

## **II-021 – DINÂMICA DE GENES DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS EM SISTEMA DE TRATAMENTO DE DEJETO SUÍNO**

### **Andressa Rezende Pereira<sup>(1)</sup>**

Graduada em Engenharia Ambiental e Sanitária pela Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). Mestra e doutoranda em Engenharia Ambiental na Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP).

### **Camila de Paula Dias**

Graduada em Ciências Biológicas e mestra em Engenharia Ambiental pela UFOP.

### **Aline Gomes de Oliveira Paranhos**

Graduada em Química Industrial pela UFOP. Mestra em Engenharia Química pela Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Doutoranda em Engenharia Ambiental pela UFOP.

### **Sergio Francisco de Aquino**

Bacharel/Licenciado em Química pela Universidade Federal de Viçosa (UFV). Mestre em Engenharia Hidráulica e Saneamento pela Universidade de São Paulo (USP). Doutor em Engenharia Química pelo Imperial College London. Professor adjunto do Departamento de Química (DEQUI) da UFOP.

### **Silvana de Queiroz Silva**

Graduação em Ciências Biológicas pela UFSCar. Mestra em Engenharia Hidráulica e Saneamento pela USP. Doutora em Microbiologia Ambiental pela University of Essex e Natural History Museum, Londres. Professor Adjunto III da Universidade Federal de Ouro Preto.

**Endereço<sup>(1)</sup>:** Laboratório de Biologia e Tecnologia de Microrganismos (LBTM), ICEB 2, Universidade Federal de Ouro Preto – campus Morro do Cruzeiro, Ouro Preto - MG - CEP: 35400-000 - Brasil - Tel: (32) 984279982 - e-mail: [andressa.rezende@engenharia.ufjf.br](mailto:andressa.rezende@engenharia.ufjf.br)

## **RESUMO**

O uso de antibióticos é uma prática frequente no setor agroindustrial. Estas substâncias não são totalmente absorvidas ou metabolizadas no organismo do animal, sendo excretadas na urina e fezes e consequentemente, estando presentes em resíduos e efluentes agroindustriais. O uso de antibióticos pode induzir o desenvolvimento de bactérias resistentes e genes de resistência a antibióticos (GRAs). Assim sendo, definiu-se como objetivo do presente trabalho, monitorar um sistema de tratamento de dejetos suínos com relação a alguns parâmetros físico-químicos e a presença de GRAs. O sistema é composto por dois biodigestores em série seguidos por uma lagoa facultativa. Avaliaram-se em três coletas os parâmetros DQO, SSV,  $\text{NH}_4^+$  e pH, além da presença/ausência dos genes *tetA*, *tetB*, *sul1*, *sul2*, *ermB*, *ermC*, *qnrB*, *blaTEM* e *int11* pela técnica de PCR. Observou-se que os parâmetros físico-químicos estavam em concordância com outros estudos em dejetos suínos, porém foi verificado que a retirada do lodo dos biodigestores anteriormente à segunda coleta alterou a dinâmica de remoção de matéria orgânica, representada pela DQO, e dos demais parâmetros monitorados. Os genes de resistência a antibióticos foram detectados na grande maioria das amostras, sendo que os genes *blaTEM* e *int11* estiveram ausentes nas amostras de lodo do biodigestor. Foi possível concluir que o sistema possibilita a remoção de matéria orgânica e SSV, porém mesmo nas amostras referentes à saída do tratamento foram detectados todos os genes testados, destacando-se assim a possibilidade de disseminação destes no meio ambiente.

**PALAVRAS-CHAVE:** Suinocultura, antimicrobianos, biodigestor, lagoa.

## **INTRODUÇÃO**

Nos últimos anos, o Brasil vem se destacando com relação à produção e exportação de carnes perante o cenário mundial. No ano de 2017, o país alcançou a primeira posição no ranking de exportação de carne de frango e quarta posição para exportação de carne suína (EMBRAPA, 2018).

