microbiana de bombas de efluxo (NGUYEN et al., 2019). Foi relatada co-resistência entre metais pesados e beta-lactâmicos ou aminoglicosídeos (PAL et al., 2015; NGUYEN et al., 2019; GLIBOTA et al., 2020), o que também pode ter ocorrido em isolados de indivíduos da população do Rio Tapajós.

Atualmente, os dados sobre os impactos de bactérias resistentes na saúde pública nos ecossistemas amazônicos são limitados, principalmente onde os estudos se concentraram principalmente no uso de antibióticos em práticas agrícolas e agrícolas (TOPP et al., 2018). Além disso, os locais de água doce podem ser fontes ambientais de genes de resistência a antibióticos, sendo de interesse de saúde pública pela ocorrência de bactérias resistentes e patógenos zoonóticos, que são abrigados e disseminados por animais que vivem nesses ambientes (KARKMAN et al., 2018; NNADOZIE et al., 2019).

A proximidade com as atividades humanas influencia no surgimento da resistência antimicrobiana em animais silvestres, contribuindo para esse problema mundial na medicina humana e veterinária. O surgimento de bactérias multirresistentes está comumente relacionado ao uso extensivo de antimicrobianos, porém o surgimento desses microrganismos em mamíferos aquáticos de vida livre está principalmente associado a impactos antrópicos no ambiente onde vivem (RADHOUANI et al., 2014). Assim, considerando a importância do meio ambiente para o desenvolvimento da resistência antimicrobiana em bactérias de origem animal e humana, torna-se necessária uma abordagem de Saúde Única para a vigilância e controle do surgimento de bactérias resistentes em humanos, animais, alimentos e meio ambiente (CASTELO-BRANCO et al., 2020).

A ocorrência de bactérias virulentas é multifatorial. Em bactérias Gram-negativas, fatores de virulência têm sido amplamente descritos, incluindo formação de biofilme, endotoxinas, enterotoxinas, adesinas, citotoxinas, hemolisinas, lipases, proteases e sideróforos (ROGES et al., 2020). Assim, o arsenal de fatores de virulência bacterianos é essencial para a sobrevivência microbiana e, quando há um desequilíbrio imunológico no hospedeiro, esses fatores de virulência podem favorecer o processo infeccioso. (SANTESTEVEAN et al., 2015). No presente estudo, as bactérias Gram-negativas foram analisadas quanto à capacidade de formação de biofilme, produção de enzimas hidrolíticas (proteases e hemólise) e sideróforos, tanto no biofilme quanto no estado planctônico.

Biofilmes são comunidades tridimensionais de bactérias aderidas a superfícies bióticas e abióticas rodeadas por uma matriz extracelular polimérica (VENKATESAN et al., 2015). Em superfícies bióticas, os biofilmes desempenham um papel fundamental na adesão

bacteriana, podendo favorecer o processo de colonização e persistência do microrganismo nas membranas mucosas dos animais (BERNE et al., 2018). Além disso, biofilmes bacterianos em processos infecciosos são mais resistentes ao sistema imunológico do hospedeiro e aos antimicrobianos e favorecem a transferência de genes de virulência e resistência por meio de transferência horizontal de genes (transferência de plasmídeo) (BERNIER e SURETTE, 2013; BALCÁZAR et al., 2015) Entre os isolados de botos do rio Amazonas, as espécies *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Stenotrophomonas maltophilia* foram as que apresentaram maior produção de biofilme. Essas espécies bacterianas são comumente relatadas como importantes agentes de infecções associadas ao biofilme, especialmente no ambiente hospitalar (WEINER et al., 2016). Além disso, os biofilmes ambientais desempenham um papel fundamental nos ecossistemas aquáticos na decomposição da matéria orgânica, dinâmica de nutrientes e ciclo biogeoquímico, mas a baixa e constante concentração de contaminantes nesses ambientes pode desencadear diferentes respostas de estresse que podem aumentar a matriz de produção do biofilme como mecanismo de defesa e acelerar a disseminação de genes virulentos em uma ampla gama de espécies bacterianas (BALCÁZAR et al., 2015; NIEDERDORFER et al., 2017).

Quanto à produção de enzimas hidrolíticas, sabe-se que as proteases e hemolisinas desempenham papel fundamental no processo infeccioso bacteriano, promovendo dano tecidual e celular para obtenção de nutrientes (BANSAL et al., 2015; SU et al., 2020). Mais de 10% de todas as bactérias isoladas de cavidades de botos do rio Amazonas apresentaram produção >10% da atividade hemolítica, das quais *Pseudomonas aeruginosa*, *Morganella morganii* e *Proteus mirabilis* demonstraram atividade hemolítica acima de 20%. *In vitro*, a produção de hemólise foi demonstrada em espécies de *Morganella* e *Proteus*, que podem produzir hemolisinas HlyA (BENZ, 2016). Enquanto o relato de caso mostrou associação com broncopneumonia hemorrágica e infecção por *Morganella morganii* em golfinhos-nariz-de-garrafa (ELFADL et al., 2017). Além disso, a quantificação da atividade de proteases extracelulares pelas bactérias isoladas no presente estudo mostrou uma maior produção de protease em biofilme por *Pseudomonas aeruginosa* e *Stenotrophomonas maltophilia*. *Pseudomonas* spp. pode produzir uma variedade de proteases, incluindo elastases, protease alcalina, protease IV, protease A pequena e grande (GALDINO et al, 2017). Em isolados de alimentos marinhos e marinhos de *Pseudomonas* spp.. As metaloproteases alcalinas extracelulares desempenham um papel na deterioração (ZOU et al., 2020). Enquanto, durante uma infecção, *Pseudomonas* e *Stenotrophomonas* secretam proteases responsáveis pela

invasão e destruição dos tecidos do hospedeiro, mantendo a infecção (CHAKRABORTI et al, 2017). Neste contexto, as enzimas hidrolíticas podem quebrar substratos de proteína do hospedeiro chave e modular vários processos biológicos, incluindo, escapar e modular as respostas imunes do hospedeiro.

