

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Deborah de Oliveira Santoro Carvalho

**CARACTERIZAÇÃO DO METAGENOMA E DO RESISTOMA MICROBIANO DE
EFLUENTE HOSPITALAR E DE SUAS POSSÍVEIS IMPLICAÇÕES NA
VIGILÂNCIA AMBIENTAL EM SAÚDE**

Rio de Janeiro

2016

Deborah de Oliveira Santoro Carvalho

**CARACTERIZAÇÃO DO METAGENOMA E DO RESISTOMA MICROBIANO DE
EFLUENTE HOSPITALAR E DE SUAS POSSÍVEIS IMPLICAÇÕES NA
VIGILÂNCIA AMBIENTAL EM SAÚDE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Vigilância Sanitária

Orientadora: Maysa Beatriz Mandetta Clementino

Rio de Janeiro

2016

Catologação na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Carvalho, Deborah de Oliveira Santoro

Caracterização do metagenoma e do resistoma microbiano de efluente hospitalar e de suas possíveis implicações na Vigilância Ambiental em Saúde / Deborah de Oliveira Santoro Carvalho. Rio de Janeiro: INCQS / FIOCRUZ, 2016.

122 f., il.

Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2016.

Orientadora: Maysa Beatriz Mandetta Clementino

1. Resíduos de Serviços de Saúde. 2. Esgotos. 3. Pseudomonas aeruginosa. 4. Metagenômica. 5. Vigilância Sanitária Ambiental. I. Título

Metagenomic characterization and microbial resistome from hospital effluent and its possible implications for environmental health surveillance

Deborah de Oliveira Santoro Carvalho

**CARACTERIZAÇÃO DO METAGENOMA E DO RESISTOMA MICROBIANO DE
EFLUENTE HOSPITALAR E DE SUAS POSSÍVEIS IMPLICAÇÕES NA
VIGILÂNCIA AMBIENTAL EM SAÚDE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Vigilância Sanitária

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Célia Maria Carvalho Pereira Araújo Romão (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Ivano Raffaele Victorio de Filippis Capasso (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Danielle Frias Ribeiro Bisaggio (Doutor)
Instituto Federal do Rio de Janeiro

Maysa Beatriz Mandetta Clementino (Doutor) – Orientador
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Dedico essa conquista especialmente
ao meu esposo Rodrigo, companheiro e
amigo de todas as horas, aos meus pais,
à minha irmã e ao meu irmão.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente dedico este trabalho a Deus por mais uma etapa vencida e pelo objetivo alcançado. Obrigada, meu Deus, por ter me dado saúde e uma belíssima família como suporte de minha vida. Para sempre serei grata.

Aos meus adorados pais, pelos exemplos de luta, perseverança, amor, dedicação, zelo e carinho, por todos os dias de minha vida.

Ao meu pai, trabalhador, vencedor e exemplo na minha vida.

À minha mãe, guerreira, amorosa, por sempre estar ao meu lado, me incentivando e me apoiando.

Vocês sempre serão exemplos a serem seguidos. Amo vocês.

À Rodrigo, meu esposo, por todo apoio e compreensão.

À minha orientadora Maysa Beatriz Mandetta Clementino, pelos ensinamentos, pela paciência, pela amizade e pela oportunidade.

À Priscila Nóbrega, pela força que me deu quando precisei, pela sua amizade que prezo tanto, muito obrigada, minha grande amiga. Você é uma pessoa muito especial. Continue sendo essa pessoa cheia de determinação e inteligência.

À Coordenação da Pós-Graduação em Vigilância Sanitária.

À Fundação Oswaldo Cruz, por me oferecer tantos recursos e oportunidades para executar os trabalhos e contribuir para a ciência.

Agradeço a Subsecretaria de Gestão das Bacias Hidrográficas - Rio-Águas, Prefeitura do Rio de Janeiro e ao Hospital Municipal Raphael de Paula Souza que gentilmente autorizou a coleta das águas residuais.

Aos colegas do Laboratório de Micro-organismos de Referência, meu muito obrigado. Em especial ao Teko, pelos conhecimentos compartilhados, por todas as dúvidas resolvidas, pelas informações preciosas e pelo auxílio nos experimentos e nas análises dos resultados.

Ao pesquisador Dr. Rodolpho Albano pela ajuda nos experimentos e por toda contribuição na análise dos resultados.

Aos professores membros da Banca Examinadora, pela gentileza em participar da banca, pelo tempo e atenção que dispensaram ao meu trabalho e por terem contribuído com seus valiosos comentários, observações, críticas e sugestões.

Aos colegas de trabalho do IFRJ.

Por fim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e que não têm seus nomes presentes nestes agradecimentos, o meu muito obrigada!

RESUMO

Efluentes hospitalares representam grande risco para a saúde pública, devido a sua capacidade de disseminar patógenos e genes de resistência no meio ambiente. *Pseudomonas aeruginosa* é um dos principais micro-organismos recuperados desse efluente e, devido à sua resistência intrínseca a múltiplas drogas e de genes de resistência presentes em elementos móveis, possui a capacidade de colonizar vários ambientes. O objetivo principal deste estudo foi determinar a estrutura taxonômica e o resistoma de comunidades microbianas e suas alterações no resíduo líquido tratado de uma estação de tratamento de esgoto hospitalar (ETEH) na cidade do Rio de Janeiro. Cinquenta e sete isolados de *P. aeruginosa* obtidos a partir da ETEH (n=29 do afluente e n=28 do efluente) foram analisados quanto à susceptibilidade aos antimicrobianos, pelo método de difusão de discos. Os isolados apresentaram menor susceptibilidade aos antimicrobianos ticarcilina/ácido clavulânico (48,3%), aztreonam (44,8%) e gentamicina (27,5%) no afluente e ao aztreonam (35,7%), ticarcilina/ácido clavulânico (28,6%), gentamicina (14,3%) e meropenem (14,3%) no efluente. Quarenta e quatro vírgula oitenta e três por cento dos isolados de *P. aeruginosa* do afluente foram classificados como multidroga resistente (MDR \geq 3 classes) enquanto 21,43% dos isolados do efluente apresentaram perfil MDR. A diversidade bacteriana foi analisada pelo sequenciamento de nova geração da região V4 do 16S rDNA e o resistoma microbiano através do sequenciamento metagenômico por *shotgun*. As sequências foram analisadas pelos programas MG-RAST, ARDB e CARD. O efluente hospitalar revelou maior abundância do filo Proteobacteria nas duas bibliotecas (afluente e efluente da ETEH), sendo a maioria das sequências pertencentes à classe Gammaproteobacteria. Os filos Firmicutes e Bacteroidetes foram prevalentes no afluente. A composição do resistoma revelou 33 genes de resistência aos antibióticos no afluente e 29 no efluente. Destes, 75,8% (afluente) e 79,3% (efluente) foram de genes envolvidos em sistemas de efluxo. A resistência à ticarcilina/ácido clavulânico, aztreonam e gentamicina nos isolados de *P. aeruginosa* pode ter sido mediada por bombas de efluxo e/ou por genes de resistência presentes em elementos móveis, também revelados na análise do resistoma. Nossos resultados nos permitem concluir que a abordagem da metagenômica foi essencial na determinação da estrutura taxonômica e resistoma microbiano e suas alterações, antes e pós-tratamento do

efluente hospitalar; e que o descarte de resíduos líquidos provenientes de hospitais, ainda que tratados, contribuem para a disseminação de bactérias resistentes e genes de resistência nos ambientes aquáticos. Finalmente, esses dados poderão contribuir com a Vigilância Sanitária Ambiental no que se refere ao desenho de ações preventivas aos impactos negativos desses efluentes no ambiente e na saúde pública.

Palavras-chave: Efluente hospitalar. *Pseudomonas aeruginosa*. Diversidade bacteriana. Metagenômica funcional. Resistoma.

ABSTRACT

Hospital effluents represent great risk to public health due to its ability to spread pathogens and resistance genes in the environment. *Pseudomonas aeruginosa* is one of the main microorganisms recovered from these effluents and due to its inherent multidrug resistance and resistance genes in transposable elements and their ability to colonize several environments. The main aim of this study was to determine the taxonomic structure and the resistome of microbial communities and their variations in the treated liquid waste from hospital wastewater treatment plant located in Rio de Janeiro city. Fifty-seven isolates of *P. aeruginosa* from the hospital wastewater treatment plant - HWTP (n = 29 of influent and n = 28 of effluent) were analyzed for antimicrobial susceptibility by disc diffusion method. The isolates showed decreased susceptibility to antimicrobial ticarcillin/clavulanic acid (48.3%), aztreonam (44.8%) and gentamicin (27.5%) in the influent and aztreonam (35.7%), ticarcillin/clavulanic acid (28.6%), gentamicin (14.3%) and meropenem (14.3%) in the effluent. Forty-four and eighty-three percent of *P. aeruginosa* isolates from influent were multidrug-resistant (MDR \geq 3 antibiotic classes) while 21.43% of the effluent isolates showed MDR profile. Bacterial diversity and microbial resistome were analyzed by the next-generation sequencing for V4 region of the 16S rDNA metagenomic shotgun sequencing, respectively. The sequences obtained were deduced by software MG-RAST, ARDB and CARD. The hospital effluent revealed higher abundance of Proteobacteria phylum in the two libraries (influent and effluent HWTP), the majority of the sequences belong to Gammaproteobacteria class. The Phyla Firmicutes and Bacteroidetes were prevalent in influent. The composition of resistome revealed 33 genes (influent) and 29 genes (effluent) of antibiotic resistance. Of these, 75.8% (influent) and 79.3% (effluent) were genes involved in efflux systems. The resistance to ticarcillin/clavulanic acid, aztreonam, gentamicin in the *P. aeruginosa* isolates may have been mediated by efflux pumps and/or resistance genes present in mobile elements, also revealed in the resistome analysis. Our results allow us to conclude that metagenomic approach was essential in the determination of the taxonomic structure, the microbial resistome, and their behavior, before and after treatment of hospital wastewater; and that hospital wastewater discharge, even treated, can provide the spread of resistant bacteria and resistance genes into aquatic environments. Finally, these data could also contribute

for Environmental Health Surveillance regarding the design of preventive actions to the negative impacts of these effluents on environment and on public health.