Para garantir esta produtividade, uma série de medidas são adotadas em granjas de confinamento de animais, podendo-se destacar o uso de antibióticos. Estas substâncias podem ser utilizadas para fins terapêuticos,

controle e prevenção de doenças, e como promotores de crescimento. Atualmente no Brasil, quatorze ingredientes ativos utilizados como promotores de crescimento são permitidos (MAPA, 2018).

Sabe-se que a maioria destes compostos são pouco adsorvidos e metabolizados no organismo dos animais, sendo eliminados nas fezes e urina de forma praticamente inalterada (SARMAH; MEYER; BOXALL, 2006). Sendo assim, podem estar presentes em efluentes e no estrume de animais e, conseqüentemente, em diversos compartimentos ambientais, tais como solo, águas superficiais e subterrâneas, dependendo das suas propriedades físico-químicas.

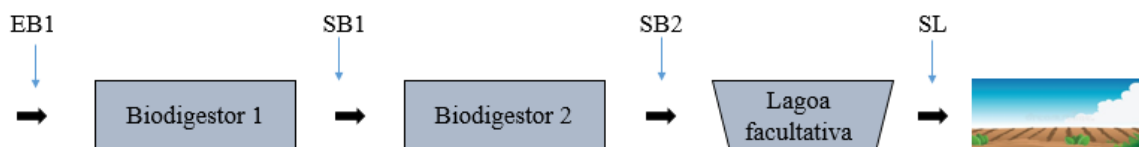
O uso de antibióticos causa uma série de efeitos em animais, seres humanos e ao meio ambiente, destacando-se o surgimento de bactérias patogênicas resistentes a antibióticos (BRAs) e genes de resistência a antibióticos (GRAs) em efluentes e resíduos agroindustriais (ZHU et al, 2013; FANG et al., 2015; LUO et al., 2017; CHENG et al., 2018).

Sabe-se que vários GRAs são detectados tanto em amostras de efluentes e resíduos brutos de suinocultura como em amostras pós-tratamento (JINDAL et al., 2006; GRAVES et al., 2011; WANG et al., 2012; ZHANG et al., 2013; TAO et al., 2014; AGGA et al., 2015; HUANG et al., 2015; WAN; CHOU, 2015; HUANG et al., 2017; PARK et al., 2018). Na literatura brasileira, verifica-se a ausência de estudos que reportem a presença de GRAs em unidades de tratamento de efluentes de suinocultura.

Sendo assim, definiu-se como objetivo deste trabalho avaliar a presença de genes de resistência a antibióticos ao longo de uma unidade de tratamento de dejetos de suinocultura.

## MATERIAIS E MÉTODOS

A coleta das amostras de dejetos de suinocultura foi feita em uma granja localizada no estado de Minas Gerais. Esta conta com uma unidade de tratamento de dejetos composta por dois biodigestores anaeróbios em série seguidos por uma lagoa facultativa, conforme Figura 1. O efluente final é aplicado no solo como fertilizante. Foram coletadas quatro amostras correspondentes a: entrada do primeiro biodigestor (EB1), saída do primeiro biodigestor (SB1), saída do segundo biodigestor (SB2) e saída da lagoa (SL). Uma amostra do lodo do primeiro biodigestor (LB1) foi coletada tanto na coleta 1 quanto na coleta 3, para análise apenas da presença de genes.



**Figura 1: Fluxograma de tratamento de efluentes utilizado na granja em estudo**

Para a caracterização físico-química do efluente, foram feitas as análises de Demanda Química de Oxigênio (DQO), Sólidos Suspensos Voláteis (SSV) e pH dos pontos acima apresentados de acordo com APHA (2005). As concentrações de  $\text{NH}_4^+$  foram obtidas por meio de um cromatógrafo de íons (Metrohm). Foram feitas três coletas distintas, sendo a coleta 1 em 01/09/2017, a coleta 2 em 11/12/2017 e a coleta 3 em 21/03/2018.