A invasão tecidual também promove a liberação de ferro, que atua como cofator para a manutenção de microrganismos. Os sideróforos são moléculas quelantes orgânicas sintetizadas por bactérias em condições limitantes de ferro, tendo o papel de sequestrar o ferro das proteínas de ligação ao ferro no organismo hospedeiro, para formar um complexo de Fe (III) (RICHARD et al. 2019). No presente estudo, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* e *Morganella morganii* demonstraram uma maior produção de moléculas de sideróforos no biofilme. Enterobactina é o sideróforo característico produzido por bactérias da ordem Enterobacterales, por exemplo, *E. coli* secreta essas moléculas sequestradoras de ferro para replicação durante a colonização e infecção (FIEDLER et al., 2001). Além disso, os patógenos que são capazes de super produzir sideróforos são considerados hiper virulentos (SAHA et al., 2016). Além disso, estudos têm mostrado que em diferentes ambientes os sistemas de captação de ferro e a concentração intracelular podem ser cruciais na formação e desenvolvimento do biofilme (HARRISON; BUCKLING, 2009). No entanto, uma vez que a produção de sideróforos não se restringe a patógenos, a alta prevalência de bactérias produtoras de sideróforos na microbiota do intestino animal resulta no questionamento se os sideróforos podem influenciar diretamente a função do hospedeiro modulando a homeostase celular do ferro ou se eles podem impactar de diferentes maneiras as interações de bactérias hospedeiras e na dinâmica de comunidades microbianas (LE MOS; BALADO, 2020).

O surgimento de resistência antimicrobiana e cepas hipervirulentas entre bactérias que causam infecções em humanos e animais tem sido relatado em todo o mundo. Esse aumento levou a Organização Mundial da Saúde (OMS) a incluir a resistência antimicrobiana como uma das dez principais ameaças à saúde global (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2019). Como resultado, há uma necessidade de compreender a importância crítica da abordagem de Uma Saúde e implementá-la para controlar o surgimento de resistência antimicrobiana e hipervirulência (WHITE; HUGHES, 2019).

Além disso, é importante destacar que os botos do rio Amazonas amostrados na população do Rio Negro estão acostumados ao contato humano, e, portanto, estão comumente presentes ao redor de casas flutuantes, onde ocorre a interação (ALVES et al., 2013; GRAVENA et al., 2019). Durante as interações, os tratadores alimentam os animais enquanto

um grupo de aproximadamente 10-15 turistas fica o mais próximo possível para interagir com os animais. Essas interações criam oportunidades não naturais para a troca de patógenos entre humanos e golfinhos do rio Amazonas, pois esses golfinhos podem respirar diretamente no rosto dos turistas, e os turistas podem acidentalmente ingerir água contendo fezes de animais e urina. Além disso, os animais são alimentados artificialmente com peixes descongelados, nem sempre mantidos em condições sanitárias adequadas, facilitando a introdução de patógenos na população animal. Nesse contexto, programas de ecoturismo com golfinhos devem ser estabelecidos sob estrito controle, pois cuidados especiais devem ser tomados na interação com animais silvestres, para evitar a troca de patógenos e o surgimento de doenças infecciosas em populações humanas e / ou animais, enfatizando mais uma vez a importância da abordagem Saúde Única.

8 CONCLUSÃO

A análise atual fornece informações sobre o perfil de resistência antimicrobiana e fatores de virulência em animais sentinela de dois ambientes aquáticos diferentes na região amazônica e enfatiza a importância da abordagem Saúde Única para melhor compreender a dinâmica da virulência bacteriana. As cavidades naturais de botos do rio Amazonas de vida livre são colonizadas por bactérias Gram-negativas, principalmente da ordem Enterobacterales, fornecendo informações sobre as características biológicas dessa espécie animal. Além disso, esses isolados apresentam uma alta taxa de resistência antimicrobiana e virulência, cuja origem não está claramente definida, mas provavelmente envolvem atividades antrópicas que levam a impactos ambientais nos habitats dos botos do rio Amazonas, que, por sua vez, podem afetar diferentes aspectos da saúde e estado de conservação dos animais. É de particular importância realizar o monitoramento regular e prevenir a transmissão zoonótica de bactérias potencialmente patogênicas ou resistentes a antibióticos de cetáceos para humanos e outras espécies, demonstrando a necessidade de um estudo mais aprofundado dos botos do rio Amazonas e seus habitats.

9 REFERÊNCIAS

- AHMED, E.; HOLMSTRÖM, S. J. M. Siderophores in environmental research: roles and applications. **Microbial biotechnology**, v. 7, n. 3, p. 196-208, 2014.
- ALVES, L. C. P. S., ANDRIOLO, A., ORAMS, M. B., AZEVEDO, A. F. The growth of “botos feeding tourism”, a new tourism industry based on the boto (Amazon river dolphin) *Inia geoffrensis* in the Amazonas State, Brazil. *Sitientibus Serie Ciências Biológicas*, 11(1), 8–15, 2011.
- ALVES, L. D. S., MACHADO, C. J. S., VILANI, R. M., VIDAL, M. D., ANDRIOLO, A., & AZEVEDO, A. D. F. The touristic activities based on artificial feeding of botos (*Inia geoffrensis*) and the Brazilian environmental legislation. **Desenvolvimento e Meio Ambiente**, v. 28, p. 89-106, 2013.
- AN, S.; BERG, G. *Stenotrophomonas maltophilia*. **Trends in microbiology**, v. 26, n. 7, p. 637-638, 2018.
- AVILA, I. C.; KASCHNER, K.; DORMANN, C. F. Current global risks to marine mammals: Taking stock of the threats. **Biological Conservation**, v. 221, p. 44-58, 2018.
- AYALEW, S., MURDOCK, B. K., SNIDER, T. A., & CONFER, A. W. *Mannheimia haemolytica* IgA-specific proteases. **Veterinary microbiology**, v. 239, p. 108487, 2019.
- BALCÁZAR, J. L., SUBIRATS, J., & BORREGO, C. M. The role of biofilms as environmental reservoirs of antibiotic resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1216, 2015.
- BANDEIRA, T. D. J. P. G., MOREIRA, C. A., BRILHANTE, R. S. N., CASTELO, D. D. S. C. M., DE ARAÚJO NETO, M. P., DE AGUIAR CORDEIRO, R., ... & SIDRIM, J. J. C. *In vitro* activities of amoxicillin-clavulanate, doxycycline, ceftazidime, imipenem, and trimethoprim-sulfamethoxazole against biofilm of Brazilian strains of *Burkholderia pseudomallei*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 11, p. 5771-5773, 2013.
- BANDY, A. Ringing bells: *Morganella morganii* fights for recognition. **Public Health**, v. 182, p. 45-50, 2020.
- BANSAL, R., PATHAK, R., JHA, D., KUMAR, P., & GAUTAM, H. K. Enhanced antimicrobial activity of amine-phosphonium (NP) hybrid polymers against Gram-negative and Gram-positive bacteria. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, v. 64, n. 2, p. 84-89, 2015.
- BARBOSA, M. S.; CARVALHO, D. P.; GRAVENA, W.; DE ALMEIDA, R.; MUSSY, M. H.; SOUSA, E. A.; HOLANDA, I. B. B.; DE SOUZA-FILHO, I. F.; BASTOS, W. R. Total mercury and methylmercury in river dolphins (Cetacea: Iniidae: *Inia* spp.) in the Madeira River Basin, Western Amazon. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-13, 2021.
- BARTLEY, P. S., DOMITROVIC, T. N., MORETTO, V. T., SANTOS, C. S., PONCE-TERASHIMA, R., REIS, M. G., PEREZ, F. Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae from