Key-words: Hospital effluent. *Pseudomonas aeruginosa*. Bacterial Diversity. Functional metagenomic. Resistome.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Illumina. Preparo da amostra, fixação do DNA e amplificação.....	33
Figura 2	Illumina. Sequenciamento por síntese.....	34
Figura 3	Illumina. Captura de imagem, leitura de sequências e alinhamento dos dados.....	34
Figura 4	(A) Organização estrutural dos genes do RNA ribossomal em bactérias e (B) Esquema do gene <i>rrs</i> 16S rRNA com indicação das zonas variáveis e conservadas.....	36
Figura 5	Vista da estação de tratamento de esgoto do Hospital Municipal Raphael de Paula Souza.....	42
Figura 6	Esquema da estação de tratamento de esgoto do Hospital Municipal Raphael de Paula Souza.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Iniciadores para amplificação do gene <i>rrs</i> 16S RNA utilizados neste estudo.....	45
Tabela 2	Sequência dos iniciadores <i>reverse</i> (806R) utilizados para cada amostra	48
Tabela 3	Parâmetros físicos e químicos dos pontos de coleta da ETEH.....	51
Tabela 4	Susceptibilidade dos isolados de <i>P. aeruginosa</i> do afluente e do efluente da ETEH	54
Tabela 5	Relação das <i>orfs</i> , genes de resistência e identidade bacteriana no afluente hospitalar gerados no banco de dados CARD.....	66
Tabela 6	Relação das <i>orfs</i> , genes de resistência e identidade bacteriana no efluente hospitalar geradas no banco de dados CARD.....	68

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Perfil de susceptibilidade dos isolados de <i>P. aeruginosa</i> do afluente da ETEH.....	53
Gráfico 2	Perfil de susceptibilidade dos isolados de <i>P. aeruginosa</i> do efluente da ETEH.....	53
Gráfico 3	Percentual de resistência dos isolados de <i>P. aeruginosa</i> frente às classes de antimicrobianos.....	55
Gráfico 4	Distribuição dos domínios da vida no afluente e efluente da ETEH.....	56
Gráfico 5	Abundância taxonômica do afluente da ETEH.....	56
Gráfico 6	Abundância taxonômica do efluente da ETEH.....	57
Gráfico 7	Distribuição dos filos no afluente e efluente da ETEH.....	57
Gráfico 8	Distribuição taxonômica de classes do filo Proteobacteria presente no afluente e efluente da ETEH.....	58
Gráfico 9	Distribuição taxonômica de ordens da classe Gammaproteobacteria presente no afluente e efluente da ETEH.....	58
Gráfico 10	Distribuição taxonômica de classes do filo Firmicutes presente no afluente e efluente da ETEH.....	59
Gráfico 11	Distribuição taxonômica de famílias da ordem Clostridiales presente no afluente e efluente da ETEH.....	60
Gráfico 12	Distribuição taxonômica de classes do filo Bacteroidetes presente no afluente e efluente da ETEH.....	60
Gráfico 13	Distribuição taxonômica de famílias da ordem Bacteroidales presente no afluente e efluente da ETEH.	61
Gráfico 14	Árvore filogenética indicando os filos e suas classes encontradas no afluente e efluente da ETEH.....	62
Gráfico 15	<i>Heatmap</i> mostrando o agrupamento dos filos baseado nas semelhanças taxonômicas das sequências.....	63
Gráfico 16	Curvas de rarefação extraídas da plataforma MG-RAST, mostrando a disposição dos <i>reads</i> do sequenciamento metagenômico entre as 2 amostras analisadas.....	64
Gráfico 17	<i>Orf</i> referentes a genes de resistência aos antibióticos no afluente gerados no banco de dados CARD.....	65

Gráfico 18	<i>Orf</i> referentes a genes de resistência aos antibióticos no efluente gerados no banco de dados CARD.....	67
------------	---	----

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

ABC - ATP-binding cassette superfamily
ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas
AIDS - Acquired Immunodeficiency Syndrome (síndrome da imunodeficiência adquirida)
ampC - adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
Anvisa - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOX - compostos orgânicos adsorvíveis
ARDB - Antibiotic Resistance Genes DataBase
ARG - Antibiotic resistance genes (genes de resistência a antibióticos)
Art. - Artigo
ATCC - American Type Culture Collection
BHI - Brain Heart Infusion
BLAST - Basic Local Alignment Search Tool
°C - Grau Celsius
CARD - Comprehensive Antibiotic Resistance Database
CCD - dispositivo de carga acoplada
CDC - Código de Defesa do Consumidor
CLSI - Clinical and Laboratory Standard Institute
cm - centímetro
CNES - Cadastro Nacional de Estabelecimentos de Saúde
CONAMA - Conselho Nacional de Meio Ambiente
CRF - MG - Conselho Regional de Farmácia de Minas Gerais
DMT - drug metabolite transporter
DNA - ácido desoxirribonucléico
dNTPs - deoxinucleotídeo trifosfato
EDTA - ácido etilenodiaminotetracético
ESBL - Extended Spectrum Beta-Lactamases (beta-lactamases de espectro estendido)
ETEH - Estação de Tratamento de Esgoto Hospitalar
FIOCRUZ - Fundação Osvaldo Cruz
g - grama
GO - Goiás
HCl - ácido clorídrico
HWTP - Hospital Wastewater Treatment Plant
INCQS - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
KCl - cloreto de potássio
L - litro
LPS - lipopolissacarídeo
MATE - multidrug and toxic compound extrusion
Mex - multidrug efflux pump
MFS - major facilitator superfamily
MDR - multi drug resistant (multidroga resistente)
mg - miligrama
MgCl₂ - cloreto de magnésio
MG-RAST - Metagenomics Rapid Annotation using Subsystem Technology
MgSO₄ - sulfato de magnésio
mL - mililitro
MLST - Multilocus Sequencing Typing Analysis

mM - milimolar
mm - milímetro
mS - miliSiemens
nº - número
NA₂ EDTA - EDTA dissódico
NaOH - Hidróxido de sódio
NBR - Norma Brasileira Regulamentadora
(NH₄)₂SO₄ - sulfato de amônio
ng - nanograma
NGS - Next Generation Sequencing
O - Oeste
OD - oxigênio dissolvido
OMS - Organização Mundial de Saúde
orf - opening reading frame
pb - pares de base
PBS - Phosphate Buffered Saline (tampão fosfato em salina)
PCR - Polymerase Chain Reaction (reação em cadeia pela polimerase)
PDTIS - Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde
pH - potencial de hidrogênio
pmol - picomol
ppm - parte por milhão
q.s.p - quantidade suficiente para
RDC - Resolução da Diretoria Colegiada
RDP - Ribosomal Database Project
rDNA - DNA ribossomal
RGI - Resistance Gene Identifier
RJ - Rio de Janeiro
RNA - ácido ribonucléico
RND - resistance-nodulation-cell division superfamily
RSS - Resíduos de Serviços de Saúde
***rrs* 16S rRNA** - gene *rrs* 16S do ácido ribonucléico ribossomal
S - Sul
SC - Santa Catarina
SDS - sodium dodecyl sulfate (dodecil sulfato de sódio)
SMMA - Secretaria Municipal de Meio Ambiente
SMR - small multidrug resistance family
SMS - Secretaria Municipal de Saúde
SNVA - Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica e Ambiental em Saúde
SSU rRNA - small subunit ribosomal RNA (subunidade menor do rRNA)
SUS - Sistema Único de Saúde
TBE - Tris-borato EDTA
UERJ - Universidade do Estado do Rio de Janeiro
UI - Unidade Internacional
UNT - Unidade Nefelométrica de Turbidez
µg - micrograma
µL - microlitro
µM - micromolar
XDR - extensively drug-resistant (extensivamente droga resistente)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1. VIGILÂNCIA EM SAÚDE AMBIENTAL.....	19
1.2. RESÍDUOS DE SERVIÇOS DE SAÚDE.....	21
1.3. EFLUENTES HOSPITALARES.....	22
1.4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24
1.5. RESISTOMA.....	25
1.6. METAGENÔMICA E METAGENÔMICA FUNCIONAL.....	29
1.7. NOVAS TECNOLOGIAS DE SEQUENCIAMENTO.....	30
1.8. GENE <i>rrs</i> 16S rRNA COMO MARCADOR MOLECULAR.....	35
1.9. SITUAÇÃO ATUAL.....	36
2. RELEVÂNCIA.....	39
3. OBJETIVOS.....	41
3.1. GERAL.....	41
3.2. ESPECÍFICOS.....	41
4. METODOLOGIA.....	42
4.1. AMBIENTE SELECIONADO PARA O ESTUDO.....	42
4.1.1. Hospital Municipal Raphael de Paula Souza.....	42
4.2. AMOSTRAS.....	43
4.3. PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS.....	43
4.4. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA DE <i>P. aeruginosa</i>	43
4.5. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE <i>P. aeruginosa</i>	44
4.5.1. Extração e purificação do DNA genômico.....	44
4.5.2. Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)	44
4.6. SEQUENCIAMENTO.....	45
4.7. SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS.....	46
4.8. PRESERVAÇÃO DOS ISOLADOS.....	47
4.9. EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO TOTAL	47
4.10. BIBLIOTECA DO GENE <i>rrs</i> 16S rRNA.....	48
4.10.1. Amplificação do gene <i>rrs</i> 16S rRNA.....	48
4.10.2. Purificação do DNA e Sequenciamento.....	49
4.11. SELEÇÃO FUNCIONAL DE GENES DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS.....	49