Já para a detecção dos genes de resistência a antibióticos, foi feito inicialmente um *pool* das três coletas para cada ponto de amostragem apresentado na Figura 1 (exceto para SB1), além de um *pool* das duas coletas do lodo do biodigestor. A extração de DNA destas amostras foi feita com o kit DNeasy PowerSoil (QIAGEN®), seguindo o protocolo recomendado. A quantificação de DNA nas amostras foi obtida utilizando-se um espectrofotômetro do tipo NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific) na faixa de comprimento de onda de A260/A280 nm.

Em seguida, para amplificação dos genes testados, o DNA extraído das amostras foi submetido a uma reação em cadeia de polimerase (sigla PCR do inglês *Polymerase Chain Peaction*) convencional com os *primers* apresentados na Tabela 1. Foram adicionados 5  $\mu\text{L}$  de DNA de cada amostra, 5  $\mu\text{L}$  de tampão, 0,75  $\mu\text{L}$  de dNTP, 0,75  $\mu\text{L}$  de cada *primer* (fw e rv), 0,5  $\mu\text{L}$  de Taq e 12,25  $\mu\text{L}$  de água.

**Tabela 1: Sequências de primers, temperatura de anelamento e tamanhos de amplicons para os nove genes de resistência a antibióticos testados**

Gene	Primer	Sequência (5' - 3')	Temp. de anelamento (°C)	Tamanho do amplicon (pb)
<i>tetA</i> tetraciclina <sup>1</sup>	<i>tetA</i> fw <i>tetA</i> rv	GCTACATCCTGCTTGCCTTC CATAGATCGCCGTGAAGAGG	54,6	210
<i>tetB</i> tetraciclina <sup>1</sup>	<i>tetB</i> fw <i>tetB</i> rv	GGTTGAGACGCAATCGAATT AGGCTTGGAATACTGAGTGTA	52,9	206
<i>sul1</i> sulfonamida <sup>1</sup>	<i>sul1</i> fw <i>sul1</i> rv	CGCACCGGAAACATCGCTGCAC TGAAGTTCCGCCGCAAGGCTCG	55,8	163
<i>sul2</i> sulfonamida <sup>1</sup>	<i>sul2</i> fw <i>sul2</i> rv	TCCGGTGGAGGCCGGTATCTGG CGGGAATGCCATCTGCCTTGAG	60,0	191
<i>ermB</i> eritromicina <sup>1</sup>	<i>ermB</i> fw <i>ermB</i> rv	CGTGCCTCTGACATCTATCTGA CTGTGGTATGGCGGGTAAGTT	56,8	190
<i>ermC</i> eritromicina <sup>1</sup>	<i>ermC</i> fw <i>ermC</i> rv	GAAATCGGCTCAGGAAAAGG TAGCAAACCCGTATTCCACG	57,8	272
<i>qnrB</i> quinolona <sup>1</sup>	<i>qnrB</i> fw <i>qnrB</i> rv	GCGACGTTCACTGGTTCAG TGTCCAACCTTAACGCCTTGTA	54,7	148
<i>blaTEM</i> beta-lactâmicos <sup>2</sup>	<i>blaTEM</i> fw <i>BLATEM</i> rv	GCACGAGTGGGTTACATCGA GGTCCTCCGATCGTTGTCAG	48	311
<i>intI1</i> <sup>3</sup>	<i>intI1</i> fw <i>intI1</i> rv	CCTCCCGCACGATGATC TCCACGCATCGTCAGGC	55	280