surface waters in urban Brazil highlights the risks of poor sanitation. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 100, n. 6, p. 1369-1377, 2019.

BERGEY, D. H. et al. **Bergey's Manual of systematic bacteriology. Vol. 2.** Williams & Wilkins, 1984.

BERNE, C., ELLISON, C. K., DUCRET, A., & BRUN, Y. V. Bacterial adhesion at the single-cell level. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 10, p. 616-627, 2018.

BERNIER, S. P., & SURETTE, M. G. Concentration-dependent activity of antibiotics in natural environments. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 20, 2013.

BEST, R. C., & DA SILVA, V. M. Amazon river dolphin, boto *Inia geoffrensis* (de Blainville, 1817). **Handbook of marine mammals**, v. 4, p. 1-23, 1989.

BEST, R. C., & DA SILVA, V. M. *Inia geoffrensis*. **Mammalian Species**, n. 426, p. 1-8, 1993.

BOESSENECKER, Robert W. *A Holistic Approach to Marine Mammal Biology*. 2018.

BOGOMOLNI, A. L., GAST, R. J., ELLIS, J. C., DENNETT, M., PUGLIARES, K. R., LENTELL, B. J., & MOORE, M. J. Victims or vectors: a survey of marine vertebrate zoonoses from coastal waters of the Northwest Atlantic. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 81, n. 1, p. 13-38, 2008.

BOO, Elizabeth. *O planejamento ecoturístico para áreas protegidas. Ecoturismo: um guia para planejamento e gestão. São Paulo: Senac*, 1999.

BOSSART, G. D. Marine mammals as sentinel species for oceans and human health. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 3, p. 676-690, 2011.

BRILHANTE, R. S., PAIVA, M. A., SAMPAIO, C. M., TEIXEIRA, C. E., CASTELOBRANCO, D. S., LEITE, J. J., ... & SIDRIM, J. J. Yeasts from *Macrobrachium amazonicum*: a focus on antifungal susceptibility and virulence factors of *Candida* spp. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 76, n. 2, p. 268-277, 2011.

BROOKE, J. S., DI BONAVENTURA, G., BERG, G., & MARTINEZ, J. L. A multidisciplinary look at *Stenotrophomonas maltophilia*: An emerging multi-drug-resistant global opportunistic pathogen. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 1511, 2017.

BRUM, S.; ROSAS-RIBEIRO, P.; AMARAL, R. D. S.; DE SOUZA, D. A.; CASTELLO, L.; DA SILVA, V. M. F. Conservation of Amazonian aquatic mammals. **Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems**, 2021.

CAI, Q., & ZHANG, Y. Structure, function and regulation of the thermostable direct hemolysin (TDH) in pandemic *Vibrio parahaemolyticus*. **Microbial pathogenesis**, v. 123, p. 242-245, 2018.

CAO, X. L., CHENG, L., ZHANG, Z. F., NING, M. Z., ZHOU, W. Q., ZHANG, K., & SHEN, H. Survey of clinical extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacter cloacae* isolates in a Chinese Tertiary Hospital, 2012–2014. **Microbial Drug Resistance**, v. 23, n. 1, p. 83-89, 2017.

CARROLL, D., WANG, J., FANNING, S., & MCMAHON, B. J. Antimicrobial resistance in wildlife: implications for public health. **Zoonoses and Public Health**, v. 62, n. 7, p. 534-542, 2015.

CARTER, M. Q., PHAM, A., HUYNH, S., & HE, X. Complete genome sequence of a Shiga toxin-producing *Enterobacter cloacae* clinical isolate. **Genome Announcements**, v. 5, n. 37, 2017.

CASTELO-BRANCO, D. D. S. C., PAIVA, M. D. A. N., TEIXEIRA, C. E. C., CAETANO, É. P., GUEDES, G. M. D. M., CORDEIRO, R. D. A., ... & SIDRIM, J. J. C. Azole resistance in *Candida* from animals calls for the One Health approach to tackle the emergence of antimicrobial resistance. **Medical Mycology**, 2020.

CENTRES FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (US). **Antibiotic resistance threats in the United States, 2013**. Centers for Disease Control and Prevention, US Department of Health and Human Services, 2013.

CLSI. M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 2018.

COSTERTON, J. W., LEWANDOWSKI, Z., CALDWELL, D. E., KORBER, D. R., & LAPPIN-SCOTT, H. M. Microbial biofilms. **Annual review of microbiology**, v. 49, n. 1, p. 711-745, 1995.

CRAVALHO, M. A. Shameless creatures: An ethnozoology of the Amazon River dolphin. *Ethnology*, p. 47-58, 1999.

DA SILVA, V. M. F., & MARTIN, A. R. Status, threats, conservation initiatives and possible solutions for *Inia geoffrensis* and *Sotalia fluviatilis* in Brazil. **The action plan for South American river dolphins**, v. 2020, p. 123-143, 2010.