4.11.1. Biblioteca genômica (<i>Shotgun</i>) e Sequenciamento.....	49
4.11.2. Identificação de genes de resistência a antimicrobianos.....	50
5. RESULTADOS.....	51
5.1. PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS.....	51
5.2. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA DE <i>P. aeruginosa</i>	52
5.3. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE <i>P. aeruginosa</i>	52
5.4. AVALIAÇÃO DOS PERFIS DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS.....	52
5.5. CARACTERIZAÇÃO DO METAGENOMA DO AFLUENTE E EFLUENTE DA ETEH.....	56
5.5.1. ANÁLISE DOS DADOS GERADOS A PARTIR DA AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>rrs</i> 16S RIBOSSOMAL.....	56
5.5.1.1. Diversidade taxonômica.....	56
5.5.1.2. Curva de rarefação.....	63
5.6. ANOTAÇÃO FUNCIONAL DAS COMUNIDADES MICROBIANAS.....	64
6. DISCUSSÃO.....	69
7. CONCLUSÃO.....	78
REFERÊNCIAS.....	80
ANEXO A - MEIOS DE CULTURA.....	98
ANEXO B - PROVAS BIOQUÍMICAS.....	101
ANEXO C - MÉTODO DE PRESERVAÇÃO.....	105
ANEXO D - PREPARO DE TAMPÕES E GEL.....	106
APÊNDICE A - ARTIGO PUBLICADO NA JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY (2015).....	107

1. INTRODUÇÃO

A crise ambiental global tem obrigado todos os setores da sociedade a rever conceitos e valores, revelado conflitos de interesse e evidenciado a insustentabilidade do modelo de desenvolvimento (LEFF, 2002).

A destruição de ecossistemas, a contaminação crescente da atmosfera, solo e água, bem como o aquecimento global são exemplos dos impactos das atividades humanas sobre o ambiente. Essa conjunção de fatores torna o Brasil e alguns outros países em desenvolvimento singulares na configuração de riscos à saúde, advindos de condições ambientais adversas (BARCELLOS; QUITÉRIO, 2006).

Saúde e ambiente são consideradas dimensões inseparáveis que necessitam de uma política nacional efetiva capaz de viabilizar as investigações da situação ambiental por meio de indicadores efetivos, através da vigilância ambiental em saúde (PEREIRA; LACERDA; MARQUES, 2010).

Desta forma, o setor saúde tem sido solicitado a participar mais ativamente desse debate, seja pela sua atuação tradicional no cuidado de populações atingidas pelos riscos ambientais ou pela valorização das ações de prevenção e promoção de saúde (FRANCO NETTO; CARNEIRO, 2002; AUGUSTO, 2003). Essa tendência tem apontado a necessidade de superação do modelo de vigilância à saúde baseado em agravos e a incorporação da temática ambiental nas práticas de saúde pública (BARCELLOS; QUITÉRIO, 2006).

Diversos programas, planos e práticas propostos pelo setor saúde envolvem aspectos ambientais. Historicamente as ações de saneamento têm concentrado maior interesse do setor entre as intervenções de saúde de cunho ambiental. É bastante conhecida e amplamente divulgada a relação entre a saúde e a provisão de água em quantidade e qualidade apropriadas, bem como seu respectivo destino pós-utilização (esgotamento) (BARCELLOS; QUITÉRIO, 2006).

1.1. VIGILÂNCIA EM SAÚDE AMBIENTAL

A Vigilância Sanitária é definida pela Lei Orgânica da Saúde como “um conjunto de ações” capaz de eliminar, diminuir, ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde, abrangendo: o controle de bens de consumo que, direta ou indiretamente, se relacionem com a saúde, compreendidas todas as etapas e processos, da produção ao consumo; e o controle da prestação de serviços que se relacionam direta ou indiretamente com a saúde (BRASIL, 1990a). Além disso, esse “conjunto de ações” engloba um leque de atividades diversificadas, complexas, de natureza preventiva, que devem ser executadas de maneira articulada, ordenada e sempre voltadas para a racionalidade da eliminação, controle ou prevenção de riscos sanitários que possam vir a provocar danos à saúde de consumidores de produtos e serviços de interesse da saúde, bem como do meio ambiente.

O uso da expressão “eliminar, diminuir ou prevenir” demonstra forte conotação relacionada ao poder de polícia da Vigilância Sanitária ao estabelecer proibições e restrições. Entretanto, o fato de “intervir nos problemas” demonstra o papel social e interventor que o Estado deve apresentar, sendo responsável pela proteção da saúde da população, à medida que desenvolve ações que controlem os riscos sanitários causadores de danos e agravos à saúde (SHUQAIR, 1996).

Dentre as inúmeras ações da Vigilância Sanitária destacamos aquelas voltadas às condições e padrões de lançamento de efluentes de serviços de saúde, atualizadas no Parecer Técnico nº 003/2011 do Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde (BRASIL, 2011a). As considerações deste Parecer reforçam a importância da Vigilância Sanitária no controle das infecções hospitalares, e em continuidade a isto, sua interferência na preservação do meio ambiente no tocante à manutenção da qualidade de recursos hídricos (BRASIL, 2002).

A Vigilância em Saúde Ambiental é definida como um conjunto de ações que proporciona o conhecimento e detecção de qualquer mudança nos fatores determinantes e condicionantes do meio ambiente que interferem na saúde humana,

com a finalidade de identificar as medidas de prevenção e controle dos fatores de risco ambientais relacionados às doenças ou outros agravos à saúde (FRANCO NETTO; CARNEIRO, 2002). Destacamos alguns de seus objetivos, como: a) produzir, integrar, processar e interpretar informações, visando a disponibilizar ao Sistema Único de Saúde (SUS) instrumentos para o planejamento e execução de ações relativas às atividades de promoção da saúde e de prevenção e controle de doenças relacionadas ao meio ambiente; b) estabelecer os principais parâmetros, atribuições, procedimentos e ações relacionadas à vigilância ambiental em saúde nas diversas instâncias de competência; c) identificar os riscos e divulgar as informações referentes aos fatores ambientais condicionantes e determinantes de doenças e outros agravos à saúde; d) promover, junto aos órgãos afins ações de proteção da saúde humana relacionadas ao controle e recuperação do meio ambiente; e e) conhecer e estimular a interação entre saúde, meio ambiente e desenvolvimento, visando ao fortalecimento da participação da população na promoção da saúde e qualidade de vida (BARCELLOS; QUITÉRIO, 2006).

Para o desenvolvimento da Vigilância Ambiental em Saúde, alguns instrumentos e métodos de vigilância e controle são necessários, como: Epidemiologia ambiental que utiliza os efeitos adversos à saúde relacionados à exposição a fatores de risco ambientais; Avaliação e gerenciamento de risco; Indicadores de saúde e ambiente; Sistemas de Informação de Vigilância Ambiental em Saúde; e Estudos e pesquisas (BRASIL, 2002).

É importante ressaltar que os riscos ambientais desconhecem fronteiras políticas e econômicas. No caso de áreas contaminadas, como rios poluídos ou cidades com elevada contaminação do ar, água e solo não existem estratégias de isolamento ou barreiras que impeçam, de forma factível, a exposição das pessoas aos riscos presentes, o que exige políticas intersetoriais de âmbito nacional ou até mesmo de âmbito internacional. Por isso, o novo campo da vigilância ambiental em saúde precisa ser construído por meio de conceitos e práticas de caráter interdisciplinar e intersetorial (BRASIL, 2002).

Nesse sentido, a qualidade da água para consumo humano, contaminantes ambientais, qualidade do ar, qualidade do solo, notadamente em relação ao manejo dos resíduos tóxicos e perigosos, os desastres naturais e acidentes com produtos perigosos, são objetos de monitoramento dessa vigilância, seja de forma direta e

contínua ou por meio de ações em parceria com outros órgãos (FRANCO NETTO; CARNEIRO, 2002).

1.2. RESÍDUOS DE SERVIÇO DE SAÚDE

Os Resíduos de Serviços de Saúde (RSS) são aqueles gerados em hospitais, clínicas, ambulatórios e similares e são definidos como “todos resíduos resultantes de atividades exercidas nos serviços de atendimento à saúde humana ou animal...dentre outros similares”, segundo Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA (BRASIL, 2005) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa (BRASIL, 2004). Esses resíduos apresentam como principal característica o potencial de serem contaminados com agentes patogênicos (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 1989). Eles representam em torno de 1% da quantidade total de resíduos gerados no país e têm um papel importante no cenário da saúde pública por serem fonte potencial de organismos patogênicos; pelo caráter infectante de alguns de seus componentes e pela heterogeneidade de sua composição, que pode conter substâncias tóxicas, radioativas, perfurantes e cortantes (SILVA, 2005).

De acordo com Silveira e Monteggia (2003), as atividades desenvolvidas nos serviços de saúde resultam na geração de diferentes tipos de resíduos, sólidos e líquidos, e os impactos gerados pelos mesmos dependem da forma de gerenciamento dentro e fora da instituição, podendo provocar modificações no meio ambiente, mesmo quando presentes em concentrações mínimas.

A geração de resíduos pelas diversas atividades humanas constitui-se atualmente em um grande desafio a ser enfrentado pelas administrações municipais, sobretudo nos grandes centros urbanos (BRASIL, 2006). Os RSS, por caracterizarem um desequilíbrio de caráter epidemiológico, com potencial de infecção altamente conhecido, tornaram-se um assunto de interesse mundial no impacto ambiental gradativamente acumulado (SOUZA, 2006).

Entre os diversos tipos de RSS, ressaltamos o esgoto hospitalar, que embora represente uma pequena parcela dos resíduos totais, ocupa uma posição de extrema importância pela capacidade que possuem de infectar e contaminar o meio ambiente, impactar a saúde humana e gerar implicações na saúde pública. Os problemas

associados a esses resíduos líquidos hospitalares transcendem o campo técnico-sanitário e envolvem aspectos sociais, econômicos, políticos e ambientais, entre outros (LA ROSA, 2000).