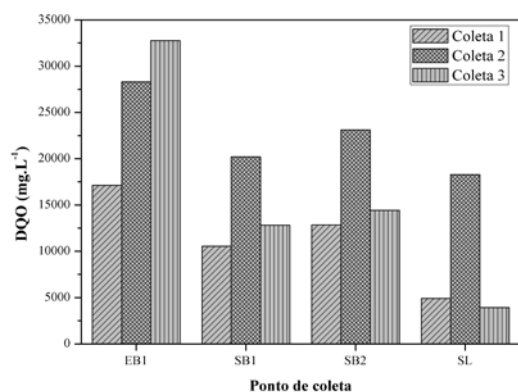
<sup>1</sup>Mao et al. (2015); <sup>2</sup>Carlson et al. (1999); <sup>3</sup>Goldstein et al. (2011)

Para verificação de presença/ausência dos genes nas amostras, os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2%, contendo SyBR Safe DNA Gel Stain em TAE 1x, tempo de corrida de 1h15min a 70V. A visualização destes foi feita sob luz ultravioleta, registrando-se a imagem em um sistema fotodocumentador.

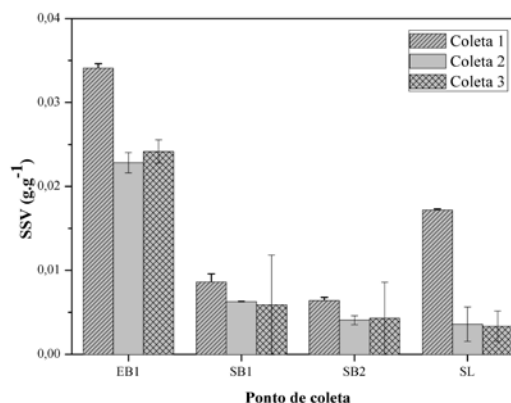
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Caracterização físico-química do efluente

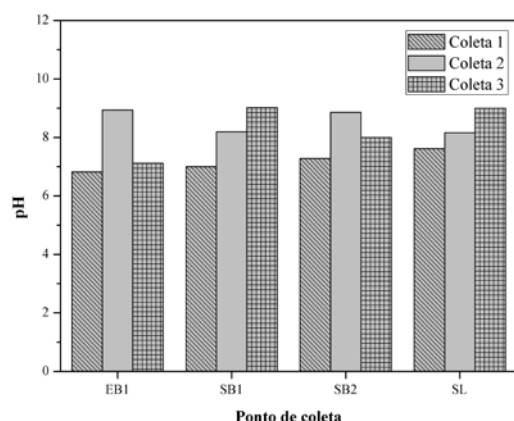
Primeiramente foi feita a caracterização físico-química do efluente em três coletas distintas, sendo amostrados os pontos de entrada do biodigestor 1 (EB1), saída do biodigestor 1 (SB1), saída do biodigestor 2 (SB2) e saída da lagoa facultativa (SL). Nas Figuras 2, 3, 4 e 5 são apresentados os resultados dos parâmetros DQO, SSV, pH e  $\text{NH}_4^+$  nos pontos de amostragem para cada coleta.



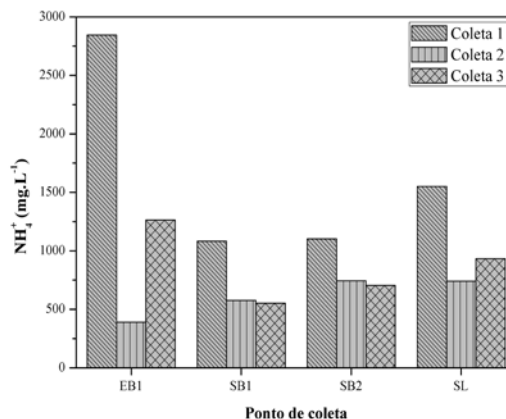
**Figura 2: Variação da DQO ao longo dos pontos de amostragem, nas três coletas**



**Figura 3: Variação de SSV ao longo dos pontos de amostragem, nas três coletas**



**Figura 4: Variação de pH ao longo dos pontos de amostragem, nas três coletas**



**Figura 5: Variação de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ao longo dos pontos de amostragem, nas três coletas**