DA SILVA, V., TRUJILLO, F., MARTIN, A., ZERBINI, A. N., CRESPO, E., ALIAGA-ROSSEL, E., & REEVES, R. *Inia geoffrensis*. **The IUCN Red List of Threatened Species**, v. 2018, p. e. T10831A50358152, 2019.

DAWSON, S., WADE, P., SLOOTEN, E., & BARLOW, J. A. Y. Design and field methods for sighting surveys of cetaceans in coastal and riverine habitats. 2008.

DELPORT, T. C., HARCOURT, R. G., BEAUMONT, L. J., WEBSTER, K. N., & POWER, M. L. Molecular detection of antibiotic-resistance determinants in *Escherichia coli* isolated from the endangered Australian sea lion (*Neophoca cinerea*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 51, n. 3, p. 555-563, 2015.

DI CESARE, A.; ECKERT, E.; CORNO, G. Co-selection of antibiotic and heavy metal resistance in freshwater bacteria. **Journal of Limnology**, v. 75, n. Suppl 2, p. 59-66, 2016.

DO AMARAL K., H.; DI BENEDITTO, Ana Paula Madeira; SEIXAS, Tercia Guedes. Marine Mammals as Environmental Sentinels Focusing on Mercury Contamination. In: **Ecotoxicology**. CRC Press, p. 58-78, 2018.

DUDEK, N. K., SUN, C. L., BURSTEIN, D., KANTOR, R. S., GOLTSMAN, D. S. A., BIK, E. M., RELMAN, D. A. Novel microbial diversity and functional potential in the marine mammal oral microbiome. **Current Biology**, v. 27, n. 24, p. 3752-3762. e6, 2017.

EGOROV, A. M.; ULYASHOVA, M. M.; RUBTSOVA, M. Yu. Bacterial enzymes and antibiotic resistance. **Acta Naturae (англоязычная версия)**, v. 10, n. 4 (39), 2018.

ELSNER, R. Cetacean physiology, Overview. In: PERRIN, W. F.; WÜRSIG, B.; THEWISSEN, H. G. M. (Eds.). **Encyclopedia of marine mammals**. San Diego: Academic Press, p.225-229, 2002.

FRIEDLANDER, C. Über die scizomyceten bei der acuten fibrosen pneumonie. **Arch Pathol Anat Physiol Klin Med**, v. 87, p. 319-324, 1882.

FURNESS, L. E., CAMPBELL, A., ZHANG, L., GAZE, W. H., & MCDONALD, R. A. Wild small mammals as sentinels for the environmental transmission of antimicrobial resistance. **Environmental Research**, v. 154, p. 28-34, 2017.

GARRETT, T. R., BHAKOO, M., & ZHANG, Z. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. **Progress in Natural Science**, v. 18, n. 9, p. 1049-1056, 2008.

GAW, S.; THOMAS, K. V.; HUTCHINSON, T. H. Sources, impacts and trends of pharmaceuticals in the marine and coastal environment. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 369, n. 1656, p. 20130572, 2014.

GEST, H. The discovery of microorganisms by Robert Hooke and Antoni Van Leeuwenhoek, fellows of the Royal Society. **Notes and records of the Royal Society of London**, v. 58, n. 2, p. 187-201, 2004.

GOMES, C., MARTÍNEZ-PUCHOL, S., PALMA, N., HORNA, G., RUIZ-ROLDÁN, L., PONS, M. J., & RUIZ, J. Macrolide resistance mechanisms in Enterobacteriaceae: focus on azithromycin. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 1-30, 2017.

GRAVENA, W., FARIAS, I. P., DA SILVA, M. N., DA SILVA, V. M., & HRBEK, T. Looking to the past and the future: were the Madeira River rapids a geographical barrier to the boto (Cetacea: *Iniidae*)?. **Conservation Genetics**, v. 15, n. 3, p. 619-629, 2014.

GRAVENA, W., HRBEK, T., DA SILVA, V. M. F., & FARIAS, I. P. Boto (*Inia geoffrensis*—Cetacea: *Iniidae*) aggregations in two provisioning sites in the lower Negro River—Amazonas, Brazil: are they related?. **PeerJ**, v. 7, p. e6692, 2019.

GRAVENA, W., HRBEK, T., DA SILVA, V. M., & FARIAS, I. P. Amazon River dolphin love fetishes: From folklore to molecular forensics. **Marine Mammal Science**, v. 24, n. 4, p. 969-978, 2008.

GRAVENA, W.; FAVERO, C. M.; DA SILVA, V. M. F.; MARIGO, J. Metagenomics analysis of bacterial communities of the respiratory tract of botos (*Inia geoffrensis*) that interact with humans in the Amazon. In: **Abstract of 22nd Biennial Conference on the Biology of Marine Mammals**, s, Volume 1. Canada, 2017.

GROSSART, H. P., DZIALLAS, C., LEUNERT, F., & TANG, K. W. Bacteria dispersal by hitchhiking on zooplankton. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 26, p. 11959-11964, 2010.

GUPTA, S. P. (Ed.). **Viral proteases and their inhibitors**. Academic Press, 2017.

HAWKEY, P. M.; JONES, A. M. The changing epidemiology of resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, n. suppl_1, p. i3-i10, 2009.

HERMOSILLA, C., HIRZMANN, J., SILVA, L. M., SCHEUFEN, S., PRENGER-BERNINGHOFF, E., EWERS, C., ... & TAUBERT, A. Gastrointestinal parasites and bacteria in free-living South American sea lions (*Otaria flavescens*) in Chilean Comau Fjord and new host record of a *Diphyllobothrium scoticum*-like cestode. **Frontiers in Marine Science**, v. 5, p. 459, 2018.

HEUKELEKIAN, H.; HELLER, A. Relation between food concentration and surface for bacterial growth. **Journal of bacteriology**, v. 40, n. 4, p. 547, 1940.

HOLDEN, V. I.; BACHMAN, M. A. Diverging roles of bacterial siderophores during infection. **Metallomics**, v. 7, n. 6, p. 986-995, 2015.