1.3. EFLUENTES HOSPITALARES

Os efluentes hospitalares caracterizam-se como possíveis veículos de disseminação de inúmeros micro-organismos patogênicos como vírus, bactérias, fungos, protozoários, que ocasionam muitas doenças com implicações em saúde pública (VECCHIA et al, 2009).

Uma avaliação de efluentes do Complexo Universitário Hospitalar de Limoges, na França, demonstrou que, embora a contagem total de micro-organismos deste efluente seja menor do que a observada em esgotos domésticos, estes são, em geral, multidroga resistentes (MDR) (LEPRAT, 1999). Em muitos casos, os patógenos encontrados no meio ambiente são os mesmos agentes etiológicos multirresistentes, das infecções hospitalares. *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* são micro-organismos de grande interesse por estarem geralmente envolvidos na infecção hospitalar (GARCIA; ZANETTI-RAMOS, 2004). Bidone (2001) demonstrou que esses micro-organismos são os mais frequentemente encontrados em análises microbiológicas dos resíduos de serviços de saúde. Portanto, os efluentes hospitalares, quando não tratados adequadamente, possibilitam a contaminação de mananciais de água potável, tanto superficiais quanto subterrâneos, o que pode representar um grande risco à saúde pública (FORMAGGIA, 1995; DREMONT; HADJALI, 1997).

Os hospitais liberam, em seu esgoto, uma variedade de substâncias tais como fármacos, antimicrobianos, desinfetantes, anestésicos, metais pesados e drogas não metabolizadas por pacientes (EMMANUEL et al, 2005; HERNANDO et al, 2006; BOILLOT et al, 2008). Cerca de 30 a 60% dos medicamentos prescritos pela clínica médica são excretados no efluente hospitalar (MCQUILLAN et al, 2002). A disposição conjunta dessas substâncias nos corpos hídricos receptores pode desencadear, pela pressão seletiva, um aumento de populações bacterianas com fenótipos de multirresistência aos antibióticos (KÜMMERER, 2003; HAWKSHEAD, 2008). Além disso, presença de pressão seletiva aumenta a possibilidade de transferência

horizontal, uma vez que a probabilidade de bactérias doadoras de genes resistentes encontrar cepas receptoras é maior (SMALLA et al, 2000; MARTINEZ, 2009).

Desta forma, os esgotos hospitalares devem ser tratados com objetivo de remover e ou eliminar impurezas físicas, químicas e biológicas, principalmente micro-organismos patogênicos. Grande parte dos tratamentos comumente adotados incluem, tratamentos preliminares, como clarificação primária, secundários que é biológico e consiste geralmente em lodos ativados, e terciário que consiste na desinfecção química ou às vezes filtração rápida seguida de desinfecção por raios ultravioleta. Infelizmente, a maioria das ETEH não são totalmente eficientes na remoção de micropoluentes como a concentração de fármacos, compostos orgânicos adsorvíveis (AOX) comumente presentes nos efluentes hospitalares (VERLICCHI; AUKIDY; ZAMBELLO, 2015).

Um estudo de revisão de Verlicch e colaboradores (2015) é baseado em 48 publicações sobre tratamentos dedicados a efluentes hospitalares nas escalas laboratorial, piloto e completa em plantas que possuem tratamento primário, secundário e terciário. Essas publicações englobaram 24 países diferentes em todo o mundo entre 1995 e 2015 com objetivo de verificar a eficiência da remoção de 108 fármacos pertencentes a 17 diferentes classes. Além disso, 53% dos estudos foram realizados em países europeus (Áustria, Bélgica, Dinamarca, França, Alemanha, Grécia, Itália, Luxemburgo, Países Baixos, Suíça e Turquia), 27% em países asiáticos (China, Índia, Indonésia, Irã, Iraque, Nepal, República da Coreia, Tailândia e Taiwan), 16% na América do Sul (Brasil) e 4% na África (Egito e Etiópia).

Nos países europeus, a principal razão para a investigação foi a consciência do risco potencial representado pela ocorrência de resíduos farmacêuticos no efluente secundário e a necessidade de redução do lançamento desses resíduos no ambiente aquático. Nos últimos anos, vem ocorrendo um intenso debate sobre a necessidade da adoção de tratamentos apropriados para efluentes hospitalares baseados na avaliação da estrutura oferecida pelos estabelecimentos de saúde e da bacia hidrográfica receptora desses fármacos (ORT et al, 2010; VERLICCHI et al, 2012; SANTOS et al, 2013). Nesses países são feitos esforços para melhorar a remoção de compostos persistentes por meio de tratamento de resíduos no final do processo de produção e de avaliações ecotoxicológicas (ESCHER et al, 2011; VERLICCHI; AUKIDY; ZAMBELLO, 2012). Diferentes ETEH de escala completa já vem sendo

propostas para o tratamento desses efluentes, como o tratamento preliminar como o biorreator à membrana (BEIER et al, 2011) seguido de ozonização e radiação ultravioleta (VERLICCHI et al, 2010), ozonização e carvão em pó ativado (PILLS, 2012) e ozonização e carbono ativado granular (GRUNDFOS BIOBOOSTER, 2012).

1.4. *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa é um patógeno oportunista altamente adaptável com capacidade de sobreviver à terapia antimicrobiana, o que contribui para o aumento da prevalência de infecções hospitalares (LABAER et al, 2004; LAGATOLLA et al, 2004; SCHEFFER et al, 2010; ROMÃO et al, 2011). É responsável por processos infecciosos em diversos sítios do corpo humano, particularmente em pacientes imunocomprometidos (OLIVEIRA et al, 2011). Produz várias exotoxinas que respondem por boa parte de sua patogenicidade. Infecções ocasionadas por estes patógenos estão frequentemente associadas à alta mortalidade no ambiente hospitalar (LIVERMORE, 2002; PELLEGRINO et al, 2002; PITOUT et al, 2005). As principais infecções são do trato respiratório inferior, trato urinário e infecções da pele e dos tecidos moles (GALES et al, 2002; RENNIE et al, 2003). A distribuição universal da *P. aeruginosa* sugere um notável grau de adaptabilidade fisiológica e genética (SPIERS; BUCKLING; RAINEY, 2000). Estes fatores contribuem para a determinação das espécies do gênero *Pseudomonas* como bons bioindicadores na avaliação da diversidade bacteriana em inúmeros sítios, incluindo a qualidade dos recursos hídricos, por métodos de cultivo ou aqueles baseados somente nas sequências do DNA como a metagenômica (LEE; TIN; KELLEY, 2007). É um dos principais micro-organismos recuperados de efluentes hospitalares (FUENTEFRÍA et al, 2008; LÓPEZ, 2011). Existem atualmente 135 genomas de *P. aeruginosa* já sequenciados e depositados no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>).

As infecções causadas por este agente têm sido particularmente desafiantes tendo em vista que o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos deste patógeno vem sendo alterado ao longo do tempo em consequência da pressão seletiva existente no meio ambiente hospitalar, sobretudo nas unidades de terapia intensiva. Tais condições fazem com que este micro-organismo se adapte ao ambiente a que está continuamente exposto, desenvolvendo mecanismos de resistência. Estas

modificações fenotípicas podem ser responsáveis pelo agravamento do estado clínico do paciente, aumento do tempo de hospitalização e encarecimento do tratamento por haver necessidade de exames complementares, do uso de drogas cada vez mais potentes, tóxicas e caras (MARTINS, 2002; NOUÉR et al, 2005; PITOUT et al, 2005).

A resistência aos antibióticos observada em *P. aeruginosa* é atribuída, principalmente, a mutações cromossômicas ou aquisição de genes de resistência à antibióticos e por troca genética mediada por plasmídeos, transposons ou bacteriófagos (POOLE, 2011).

É importante ressaltar que os genes de resistência aos antibióticos carbapenêmicos *bla_{VIM-2}* e *bla_{SPM-1}*, bastante disseminados entre cepas de *P. aeruginosa* de origem clínica, já foram detectados em isolados ambientais aquáticos no Brasil e em Portugal, respectivamente (FUENTEFRIA; FERREIRA; CORÇÃO, 2011).

Devido à sua resistência intrínseca a múltiplas drogas e de genes de resistência presentes em plasmídeos, e sua capacidade de colonizar vários ambientes, isolados de *P. aeruginosa* foram selecionados como indicador da frequência de resistência antimicrobiana nesse estudo.

1.5. RESISTOMA

Denomina-se resistoma o conjunto de genes de resistência antimicrobiana existentes em um dado local, que podem esclarecer como os micro-organismos presentes interagem, tanto pela produção de antibióticos quanto pela presença de genes de resistência antimicrobiana e que possibilitam a competição e a comunicação dos micro-organismos em um dado ambiente (DANIEL, 2005; D’COSTA et al, 2006).

Os genes de resistência de patógenos compreendem uma fração do resistoma. Genes de resistência de bactérias não patogênicas incluem genes de micro-organismos produtores de antibióticos e genes ocultos de resistência (não necessariamente expressos) (CAUMO, 2010).

O sequenciamento de genomas revelou que um grande número de genes de resistência está presente em todas as bactérias. Por exemplo, genes que codificam proteínas de efluxo são comuns a todos os genomas bacterianos. Essas chamadas bombas de efluxo provavelmente permitem ao micro-organismo uma maior

flexibilidade para explorar diversos ambientes e promover sua patogenicidade, além de modular sua diferenciação celular (STOVER et al, 2000; POOLE; SRIKUMAR, 2001; PIDDOCK, 2006).