De acordo com a Figura 2, foi possível observar uma redução da DQO, que determina o conteúdo de matéria orgânica, ao longo da unidade de tratamento. Verificou-se remoção total de 71%, 35% e 88% de DQO para as coletas 1, 2 e 3, respectivamente. A eficiência de remoção da coleta 2, que apresenta o valor mais discrepante, pode estar relacionada ao descarte de lodo dos biodigestores, ocorrido alguns dias anteriormente a essa coleta. Huang et al. (2015) avaliaram a remoção de DQO em um sistema de *wetlands* de fluxo ascendente tratando efluentes de suinocultura contendo GRAs e verificaram remoções na faixa de 49% a 92%, valores estes semelhantes ao verificado no presente estudo. Jindal et al. (2006) também verificaram a remoção de DQO de dejetos de suinocultura em um sistema composto por um decantador seguido de uma lagoa, alcançando remoções entre 85% e 91%.

No caso dos sólidos suspensos voláteis (Figura 3), que representam a biomassa do sistema, foi possível observar que apenas o biodigestor 1 já foi suficiente para uma remoção considerável da quantidade desses. A remoção total de SSV pelo sistema de tratamento foi de 49% para a coleta 1. Já para as coletas 2 e 3, observou-se uma redução de 84% e 86% para a coleta 2 e 3, respectivamente, sendo estas diferenças justificadas possivelmente pela retirada do lodo dos biodigestores antes da coleta 2. Assim como na coleta 1, Jindal et al. (2006) constataram remoções de SSV semelhantes, entre 41% e 43% na associação de um decantador à uma lagoa.

O pH, que é de fundamental importância principalmente para a etapa anaeróbia, se manteve próximo da neutralidade na maioria dos casos (6,82 a 9,02), sendo observado um pequeno aumento do mesmo após a retirada do lodo dos biodigestores. Joy et al. (2014) avaliaram o pH do dejetos suíno bruto contendo GRAs, encontrando valores de 6,3 a 7,9, conforme verificado no efluente bruto das coletas 1 e 3, analisados no presente trabalho.

A amônia (NH<sub>3</sub>) é um dos principais constituintes de dejetos suínos e é tóxica para a vida aquática. Observou-se que a remoção do íon amônio (não-tóxico) foi 46% e 30% para as coletas 1 e 3. Já a coleta 2 apresentou um acréscimo de 90% da quantidade de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, possivelmente influenciada também pela retirada de lodo dos biodigestores. Huang et al. (2015) verificaram remoções de 36% a 94% em *wetlands* de fluxo ascendente para remoção de antibióticos de dejetos suíno.

### Detecção de GRAs no dejetos ao longo do sistema de tratamento

A partir dos ensaios de PCR, foi possível analisar a presença ou ausência de determinado gene de resistência a antibióticos em 3 pontos de amostragem apresentados na Figura 1 (EB1, SB2 e SL) além do lodo do biodigestor 1 (LB1). Os resultados obtidos são apresentados a seguir, na Tabela 2.

A partir destes resultados, foi possível observar a presença dos genes *tetA* e *tetB*, referentes ao grupo de antibióticos das tetraciclina, dos genes *sul1* e *sul2*, associados às sulfonamidas, dos genes relacionados à eritromicina *ermB* e *ermC* e do gene *qnrB* (quinolonas) em todos os pontos de amostragem. O gene *blaTEM*,

associado ao grupo dos antimicrobianos beta-lactâmicos, não foi detectado apenas no lodo do biodigestor 1, assim como o elemento móvel *intI1*.