HORMAECHE, E., & EDWARDS, P. R. Proposal for the Rejection of the Generic Name *Cloaca Castellani* and Chalmers, and Proposal of *Enterobacter* as a Generic Name with Designation of Type Species and of its Type Culture. With Request for an Opinion. **International bulletin of bacteriological nomenclature and taxonomy**, v. 10, n. 2, p. 75-6, 1960.

HRBEK, T., DA SILVA, V. M. F., DUTRA, N., GRAVENA, W., MARTIN, A. R., & FARIAS, I. P. A new species of river dolphin from Brazil or: how little do we know our biodiversity. **PLoS one**, v. 9, n. 1, p. e83623, 2014.

HUGHES, S. N., GREIG, D. J., MILLER, W. A., BYRNE, B. A., GULLAND, F. M., & HARVEY, J. T. Dynamics of *Vibrio* with virulence genes detected in Pacific harbor seals (*Phoca vitulina richardii*) off California: implications for marine mammal health. **Microbial Ecology**, v. 65, n. 4, p. 982-994, 2013.

HUSSAIN, Q. A. Bacteria: the natural indicator of environmental pollution. In: **Freshwater Microbiology**. Academic Press, p. 393-420, 2019.

ICMBio. Sumário Executivo do Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Mamíferos Aquáticos Amazônicos. 2019.

IPE (Instituto de Pesquisas Ecológicas). Ações no desenvolvimento de iniciativas para o turismo de base comunitária no entorno sul do Parque Nacional de Anavilhanas. Manaus: IPE, 12 p., 2009.

IREDELL, J.; BROWN, J.; TAGG, K. Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae: mechanisms and clinical implications. **Bmj**, v. 352, p. h6420, 2016.

IRIARTE, V.; MARMONTEL, M. Insights on the use of dolphins (boto, *Inia geoffrensis* and *tucuxi*, *Sotalia fluviatilis*) for bait in the piracatinga (*Calophysus macropterus*) fishery in the western Brazilian Amazon. **Journal of Cetacean Research and Management**, v. 13, n. 2, p. 163-173, 2013.

JAMAL, M., AHMAD, W., ANDLEEB, S., JALIL, F., IMRAN, M., NAWAZ, M. A., KAMIL, M. A. Bacterial biofilm and associated infections. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 81, n. 1, p. 7-11, 2018.

JEFFERSON, T. A., WEBBER, M. A., & PITMAN, R. L. **Marine mammals of the world: a comprehensive guide to their identification**. Elsevier, 2011.

- JOHNSON, Douglas I.; BECK. **Bacterial pathogens and their virulence factors**. Cham: Springer, 2018.
- KARKMAN, A., DO, T. T., WALSH, F., & VIRTA, M. P. Antibiotic-resistance genes in waste water. **Trends in Microbiology**, v. 26, n. 3, p. 220-228, 2018.
- KIRBY-BAUER, A. Antimicrobial sensitivity testing by agar diffusion method. **Journal of Clinical Pathology**, v. 44, p. 493, 1996.
- KONEMAN, E.W., **Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas Colorido**, 6.ed., Cleveland: Guanabara Koogan, 2018. p.1760.
- KOCH, M. S., DA SILVA, V. D. P., BRACARENSE, A. P. F. R. L., DOMIT, C. Environmental aspects and diseases related to immunosuppression in cetaceans: a concise review. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 39, n. 6, p. 2897-2918, 2018.
- KRISS, M., HAZLETON, K. Z., NUSBACHER, N. M., MARTIN, C. G., LOZUPONE, C. A. Low diversity gut microbiota dysbiosis: drivers, functional implications and recovery. **Current opinion in microbiology**, v. 44, p. 34-40, 2018.
- KUMAR, A., ALAM, A., RANI, M., EHTESHAM, N. Z., & HASNAIN, S. E. Biofilms: Survival and defense strategy for pathogens. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 307, n. 8, p. 481-489, 2017.
- LEE, C.R.; LEE, J.H.; PARK, K.S.; JEON, J.H.; KIM, Y.B.; CHA, C.J.; JEONG, B.C.; LEE, S.H. Antimicrobial resistance of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology, hypervirulence-associated determinants, and resistance mechanisms. **Front cell infect microbiol**, v. 7, p. 483, 2017.
- LIMA, N. et al. Temporal stability and species specificity in bacteria associated with the bottlenose dolphins respiratory system. **Environmental microbiology reports**, v. 4, n. 1, p. 89-96, 2012.
- LIN, X. A., & YAN, J. Advance in toxic and pathogenic mechanisms of bacterial hemolysins. **Chinese Journal of Zoonoses**, v. 34, n. 2, p. 175-181, 2018.
- LIU, H., ZHU, J., HU, Q., & RAO, X. *Morganella morganii*, a non-negligent opportunistic pathogen. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 50, p. 10-17, 2016.
- MACPHERSON, A. J.; HARRIS, N. L. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 6, p. 478-485, 2004.
- MAREGA-IMAMURA, M., MICHALSKI, F., SILVA, K., SCHIAVETTI, A., LE PENDU, Y., & DE CARVALHO OLIVEIRA, L. Scientific collaboration networks in research on human threats to cetaceans in Brazil. **Marine Policy**, v. 112, p. 103738, 2020.
- MARIGO, J.; GROCH, R. G.. Cetacea (Golfinhos e Baleias). In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de Animais Selvagens**. 2.nd ed. São Paulo: Roca, 2014. p. 744-745.