Solo, sedimento, águas superficiais, esgotos, lamas e resíduos animais têm sido considerados importantes reservatórios de genes de resistência a antibióticos (ARG) uma vez que, abundantes ARG têm sido frequentemente detectados nesses ambientes (LAPARA et al, 2011; ZHANG; ZHANG, 2011; KOCZURA et al, 2012; ZHU et al, 2013; CZEKALSKI; GASCON; BURGMANN, 2014).

A resistência aos antimicrobianos tornou-se uma séria ameaça para a saúde humana. Ela é uma inevitável consequência do uso indiscriminado de antibióticos em humanos e animais (YANG et al, 2014).

Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), de 2010, apontam que mais de 50% das prescrições de antimicrobianos no mundo são inadequadas. No Brasil, o consumo de antimicrobianos chega a 40% dos medicamentos comercializados, com mais de 70 milhões de unidades comercializadas, segundo relatório do Instituto IMS Health (VILMORE, 2010).

Tendo em vista o alto consumo de antimicrobianos e a alta incidência de infecções hospitalares causadas por micro-organismos resistentes aos antimicrobianos, a Anvisa publicou a RDC 20/2011 (BRASIL, 2011b) com o objetivo de fortalecer a política de uso racional de antimicrobianos. Com isso esperava-se uma redução da administração de antimicrobianos e a diminuição dos índices de resistência e impactos ao meio ambiente. No entanto, quatro anos depois da resolução da Anvisa que proíbe a venda de antibióticos sem receita médica, aumenta o número de denúncias de venda irregular desses medicamentos ao Conselho Regional de Farmácia de Minas Gerais (CRF-MG). Desde o fim de novembro de 2011, os estabelecimentos comerciais são obrigados a reter o receituário, que passou a ter validade de apenas 10 dias a partir da data de prescrição pelo médico (BORGES, 2015). Além de contrariar a resolução da Anvisa, a venda de antibióticos sem receita fere ao menos quatro artigos do Código de Defesa do Consumidor (CDC), lei nº 8078/90 (BRASIL, 1990b), que estabelecem o respeito à saúde e segurança das pessoas.

A maioria dos levantamentos baseados em relatórios sobre resistência antimicrobiana se baseia, principalmente, em isolados clínicos, poucos estudos

avaliaram os perfis de resistência antimicrobiana de bactérias isoladas do efluente hospitalar de estações de tratamento (CHITNIS et al, 2004; PRADO et al, 2008; CHAGAS et al, 2011). Essas plantas de tratamento têm sido reconhecidas como um reservatório de organismos resistentes e genes de resistência (MARTINEZ et al, 2009; ALLEN et al, 2010).

Até mesmo os resíduos líquidos hospitalares tratados apresentam *P. aeruginosa* MDR, sinalizando a necessidade de implementação de técnicas de tratamento mais avançadas e eficientes, no sentido de minimizar a propagação de bactérias e genes de resistência nos ambientes aquáticos (COUTINHO et al, 2013).

As bactérias podem desenvolver resistência aos antimicrobianos através da mutação de genes existentes (evolução vertical) ou através da aquisição de novos genes a partir de outras cepas ou espécies (transferência horizontal de genes). O compartilhamento de genes entre bactérias por transferência horizontal ocorre por muitos mecanismos diferentes. Elementos genéticos móveis, incluindo fagos, plasmídeos e transposons medeiam esta transferência, e em algumas circunstâncias a presença de baixos níveis de antimicrobiano no meio ambiente é o sinal chave que promove a transferência de genes (SCHMIEDER; EDWARDS, 2012). Diversos estudos demonstram fortes evidências de que a transferência horizontal de genes é um processo comum em locais tão diversos como águas superficiais, águas residuais, solo e animais (KRUSE; SORUM, 1994; OHLSEN et al, 2003; JOHNNING et al, 2013).

A resistência bacteriana aos antimicrobianos pode ser causada por quatro mecanismos gerais: inativação ou modificação do antimicrobiano; alteração no sítio alvo do antimicrobiano que reduz a capacidade de ligação; modificação da via metabólica para dificultar a ação do antimicrobiano; e a redução intracelular do acúmulo do antimicrobiano por redução da permeabilidade da membrana e/ou ativação da bomba de efluxo (SCHMIEDER; EDWARDS, 2012).

A alteração da permeabilidade da membrana é o mecanismo de resistência observado frente aos aminoglicosídeos, à fosfomicina, quinolonas e tetraciclinas (DELCOUR, 2009).

Já a alteração do sítio alvo caracteriza-se pela diminuição ou mesmo ausência de afinidade do antibiótico ao local de ligação. Ocorre por alteração da estrutura do peptidoglicano, pela interferência na síntese de proteínas ou na síntese de DNA (FLUIT; VISSER; SCHMITZ, 2001; RICE; BONOMO, 2005). A alteração da estrutura

do peptidoglicano consiste na inibição das enzimas que participam na construção do mesmo. Este mecanismo de resistência é observado em diversos antibióticos tais como beta-lactâmicos e glicopeptídeos (DZIDIC; SUSKOVIC; KOS, 2007). Os aminoglicosídeos, tetraciclina e macrolídeos interferem na síntese de proteínas. O mecanismo de resistência por interferência na síntese da DNA está descrito para as fluoroquinolonas (DZIDIC; SUSKOVIC; KOS, 2007).

As bombas de efluxo são proteínas presentes nas membranas. Neste tipo de resistência ocorre um efluxo, isto é, o transporte ativo dos antibióticos do meio intracelular para o meio extracelular. Este mecanismo afeta todas as classes de antibióticos, no entanto apresenta maior eficácia na presença de macrolídeos e tetraciclina pois estes inibem a biossíntese de proteínas, e fluoroquinolonas, pois estas inibem a síntese de DNA (DZIDIC; SUSKOVIC; KOS, 2007).

O sistema de efluxo de multidrogas tem sido agrupado em seis famílias: *major facilitator superfamily* (MFS), *ATP-binding cassette* (ABC) *superfamily*, *small multidrug resistance* (SMR) *family*, *resistance-nodulation-cell division* (RND) *superfamily*, *multidrug and toxic compound extrusion* (MATE) e *drug metabolite transporter* (DMT) (MARCHAND et al, 2004; VILA; MARTÍ; SÁNCHEZ-CÉSPEDES, 2007; SOTO, 2013).

O mecanismo enzimático de resistência por inativação do fármaco resulta da produção, pela bactéria, de enzimas que degradam ou inativam o antibiótico. Existem três grandes estratégias, tais como, hidrólise, transferência de um grupo ou processo redox. A estrutura dos antibióticos contém grupos ésteres e amidas, fazendo com que sejam susceptíveis às hidrolases. A quebra da ligação destes grupos é feita na presença destas enzimas, que podem ser excretadas pelas bactérias, atuando na inativação do antibiótico antes que este atinja o seu alvo. O caso clássico são as amidases hidrolíticas, isto é, as beta-lactamases, que quebram o anel beta-lactâmico das penicilinas e cefalosporinas (DZIDIC; SUSKOVIC; KOS, 2007). O segundo mecanismo de inativação dos antibióticos é o de transferência de grupos, nos quais se realçam as enzimas transferases. Os antibióticos mais afetados são os aminoglicosídeos, anfenicóis, fosfomicina, estreptograminas e macrolídeos, nos quais há a aquisição dos diversos grupos químicos, como o adenilil, fosforil ou acetil. Desta forma a ligação antibiótico – alvo fica comprometida (RICE; BONOMO, 2005; DZIDIC; SUSKOVIC; KOS, 2007). Por último, também através de mecanismos enzimáticos, pode ocorrer a inativação do antibiótico por um processo redox, em que ocorre

oxidação ou redução induzida pela bactéria patogênica (WRIGHT, 2005). A oxidação da tetraciclina pela enzima TetX é o mecanismo mais estudado (FLUIT; VISSER; SCHMITZ, 2001).

A produção de enzimas beta-lactamases, tem sido relatada como um importante mecanismo de resistência a antibióticos beta-lactâmicos, hidrolisando o anel beta-lactâmico pela quebra da ligação amida, perdendo assim, a capacidade de inibir a síntese da parede celular bacteriana. Entre estas enzimas, destaca-se a produção de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL), principalmente em algumas espécies de bactérias Gram-negativas (MACEDO et al, 2005; LAGO et al, 2010; RUIZ, 2010).

1.6. METAGENÔMICA E METAGENÔMICA FUNCIONAL

Durante os últimos 50 anos, até o advento da biologia molecular e de técnicas da genética e de bioinformática, o estudo de micro-organismos era feito exclusivamente pela fisiologia, morfologia e bioquímica de organismos cultiváveis, limitada ao estudo das espécies capazes de crescer em meios de cultura no ambiente laboratorial. Entretanto, essa abordagem limita as avaliações taxonômicas, filogenéticas e a estimativa da diversidade microbiana da biosfera, porque apenas uma pequena parcela dos micro-organismos, em torno de 1%, é cultivável (PACE, 1997). Desta forma, foram desenvolvidos métodos independentes de cultivo, sendo o principal deles a metagenômica, que possibilitaram acessar todo o conjunto de genes e genomas de uma amostra ambiental (STEELE; STREIT, 2005; GILBERT; DUPONT, 2011) possibilitando conhecer melhor a diversidade genética, a estrutura das populações e as funções ecológicas dos micro-organismos (RIESENFELD; SCHLOSS; HANDELSMAN, 2004).

O advento da metagenômica vem proporcionando a realização de análises de comunidades microbianas em inúmeros ambientes. É baseada em *screening* de genes de interesse considerando-se suas sequências conservadas (VIEIRA et al, 2007; TURQUE et al, 2010; GONZALEZ et al, 2012). Esta abordagem também é útil para a descoberta de novos micro-organismos ambientais e genes, com aplicações importantes para a biotecnologia, medicina e biorremediação (CARDOSO et al, 2012).