**Tabela 2: Presença de genes de resistência a antibióticos nos pontos de amostragem**

	<i>tetA</i>	<i>tetB</i>	<i>sul1</i>	<i>sul2</i>	<i>ermB</i>	<i>ermC</i>	<i>qnrB</i>	<i>blaTEM</i>	<i>intI1</i>
<b>EB1</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>LB1</b>	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<b>SB2</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>SL</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ = positivo; - = negativo

EB1 = Entrada do biodigestor 1; LB1 = Lodo do biodigestor 1; SB2 = Saída do biodigestor 2; SL = Saída da lagoa

No caso dos genes *blaTEM* e *intI1*, que não estiveram presentes no lodo do biodigestor, indica-se a necessidade de repetição da PCR para confirmar a ausência destes nas amostras. Apesar disso, pode-se inferir que GRAs podem estar associados à fase líquida desta etapa de tratamento, e por isso foram detectados apenas no efluente da saída do biodigestor.

Em estudo semelhante, Graves et al. (2011) analisaram a presença de GRAs em isolados de *E. coli* provenientes de dejetos suíno bruto e após o tratamento por lagoa, sendo verificado o resultado positivo para os genes *tetA*, *tetB*, *sul1* e *sul2* em 94,5%, 46,6%, 74,8% e 36,1%, respectivamente, dos isolados de dejetos bruto. Já no efluente da lagoa, a porcentagem de resultados positivos nos isolados foram de respectivamente 85%, 53%, 75,6% e 41,5% para *tetA*, *tetB*, *sul1* e *sul2*.

Agga et al. (2015) também testaram diversos genes similares ao presente trabalho, tais como *ermB*, *ermC*, *tetA*, *tetB* e *qnrB*, observando-se que em 75% ou mais das amostras de dejetos suínos brutos os genes *ermB*, *ermC*, *tetA* e *tetB* estiveram presentes. Já o gene *qnrB* esteve ausente em todas as amostras testadas na literatura.

Os GRAs *blaTEM*, *sul1*, *sul2* e *tetA* também foram detectados em diversas etapas de sistemas de tratamento de efluente de suinocultura estudados por Tao et al. (2014), inclusive no efluente final. Vale destacar que nenhum dos sistemas empregava a etapa de desinfecção do efluente, contando apenas com unidades de remoção física e biológica.

Huang et al. (2017) monitoraram um sistema de alagados construídos, também conhecidos como *wetlands*, tratando dejetos suíno durante 90 dias e verificaram a presença de *intI1* tanto no efluente bruto quanto no efluente tratado. Wolters et al. (2016) também detectaram *intI1*, *sul1*, *sul2* e *tetA*, em várias amostras de dejetos suíno bruto e em amostras provenientes de biodigestores, como no presente estudo.

Tendo em vista os resultados observados na Tabela 2, não é possível mensurar se o sistema de tratamento foi capaz de reduzir ou aumentar a quantidade de GRAs no decorrer das unidades, porém foi detectada a presença de todos os genes no efluente final, indicando assim a possibilidade de disseminação desses para outras matrizes ambientais.

## CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, foi possível verificar a dinâmica de alguns parâmetros físico-químicos da unidade de tratamento em estudo e a influência da retirada do lodo dos biodigestores na eficiência de remoção de DQO, SSV e  $\text{NH}_4^+$ . O sistema de tratamento em estudo foi capaz de remover matéria orgânica, representada pela DQO, além da redução da quantidade de SSV. Já o íon amônio apresentou-se em concentração ainda elevada no efluente tratado. O pH manteve-se dentro do esperado, sendo este de fundamental importância principalmente para a etapa anaeróbia do sistema.

Com relação à detecção de GRAs nas amostras de dejetos suíno, foi possível observar a presença dos genes testados na maioria dos pontos de coleta, exceto para *blaTEM* e *intI1* no lodo do biodigestor 1. Assim,



destaca-se a possibilidade de disseminação de resistência a antimicrobianos no meio ambiente, já que o efluente final do sistema apresentou todos os genes testados e este é utilizado como fertilizante nas plantações da fazenda.

## AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (código de financiamento nº001), à Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico (CNPq), à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e à Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), pelo financiamento do projeto e auxílio concedido.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGGA, G. E. et al. Antimicrobial-Resistant Bacterial Populations and Antimicrobial Resistance Genes Obtained from Environments Impacted by Livestock and Municipal Waste. **Plos One**, v. 10, n. 7, p.1-19, 21 jul. 2015.
2. APHA. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 21. ed. Washington: American Public Health Association, Water Environmental Federation, 2005.
3. CHENG, D. L. et al. Bioprocessing for elimination antibiotics and hormones from swine wastewater. **Science of the Total Environment**, v. 621, p.1664-1682, abr. 2018.
4. EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/estatisticas>>. Acesso em: 01 ago. 2018.
5. FANG, H. et al. Prevalence of Antibiotic Resistance Genes and Bacterial Pathogens in Long- Term Manured Greenhouse Soils As Revealed by Metagenomic Survey. **Environmental Science & Technology**, v. 49, n. 2, p.1095-1104, 2015.
6. GOLDSTEIN, C. et al. Incidence of class 1 and 2 integrases in clinical and commensal bacteria from livestock, companion animals, and exotics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 3, p. 723-726, 2001.
7. GRAVES, A. K. et al. Distribution of ten antibiotic resistance genes in *E. coli* isolates from swine manure, lagoon effluent and soil collected from a lagoon waste application field. **Folia Microbiologica**, v. 56, n. 2, p.131-137, mar. 2011.
8. HUANG, X. et al. Performance of vertical up-flow constructed wetlands on swine wastewater containing tetracyclines and tet genes. **Water Research**, v. 70, p.109-117, mar. 2015.
9. HUANG, X. et al. Removal of antibiotics and resistance genes from swine wastewater using vertical flow constructed wetlands: Effect of hydraulic flow direction and substrate type. **Chemical Engineering Journal**, v. 308, p.692-699, jan. 2017.
10. JINDAL, A. et al. Antimicrobial Use and Resistance in Swine Waste Treatment Systems. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 12, p.7813-7820, 13 out. 2006.
11. LUO, G. et al. Antibiotic Resistance Genes and Correlations with Microbial Community and Metal Resistance Genes in Full-Scale Biogas Reactors As Revealed by Metagenomic Analysis. **Environmental Science & Technology**, v. 51, n. 7, p.4069-4080, 16 mar. 2017.
12. MAO, D. et al. Prevalence and proliferation of antibiotic resistance genes in two municipal wastewater treatment plants. **Water Research**, v. 85, p. 458-466, 2015.
13. MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/aditivos>>. Acesso em: 01 ago. 2018.
14. PARK, J. et al. Spread of multidrug-resistant *Escherichia coli* harboring integron via swine farm waste water treatment plant. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 149, p.36-42, mar. 2018.
15. SARMAH, A. K.; MEYER, M. T.; BOXALL, A. B. A. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. **Chemosphere**, v. 65, n. 5, p.725-759, out. 2006.
16. TAO, C. et al. Evaluation of five antibiotic resistance genes in wastewater treatment systems of swine farms by real-time PCR. **Science of the Total Environment**, v. 496, p.116-121, out. 2014.
17. WAN, M.; CHOU, C. Class 1 Integrons and the Antiseptic Resistance Gene (*qacEAI*) in Municipal and Swine Slaughterhouse Wastewater Treatment Plants and Wastewater – Associated Methicillin-Resistant

- Staphylococcus aureus*. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 12, n. 6, p.6249-6260, 2 jun. 2015.
18. WANG, L. et al. Persistence of Resistance to Erythromycin and Tetracycline in Swine Manure During Simulated Composting and Lagoon Treatments. **Microbial Ecology**, v. 63, n. 1, p.32-40, 2012.
  19. ZHANG, Y. et al. Occurrence of antimicrobials and antimicrobial resistance genes in beef cattle storage ponds and swine treatment lagoons. **Science of the Total Environment**, v. 463-464, p.631-638, out. 2013.
  20. ZHU, Y. et al. Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 9, p.3435-3440, 11 fev. 2013.