- MARTIN, A. R., & DA SILVA, V. M. F. Sexual dimorphism and body scarring in the boto (Amazon river dolphin) *Inia geoffrensis*. **Marine Mammal Science**, n. 22, p. 25–33, 2006.
- MELLO, D. M. D.; DA SILVA, V. M. F. Hematologic profile of Amazon river dolphins *Inia geoffrensis* and its variation during acute capture stress. **PloS one**, 14(12), e0226955, 2019.
- MELLO, D. M. D.; DA SILVA, V. M. F. Reference values for serum chemistry of wild Amazon river dolphins (*Inia geoffrensis*) from the central Amazon. **Marine Mammal Science**, 2020.
- MORADALI, M. F., GHODS, S., & REHM, B. H. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 7, p. 39, 2017.
- MORENO, E., GUZMÁN-VERRI, C., GONZALEZ-BARRIOS, R., HERNANDEZ, G., MORALES, J. A., BARQUERO-CALVO, E., & CHAVES-OLARTE, E. *Brucella ceti* and brucellosis in cetaceans. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 2, p. 3, 2012.
- MOSQUERA-GUERRA, F., TRUJILLO, F., AYA-CUERO, C., FRANCO-LEÓN, N., VALENCIA, K., VASQUEZ, A., ... & ARMENTERAS-PASCUAL, D. Population estimate and identification of major conservation threats for the river dolphin (*Inia geoffrensis humboldtiana*) at the Colombian Orinoquia. **Therya**, v. 11, n. 1, 2019.
- MULET, M., GOMILA, M., RAMÍREZ, A., CARDEW, S., MOORE, E. R. B., LALUCAT, J., & GARCÍA-VALDÉS, E. Uncommonly isolated clinical *Pseudomonas*: identification and phylogenetic assignation. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 36, n. 2, p. 351-359, 2017.
- MURI, E. M. F. Proteases virais: importantes alvos terapêuticos de compostos peptidomiméticos. **Química Nova**, v. 37, n. 2, p. 308-316, 2014.
- MURRAY, Patrick R.; ROSENTHAL, Ken S.; PFALLER, Michael A. **Medical Microbiology E-Book**. Elsevier Health Sciences, 2020.
- NELSON, T. M., APPRILL, A., MANN, J., ROGERS, T. L., & BROWN, M. V. The marine mammal microbiome: current knowledge and future directions. **Microbiology Australia**, v. 36, n. 1, p. 8-13, 2015.
- NORDIN, C. F., & MEADE, R. H. The Amazon and the Orinoco. in **McGraw-Hill Yearbook of Science and Technology**, p. 385-390, 1986.
- OBUSAN, M. C. M., ARAGONES, L. V., RIVERA, W. L., & SIRINGAN, M. A. T. Antibiotic Susceptibility Patterns of Bacteria Isolated from Cetaceans Stranded in the Philippines. **Aquatic Mammals**, v. 44, n. 5, p. 568-579, 2018.
- PACZOSA, M. K., & MECSAS, J. *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 3, p. 629-661, 2016.
- PAL, S., MISRA, A., BANERJEE, S., & DAM, B. Adaptation of ethidium bromide fluorescence assay to monitor activity of efflux pumps in bacterial pure cultures or mixed

population from environmental samples. **Journal of King Saud University-Science**, v. 32, n. 1, p. 939-945, 2020.

PARSONS, E. C. M., C. A. WARBUTON, A. WOODS-BALLARD, A. HUGHES & P. JOHNSTON. The value of conserving whales: the impacts of cetacean-related tourism on the economy of rural West Scotland. **Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems** 13(5): 397-415, 2003.

PARSONS, E. C. M., WARBURTON, C. A., WOODS-BALLARD, A., HUGHES, A., & JOHNSTON, P. The value of conserving whales: the impacts of cetacean-related tourism on the economy of rural West Scotland. **Aquatic conservation: marine and freshwater ecosystems**, v. 13, n. 5, p. 397-415, 2003.

PATHAK, P., JAISHI, N., YADAV, B. K., & SHAH, P. K. Prevalence of extended spectrum beta lactamases (ESBL) and metallo beta lactamases (MBL) mediated resistance in gram negative bacterial pathogens. **Tribhuvan University Journal of Microbiology**, v. 4, p. 49-54, 2017.

PHANSRI, K., SARNTHIMA, R., THAMMASIRIRAK, S., BOONCHALEE, P., & KHAMMUANG, S. Antibacterial activity of *Bauhinia acuminata* L. seed protein extract with low hemolytic activity against human erythrocytes. **Chiang Mai J Sci**, v. 38, n. 2, p. 242-251, 2011.

POTTER, S. L. **Antimicrobial Resistance in *Orcinus orca* Scat: Using Marine Sentinels as Indicators of Pharmaceutical Pollution in the Salish Sea**. 2013. 167 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Evergreen State College, Tacoma, 2013.

RADHOUANI, H., SILVA, N., POETA, P., TORRES, C., CORREIA, S., & IGREJAS, G. Potential impact of antimicrobial resistance in wildlife, environment and human health. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 23, 2014.

REEVES, R. R., JEFFERSON, T. A., KASUYA, T., SMITH, B. D., WANG, D., WANG, P., ... & ZHOU, K. Report of the workshop to develop a conservation action plan for the Yangtze River finless porpoise, Ocean Park, Hong Kong, 16–18 September 1997. **Occasional Paper of the IUCN Species Survival Commission**, v. 23, p. 67-80, 2000.

REEVES, Randall R. (Ed.). **Dolphins, whales and porpoises: 2002-2010 conservation action plan for the world's cetaceans**. IUCN, 2003.

RICE, Dale W. Marine mammals of the world. **Systematics and distribution**, 1998.

RICHARD, K. L., KELLEY, B. R., & JOHNSON, J. G. Heme Uptake and Utilization by Gram-Negative Bacterial Pathogens. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, p. 81, 2019.

RIZZO, L., MANAIA, C., MERLIN, C., SCHWARTZ, T., DAGOT, C., PLOY, M. C., FATTA-KASSINOS, D. Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: a review. **Science of the total environment**, v. 447, p. 345-360, 2013.

ROBECK, T. R.; AMARAL, R. S.; DA SILVA, V. M. F.; MARTIN, A. R.; MONTANO, G. A.; BROWN, J. L. Thyroid hormone concentrations associated with age, sex, reproductive

status and apparent reproductive failure in the Amazon river dolphin (*Inia geoffrensis*). **Conservation physiology**, 7(1), coz041, 2019.

ROCHA, A. J., BARSOTTINI, M. R. D. O., ROCHA, R. R., LAURINDO, M. V., MORAES, F. L. L. D., & ROCHA, S. L. D. *Pseudomonas Aeruginosa*: Virulence Factors and Antibiotic Resistance Genes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 62, 2019.

ROMAGNOLI, F. C. Interpretação ambiental e envolvimento comunitário: ecoturismo como ferramenta para a conservação do boto-vermelho, *Inia geoffrensis*. 2009.