Análises metagenômicas tradicionais utilizam a amplificação, clonagem e determinação da sequência nucleotídica de DNA ribossomal, pelo método de sequenciamento de DNA proposto por Sanger na década de 70. Para isso, é utilizada polimerização de DNA com incorporação de dideoxynucleotídeos marcados, método que foi grandemente automatizado, permitindo a execução dos diversos projetos-genoma. Porém, abordagens metagenômicas modernas aplicam distintas técnicas de sequenciamento de segunda geração, que permitem estudar genomas microbianos completos a partir de amostras ambientais, bem como identificar e pesquisar *clusters* gênicos funcionais codificando enzimas microbianas de interesse tecnológico (KUNIN et al, 2008).

Existem dois tipos de estudo de metagenomas: a) Estudo de diversidade utilizando o gene *rrs* do 16S rRNA. Nesse tipo de estudo amplifica-se por reação em cadeia pela polimerase (PCR) a sequência 16S e se compara o resultado em um banco de dados de bactérias conhecidas. Com isso, é possível avaliar e comparar a diversidade de bactérias presentes na amostra b) *Shotgun*, onde não se estabelece previamente nenhuma seleção de alvo. Todo o DNA extraído da amostra é fragmentado e sequenciado. A análise consiste em montar o metagenoma da amostra para tentar identificar, além da diversidade de genomas, novos genes e rotas metabólicas (VARUZZA, 2013).

1.7. NOVAS TECNOLOGIAS DE SEQUENCIAMENTO

As novas tecnologias de sequenciamento, denominadas de tecnologias de sequenciamento de nova geração (Next Generation Sequencing-NGS), começaram a ser adotadas em 2005. Essas tecnologias promovem o sequenciamento de DNA em plataformas capazes de gerar informação sobre milhões de pares de bases em uma única corrida (CARVALHO; SILVA, 2010). A principal vantagem dos métodos NGS consiste na construção *in vitro* de bibliotecas genômicas sem amplificação de fragmentos de DNA e sem clonagem, como por exemplo, em *E. coli* (HOFF et al, 2009). Portanto, em análises metagenômicas, é viável a utilização desses sequenciadores de segunda geração, pois permite a construção de grandes

bibliotecas. A segunda geração de NGS é representada principalmente pelos sequenciadores: Pirosequenciamento 454 (Roche), Illumina Genome Analyzer-HiSeq/MiSeq (Solexa) e SOLiD (Applied Biosystems) (KUNIN et al, 2008).

Um dos sequenciadores bastante utilizados em análises metagenômicas é o Illumina (HOFF et al, 2009). Esse sequenciador produzido em 2006 baseia-se no conceito de “sequenciamento por síntese” o qual requer que as sequências a serem determinadas sejam convertidas numa biblioteca de sequenciamento especial, permitindo a amplificação e imobilização das sequências para serem submetidas ao sequenciamento (KIRCHER; KELSO, 2010). São empregados quatro tipos de nucleotídeos, dotados da capacidade de terminação reversível e marcados com diferentes fluoróforos e, também, uma enzima DNA polimerase especialmente habilitada para incorporá-los (ILLUMINA INC., 2007; ANSORGE, 2009).

Nessa tecnologia, o DNA é fragmentado aleatoriamente e, após a fragmentação, dois tipos diferentes de adaptadores adicionados às terminações 5' e 3' dos fragmentos. Em seguida, esses fragmentos são desnaturados, distribuídos e imobilizados (por uma das extremidades), também aleatoriamente, em uma superfície sólida denominada *Flow cell*, a qual é revestida por uma camada densa de oligonucleotídeos complementares aos dois tipos de adaptadores dos fragmentos (ILLUMINA INC., 2007; ANSORGE, 2009). Por meio de um processo conhecido como PCR de fase sólida (TURCATTI et al, 2008; CARVALHO; SILVA, 2010; METZKER, 2010), os fragmentos são multiplicados usando-se uma técnica de amplificação em "ponte", a qual forma pequenos aglomerados (*clusters*) de fragmentos do tipo fita simples. Tais *clusters* são formados espontaneamente, devido ao fato das novas cópias produzidas se ligarem à placa muito próxima ao fragmento original. Ao fim da fase de amplificação, depois de vários ciclos de PCR, a placa fica populada por diversos desses *clusters*, os quais contêm por volta de 1000 cópias de um mesmo fragmento de fita simples (ANSORGE, 2009; CARVALHO; SILVA, 2010) (Figura 1).

As bibliotecas de *paired-end* são indicadas para a determinação da diversidade bacteriana e possuem a vantagem de produzir duas leituras para cada fragmento de DNA, uma em cada extremidade, gerando mais informação e auxiliando o processo de montagem do genoma. Nesta biblioteca são ligados adaptadores nas extremidades do fragmento de DNA, adaptador P1 na região 5' e P2 na região 3'. O primeiro passo

do sequenciamento é realizado através do adaptador P1 para gerar a leitura 5' do par, e P2 para gerar a leitura 3' (BERGLUND; KIIALAINEN; SYVANEN, 2011).

Uma vez formados os *clusters*, o processo de “sequenciamento por síntese” é iniciado. Uma mistura para as reações de sequenciamento é aplicada à placa, contemplando os quatro nucleotídeos terminadores reversíveis marcados, iniciadores e a enzima DNA polimerase. Após a incorporação do nucleotídeo especial, a replicação é interrompida, os nucleotídeos não usados são lavados e um laser varre a superfície, excitando o fluoróforo do nucleotídeo terminador e permitindo a sua identificação, bem como a de sua posição no suporte sólido, por uma câmera CCD (dispositivo de carga acoplada). Tal câmera registra a cor da luz sendo emitida por cada *cluster* de fragmentos e é dessa forma que o sequenciamento acontece. Ao final do ciclo, o grupo bloqueador da extremidade 3' da base e o fluoróforo são removidos e o ciclo de síntese se repete. É importante ressaltar que as sequências de milhões de *clusters* espalhados pela placa podem ser determinadas simultaneamente, resultando na vasta produção de dados de sequenciamento (ANSORGE, 2009) (Figura 2).

A leitura das bases é realizada através da análise sequencial de cada uma das imagens obtidas em cada ciclo de sequenciamento, para cada posição de *cluster* (CARVALHO; SILVA, 2010). A Figura 3 ilustra a sequência de imagens capturadas e a consequente determinação da leitura de sequenciamento.

Figura 1 – Illumina. (a) Preparo da amostra: o DNA genômico é aleatoriamente fragmentado e cada fragmento recebe a aplicação de adaptadores em ambas as suas extremidades; (b) Fixação do DNA à superfície: fragmentos de fita simples se ligam aleatoriamente à superfície dos canais da *Flow cell*; (c) Amplificação em "ponte": nucleotídeos comuns, não marcados, e a enzima polimerase são fornecidos para iniciar a amplificação de fase sólida em "ponte"; (d) Fragmentos se tornam de fita dupla: a polimerase incorpora nucleotídeos para formar "pontes" de fita dupla no substrato de fase sólida; (e) Desnaturação das moléculas de fita dupla: um processo de desnaturação deixa os moldes de fita simples ancorados ao substrato; (f) Término da fase de amplificação: milhões de *clusters* de fragmentos de DNA fita simples são gerados em cada canal da *Flow cell*. Fonte: Modificado de Illumina, Inc., 2007