ROMAGNOLI, F. C., DA SILVA, V. M. F., NELSON, S. P., & SHEPARD-JR, G. H. Proposta para o turismo de interação com botos-vermelhos (*Inia geoffrensis*): como trilhar o caminho do ecoturismo. **Revista Brasileira de Ecoturismo**, v. 4, n. 3, p. 463-480, 2011.

ROSE, J. M., GAST, R. J., BOGOMOLNI, A., ELLIS, J. C., LENTELL, B. J., TOUHEY, K., & MOORE, M. Occurrence and patterns of antibiotic resistance in vertebrates off the Northeastern United States coast. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 67, n. 3, p. 421-431, 2009.

RUANO-GALLEGO, D., FRAILE, S., GUTIERREZ, C., & FERNÁNDEZ, L. Á. Screening and purification of nanobodies from *E. coli* culture supernatants using the hemolysin secretion system. **Microbial cell factories**, v. 18, n. 1, p. 47, 2019.

RUSSO, C. D., WELLER, D. W., NELSON, K. E., CHIVERS, S. J., TORRALBA, M., GRIMES, D. J. Bacterial species identified on the skin of bottlenose dolphins off southern California via next generation sequencing techniques. **Microbial ecology**, v. 75, n. 2, p. 303-309, 2018.

SABATER, S., GUASCH, H., RICART, M., ROMANÍ, A., VIDAL, G., KLÜNDER, C., & SCHMITT-JANSEN, M. Monitoring the effect of chemicals on biological communities. The biofilm as an interface. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 387, n. 4, p. 1425-1434, 2007.

SACRISTÁN, C.; ESPERÓN, F.; EWBANK, A.C.; DÍAZ-DELGADO J.; FERREIRA-MACHADO E.; COSTA-SILVA S.; SÁNCHEZ-SARMIENTO A.M.; GROCH K.R.; NEVES H.; DUTRA G.H.P.; GRAVENA W.; DA SILVA V.M.F.; MARCONDES M.C.C.; COLOSIO A.C.; CREMER M.J.; CARVALHO V.L.; MEIRELLES A.C.O.; MARIGO J.; CATÃO-DIAS J. L.; Novel herpesviruses in riverine and marine cetaceans from South America. **Acta tropica**, v. 190, p. 220-227, 2019.

SAHA, M., SARKAR, S., SARKAR, B., SHARMA, B. K., BHATTACHARJEE, S., TRIBEDI, P. Microbial siderophores and their potential applications: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 5, p. 3984-3999, 2016.

SAHA, R., SAHA, N., DONOFRIO, R. S., & BESTERVELT, L. L. Microbial siderophores: a mini review. **Journal of basic microbiology**, v. 53, n. 4, p. 303-317, 2013.

SÁNCHEZ-SARMIENTO, A. M.; CARVALHO, V. L.; MEIRELLES, A. C. O.; GRAVENA, W.; MARIGO, J.; SACRISTÁN, C.; COSTA-SILVA, S.; GROCH K. R.; SILVA, N. S.; NETO J. S. F.; CATÃO-DIAS, J. L. Survey of *Brucella* spp. and *Leptospira*

spp. antibodies in cetaceans and manatees of the Amazon basin and Atlantic Ocean, Brazil. **Diseases of aquatic organisms**, 132(1), 1-11, 2018.

SANTOS, P. S.; ALBUQUERQUE, G. R.; DA SILVA, V.M.F.; MARTIN, A.R.; MARVULO, M. F. V.; SOUZA, S.L.P.; RAGOZO, A. M. A.; NASCIMENTO, C. C.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; SILVA, J. C. R. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in free-living Amazon River dolphins (*Inia geoffrensis*) from central Amazon, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 183, n. 1-2, p. 171-173, 2011.

SCARPACI, C., DAYANTHI, N., & CORKERON, P. J. Compliance with regulations by “swim-with-dolphins” operations in Port Phillip Bay, Victoria, Australia. **Environmental Management**, v. 31, n. 3, p. 0342-0347, 2003.

SCARPACI, C.; N. DAYANTHI. Compliance with regulations by “swim-with- dolphins” operations in Port Philip Bay, Victoria, Australia. **Environmental Management** 31(3): 342-347, 2003.

SCHAEFER, A. M., BOSSART, G. D., HARRINGTON, T., FAIR, P. A., MCCARTHY, P. J., & REIF, J. S. Temporal Changes in Antibiotic Resistance Among Bacteria Isolated from Common Bottlenose Dolphins (*Tursiops truncatus*) in the Indian River Lagoon, Florida, 2003-2015. **Aquatic Mammals**, v. 45, n. 5, p. 533-542, 2019.

SCHAEFER, A. M., BOSSART, G. D., MAZZOIL, M., FAIR, P. A., & REIF, J. S. Risk factors for colonization of *E. coli* in Atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in the Indian River lagoon, Florida. **Journal of Environmental and Public Health**, v. 2011, 2011.

SCHALK, I. J., HANNAUER, M., & BRAUD, A. New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance. **Environmental microbiology**, v. 13, n. 11, p. 2844-2854, 2011.

SCHWYN, B.; NEILANDS, J. B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry**, v. 160, n. 1, p. 47-56, 1987.

SEKIROV, I., RUSSELL, S. L., ANTUNES, L. C. M., & FINLAY, B. B. Gut microbiota in health and disease. **Physiological reviews**, v. 90, n. 3, p. 859-904, 2010.

SIDRIM, J. J. C., DE SOUZA COLLARES, D. C. B., BRILHANTE, R. S. N., SOARES, G. D. P., CORDEIRO, R. A., MONTEIRO, A. J., & ROCHA, M. F. G. *Candida* species isolated from the gastrointestinal tract of cockatiels (*Nymphicus hollandicus*): *in vitro* antifungal susceptibility profile and phospholipase activity. **Veterinary Microbiology**, v. 145, n. 3-4, p. 324-328, 2010.

SIMON, M.; GROSSART, H. P., SCHWEITZER, B., AND PLOUG, H. 2002. Microbial ecology of organic aggregates in aquatic ecosystems. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 28, p. 175-211.

SINHA, A. K.; PARLI, B. V. Siderophore production by bacteria isolated from mangrove sediments: A microcosm study. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 524, p. 151290, 2020.

SOUNDY, J.; DAY, D. Delivery of antibacterial silver nanoclusters to *Pseudomonas aeruginosa* using species-specific DNA aptamers. **Journal of Medical Microbiology**, v. 69, n. 4, p. 640-652, 2020.

STEPANOVIĆ, S., VUKOVIĆ, D., DAKIĆ, I., SAVIĆ, B., & ŠVABIĆ-VLAHOVIĆ, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 40, n. 2, p. 175-179, 2000.

STEWART, J. R., GAST, R. J., FUJIOKA, R. S., SOLO-GABRIELE, H. M., MESCHKE, J. S., AMARAL-ZETTLER, L. A., ... & SINIGALLIANO, C. D. The coastal environment and human health: microbial indicators, pathogens, sentinels and reservoirs. **Environmental Health**. p. 88-95. 2008.

STEWART, J. R., TOWNSEND, F. I., LANE, S. M., DYAR, E., HOHN, A. A., ROWLES, T. K., ... & SCHWACKE, L. H. Survey of antibiotic-resistant bacteria isolated from bottlenose dolphins *Tursiops truncatus* in the southeastern USA. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 108, n. 2, p. 91-102, 2014.

SU, H., XIAO, Z., YU, K., HUANG, Q., WANG, G., WANG, Y., ... & CHEN, B. Diversity of cultivable protease-producing bacteria and their extracellular proteases associated to scleractinian corals. **PeerJ**, v. 8, p. e9055, 2020.

SYLVAIN, F. É., HOLLAND, A., AUDET-GILBERT, É., LUIS VAL, A., & DEROME, N. Amazon fish bacterial communities show structural convergence along widespread hydrochemical gradients. **Molecular ecology**, v. 28, n. 15, p. 3612-3626, 2019.

TANG, F., LI, L., MENG, X. M., LI, B., WANG, C. Q., WANG, S. Q., ... & TIAN, Y. M. Inhibition of alpha-hemolysin expression by resveratrol attenuates *Staphylococcus aureus* virulence. **Microbial Pathogenesis**, v. 127, p. 85-90, 2019.

TAYLOR, B. L.; ABEL, G.; MILLER, P.; GOMEZ, F.; FERSEN, L. VON.; DEMASTER, D.; REEVES, R. R.; ROJAS-BRACHO, L.; WANG, D.; HAO, Y.; CIPRIANO, F. *Ex situ* options for cetacean conservation: report of the 2018 workshop, Nuremberg, Germany, 2018.

TELLO, A.; AUSTIN, B.; TELFER, T. C. Selective pressure of antibiotic pollution on bacteria of importance to public health. **Environmental Health Perspectives**, v. 120, n. 8, p. 1100-1106, 2012.

TENAILLON, O., SKURNIK, D., PICARD, B., & DENAMUR, E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 207-217, 2010.

TINDALL, B. J.; SUTTON, G.; GARRITY, G. M. *Enterobacter aerogenes* Hormaeche and Edwards 1960 (Approved Lists 1980) and *Klebsiella mobilis* Bascomb et al. 1971 (Approved Lists 1980) share the same nomenclatural type (ATCC 13048) on the Approved Lists and are homotypic synonyms, with consequences for the name *Klebsiella mobilis* Bascomb et al. 1971 (Approved Lists 1980). **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 67, n. 2, p. 502-504, 2017.

TURNBAUGH, P. J., LEY, R. E., HAMADY, M., FRASER-LIGGETT, C. M., KNIGHT, R., & GORDON, J. I. The human microbiome project. **Nature**, v. 449, n. 7164, p. 804-810, 2007.

VEDROS, N. A.; QUINLIVAN, J.; CRANFORD, R.. Bacterial and fungal flora of wild

northern fur seals (*Callorhinus ursinus*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 18, n. 4, p. 447-456, 1982.

VENKATESAN, N., PERUMAL, G., & DOBLE, M. Bacterial resistance in biofilm-associated bacteria. **Future Microbiology**, v. 10, n. 11, p. 1743-1750, 2015.

VIDAL, Ma. D. Turismo interativo com botos (*Inia geoffrensis*) no baixo Rio Negro, Amazônia Central. 2018.

VLAMAKIS, H., CHAI, Y., BEAUREGARD, P., LOSICK, R., & KOLTER, R. Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 3, p. 157-168, 2013.

WALLACE, C. C., YUND, P. O., FORD, T. E., MATASSA, K. A., & BASS, A. L. Increase in antimicrobial resistance in bacteria isolated from stranded marine mammals of the Northwest Atlantic. **EcoHealth**, v. 10, n. 2, p. 201-210, 2013.

WANG, B., YAO, M., LV, L., LING, Z., & LI, L. The human microbiota in health and disease. **Engineering**, v. 3, n. 1, p. 71-82, 2017.

WEINER, L. M., WEBB, A. K., LIMBAGO, B., DUDECK, M. A., PATEL, J., KALLEN, A. J., ... & SIEVERT, D. M. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011–2014. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 37, n. 11, p. 1288-1301, 2016.

WONGTRAKOONGATE, P.; TUMAPA, S.; TUNGPRADABKUL, S. Regulation of a quorum sensing system by stationary phase sigma factor RpoS and their co-regulation of target genes in *Burkholderia pseudomallei*. **Microbiology and Immunology**, v. 56, n. 5, p. 281-294, 2012.

World Health Organization (2019) Ten threats to global health in 2019. <https://www.who.int/emergencies/ten-threats-to-global-health-in-2019>.

WÜRSIG, B.; PERRIN, W. F.; THEWISSEN, J. G. M. History of marine mammal research. In: **Encyclopedia of Marine Mammals**. Academic Press, 2018. p. 472-477.

YOUNG, VINCENT B. The role of the microbiome in human health and disease: an introduction for clinicians. **Bmj**, v. 356, p. j831, 2017.

ZOBELL, C. E. The effect of solid surfaces upon bacterial activity. **Journal of bacteriology**, v. 46, n. 1, p. 39, 1943.