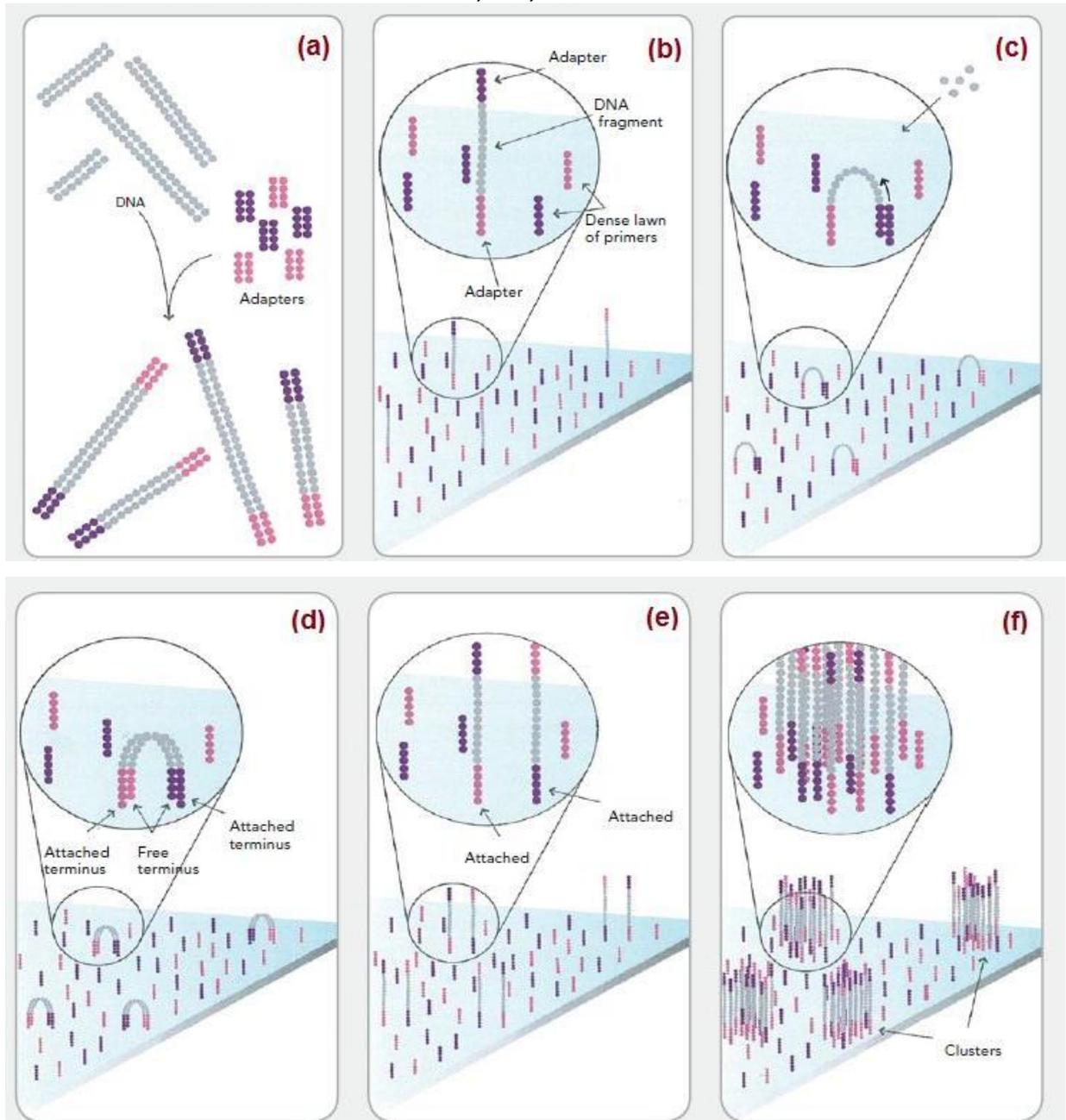


Figura 2 – Illumina. (g) Identificação da primeira base: para iniciar o primeiro ciclo de sequenciamento, os quatro nucleotídeos terminadores reversíveis marcados, *primers* e a enzima DNA polimerase são adicionados à *Flow cell*; (h) Detecção da primeira base: após a excitação pelo laser, a imagem da fluorescência emitida é capturada de cada *cluster* na *Flow cell*. A identidade da primeira base é registrada para cada um dos *clusters*; (i) Identificação da segunda base: para iniciar o segundo ciclo de sequenciamento, os nucleotídeos terminadores reversíveis marcados e a enzima DNA polimerase são aplicados à placa. Fonte: Modificado de Illumina, Inc., 2007

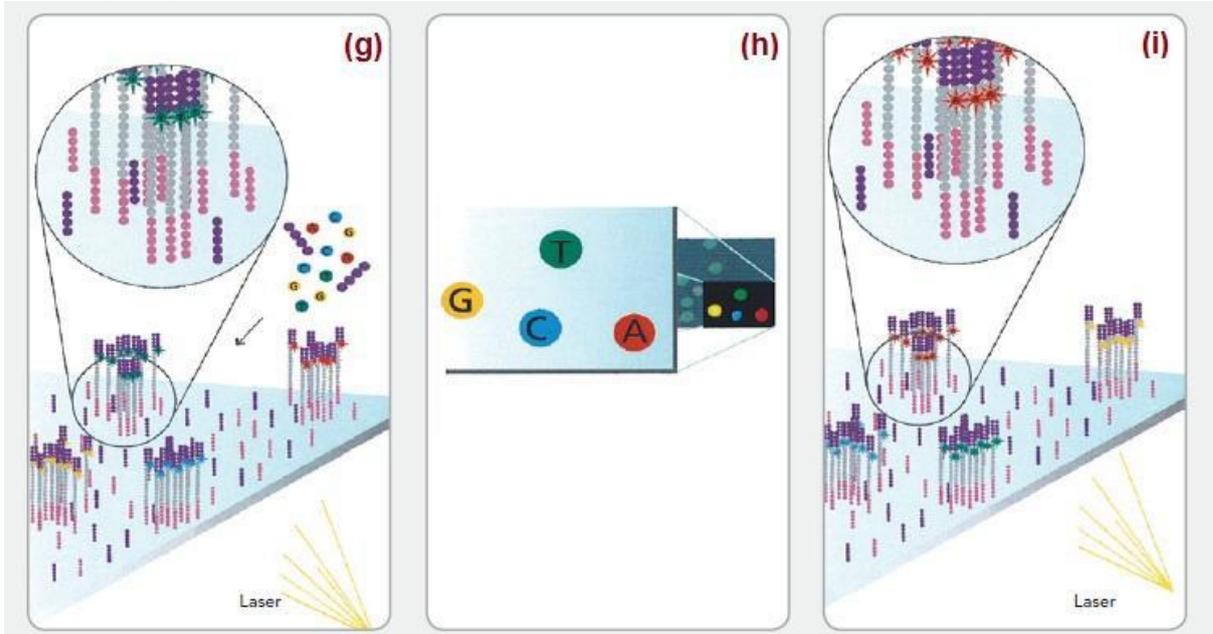
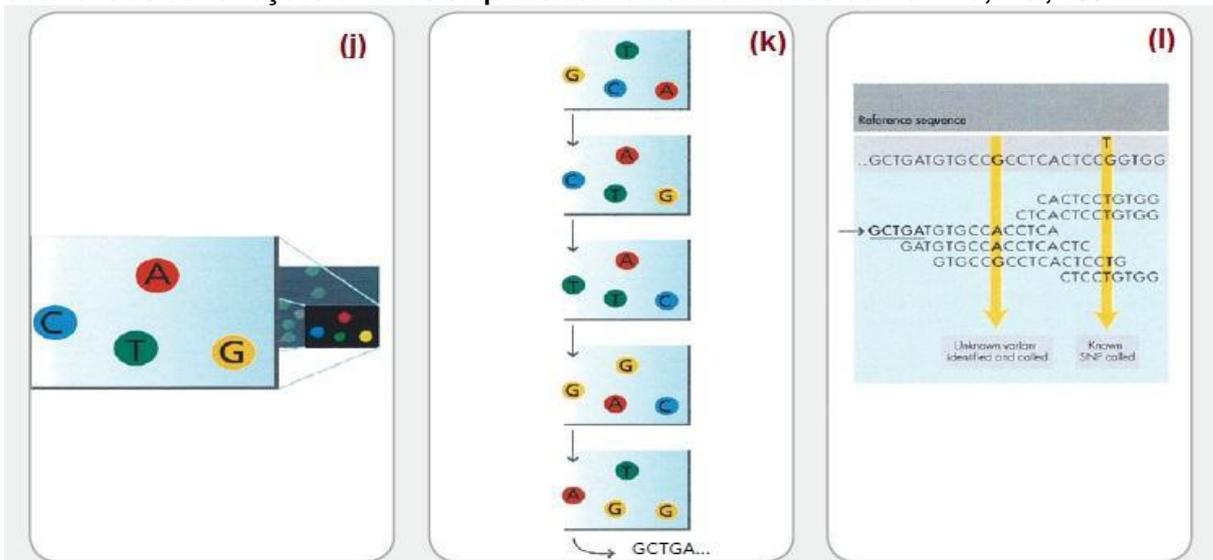


Figura 3 – Illumina. (j) Captura de imagem do segundo ciclo da química de sequenciamento: após a excitação pelo laser, a imagem é capturada tal como da vez anterior. Com isso, é feito o registro da segunda base de cada *cluster*; (k) Leituras de seqüências ao longo de vários ciclos da química de sequenciamento: a repetição dos ciclos de sequenciamento determina a seqüência de bases para um dado fragmento, uma base de cada vez; (l) Alinhamento dos dados: as leituras obtidas podem ser alinhadas contra um genoma de referência para a identificação de ocorrências de variações entre as seqüências. Fonte: Modificado de Illumina, Inc., 2007



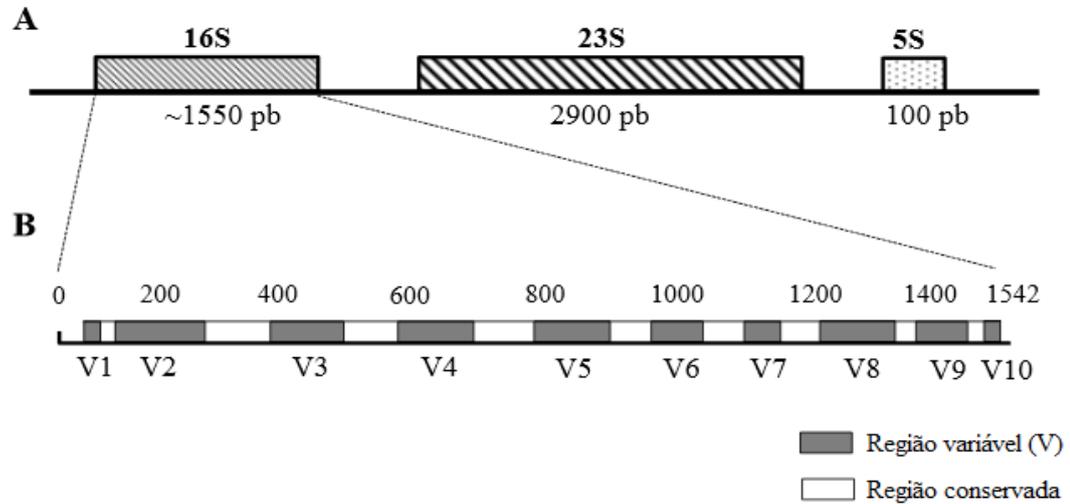
1.8.GENE *rrs* 16S rRNA COMO MARCADOR MOLECULAR

Diversas ferramentas genéticas estão sendo usadas para caracterizar comunidades microbianas de vários ambientes sem a necessidade de cultivo (KOWALCHUK et al, 2004), entre elas, o sequenciamento do gene *rrs* 16S rRNA.

Os ácidos ribonucléicos (RNA) que compõem os ribossomos (rRNA) estão entre as macromoléculas mais conservadas evolutivamente de todos os sistemas de vida. Os procariotos têm ribossomos 70S, constituídos de uma unidade 30S (16S RNA e 21 proteínas) e outra 50S (5S RNA, 23S RNA e 34 proteínas) (ATLAS; BARTHA, 1998).

Os genes 16S, 23S e 5S rRNA formam um *operon* no cromossomo bacteriano (Figura 4A). Baseado na diferença entre os tamanhos, os genes do RNA dos procariotos foram denominados de subunidade menor para o 16S rRNA, e subunidade maior para o 23S rRNA (Figura 4A) (HURST et al, 2002). O gene 16S rRNA é composto por um conjunto de aproximadamente 1550 nucleotídeos (Figura 4B) (DAMS et al, 1988; XU et al, 2004). As sequências que codificam o 16S rRNA são dotadas de regiões altamente conservadas que estão alternadas entre 9 regiões variáveis (V1 a V9) (Figura 4B) (WOESE, 1987). Estas regiões variáveis são utilizadas para determinação de filogenia entre os procariotos (WOESE, 1987). A acurácia da inferência filogenética é dependente não somente do número de bases comparadas, mas também das regiões da molécula que são comparadas (HURST et al, 2002). Com base nestes conhecimentos, o gene 16S rRNA vem sendo amplamente utilizado na elucidação da diversidade e filogenia dos micro-organismos. Este marcador é tão seguro e aceito pela comunidade científica que um banco de dados curado do gene 16S rRNA, o Ribosomal Database Project (RDP) foi criado e encontra-se disponível para pesquisa e consulta. Com isso, o sequenciamento do gene *rrs* 16S rRNA representa uma importante ferramenta para análise de diversidade de comunidades bacterianas em amostras ambientais. O uso desta técnica tem demonstrado ótimos resultados no âmbito de estimar e comparar comunidades bacterianas de diferentes ambientes (CLEMENTINO et al, 2008; VAL-MORAES et al, 2009; TURQUE et al, 2010; PISA et al, 2011; MACEDO, 2012).

Figura 4. (A) Organização estrutural dos genes do RNA ribossomal em bactérias e (B) Esquema do gene *rrs* 16S rRNA com indicação das zonas variáveis e conservadas (adaptado de CAI; ARCHAMBAULT; PRESCOTT, 2003)



1.9. SITUAÇÃO ATUAL

Vários estudos no mundo indicam que os sistemas de tratamento de resíduo líquido hospitalar podem funcionar como disseminadores de bactérias resistentes a antibióticos no ambiente (KIM; AGA, 2007; FASIH et al, 2010; ROBLEDO; AQUINO; VÁSQUEZ, 2011). Os níveis de resistência detectados entre os isolados clínicos e sistemas de tratamento sugerem que estes organismos são uma fonte significativa de genes de resistência a antibióticos.

No Brasil, a presença de bactérias multirresistentes tem sido verificada em diversos efluentes hospitalares. Em uma ETEH na cidade do Rio de Janeiro, pesquisadores isolaram uma cepa de *Klebsiella pneumoniae* produtora de ESBL e alta concentração de coliformes totais e fecais do efluente e concluíram que o tratamento foi insuficiente (PRADO et al, 2008). Outro estudo realizado no sul do Brasil concluiu que 60% das cepas de *Acinetobacter* spp. isoladas de um efluente hospitalar eram multirresistentes aos antimicrobianos testados e metade das cepas produziam ESBL (GUSATTI et al, 2009). Picão e colaboradores (2013) isolaram bactérias MDR como *Aeromonas* spp., espécies da família Enterobacteriaceae e *Pseudomonas* spp. em uma ETEH, do tipo terciário, em São Paulo. Essas bactérias foram resistentes à vários antimicrobianos, principalmente ao aztreonam, ceftazidima, cefepima e meropenem em vários pontos de coleta dessa estação.

P. aeruginosa é um dos principais micro-organismos recuperados de efluentes hospitalares e os genes de resistência aos carbapenêmicos *bla_{VIM-2}* e *bla_{SPM-1}*, bastante disseminados entre cepas de *P. aeruginosa* de origem clínica, já foram detectados em isolados ambientais aquáticos no Brasil e em Portugal (FUENTEFRÍA et al, 2008). Resende e colaboradores (2009) isolaram 67 bacilos Gram-negativos e 6 cocos Gram-positivos em efluentes de esgoto de 10 hospitais e da estação de tratamento de esgoto da cidade situados em Goiânia (Brasil), para determinar seu perfil de susceptibilidade e investigar seus mecanismos de resistência. Dentre as bactérias Gram-negativas 10 foram *K. pneumoniae*, 10 *E. coli* e 3 *P. aeruginosa*. Em relação às amostras de *P. aeruginosa*, 3 (100%) apresentaram resistência à ampicilina-sulbactam. Uma avaliação microbiológica na estação de tratamento de esgoto do complexo hospitalar Lourenço Jorge/Maternidade Leila Diniz, no Rio de Janeiro, revelou a presença de cepas de *P. aeruginosa* resistentes à vários antimicrobianos, principalmente ao aztreonam, em vários pontos de coleta dessa estação (NOVAES, 2008). Um outro estudo, nessa mesma estação, demonstrou a presença de cepas de *P. aeruginosa* resistentes aos vários antimicrobianos, principalmente ao aztreonam, em vários pontos de coleta dessa estação (SANTORO; ROMÃO; CLEMENTINO, 2012).

Miranda e colaboradores (2015) detectaram isolados de *P. aeruginosa* MDR e extensivamente droga resistente (XDR) em efluente hospitalar reunidos em um único complexo clonal (CC244) por meio de *multilocus sequencing typing analysis* (MLST), demonstrando o potencial patogênico desse clone no espalhamento de organismos resistentes de origem clínica para o efluente e conseqüentemente para o meio ambiente.

Segundo estudo realizado pela Secretaria Municipal de Meio Ambiente (SMMA) existem 420 unidades de saúde em toda a cidade do Rio de Janeiro. Destas, 361 foram vistoriadas e 197 tiveram seu efluente analisado. O resultado encontrado revela que 148 unidades de saúde não possuem estação de tratamento de esgoto e dentre elas 83 também não apresentam tratamento final no destino de seu efluente. Este estudo ainda verificou que 40 unidades de saúde têm seu efluente contaminado por *P. aeruginosa*, oriundo de fezes e sangue de pacientes contaminados (DIÁRIO OFICIAL DO MUNICÍPIO DO RIO DE JANEIRO, 2002). Não há dados mais recentes sobre esse levantamento.

Estas observações têm uma importância epidemiológica relevante e destacam o papel da água, em especial das residuárias, na circulação e disseminação de microorganismos MDR no meio ambiente.

2. RELEVÂNCIA

Até pouco tempo atrás, no setor Saúde, a dimensão de ambiente era compreendida pelo homem como externa a ele, traduzida pelas expressões “ambiente físico”, “ecossistema” ou “espaço geográfico”. Mais recentemente, o tema foi ganhando relevância no SUS, que incorporou a Vigilância Ambiental ao Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica e Ambiental em Saúde (SNVA) (AUGUSTO, 2003).

Desta forma, a realização deste estudo é fundamentada na necessidade de avaliar, sob o aspecto microbiológico, resíduo líquido hospitalar tratado, conforme previsto na legislação vigente no Brasil e no estabelecimento da relação entre a Vigilância Ambiental e a Saúde Pública. A prioridade dada aos poluentes microbiológicos é justificada pelos possíveis impactos negativos a serem gerados devido ao lançamento de efluentes hospitalares, contendo micro-organismos e genes de resistência aos antimicrobianos e fármacos nos corpos hídricos comprometendo o meio ambiente e a saúde da população.

No contexto da legislação, órgãos como a Anvisa e o CONAMA têm assumido o papel de orientar, definir regras e regular a conduta dos diferentes agentes, no que se refere à geração e ao manejo dos resíduos de serviços de saúde, com o objetivo de preservar a saúde e o meio ambiente, garantindo a sua sustentabilidade. Este esforço se reflete, na atualidade, nas publicações da RDC Anvisa nº 306/04 (BRASIL, 2004), que destaca o item 13.3.1 do Anexo: *“Os resíduos líquidos provenientes de esgoto e de águas servidas de estabelecimento de saúde devem ser tratados antes do lançamento na rede coletora de esgoto...”* e nas publicações da Resolução CONAMA nº 430/11 (BRASIL, 2011c) que destaca o Art. 16, parágrafo 3º - *“Os efluentes oriundos de serviços de saúde estarão sujeitos às exigências estabelecidas na Seção III desta Resolução, desde que atendidas as normas sanitárias específicas vigentes, podendo:*

I - ser lançados em rede coletora de esgotos sanitários conectada a estação de tratamento, atendendo às normas e diretrizes da operadora do sistema de coleta e tratamento de esgoto sanitários;

II - ser lançados diretamente após tratamento especial”.

No Rio de Janeiro, existe um programa criado para atender a Lei nº 2.661, de 27/12/1996 (RIO DE JANEIRO, 1996) que determina níveis mínimos de tratamento de esgotos sanitários, antes de seu lançamento em corpos d'água, administrado pela Subsecretaria de Águas Municipais (Rio-Águas) e a Secretaria Municipal de Saúde. O Art. 8º destaca - *“Os efluentes de hospitais, laboratórios, clínicas e estabelecimentos similares, em áreas que não disponham de sistema público de tratamento, deverão sofrer tratamento especial na origem, que impossibilite a contaminação dos corpos receptores por organismos patogênicos”*. E o seu parágrafo 2º - *“Cabe aos hospitais, laboratórios, clínicas ou estabelecimentos similares a responsabilidade técnica e econômica pelo projeto, construção e operação das instalações de tratamento necessárias ao cumprimento do disposto no caput”*. A iniciativa impede que os resíduos hospitalares sejam jogados sem tratamento nos rios e lagoas da cidade, o que compromete a saúde pública e desrespeita as leis ambientais.

É importante esclarecer que, a Resolução CONAMA nº 430/2011 (BRASIL, 2011c), dispõe sobre condições, parâmetros, padrões e diretrizes para gestão do lançamento de efluentes em corpos de água receptores. O Art. 3 destaca: *“Os efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados diretamente nos corpos receptores após o devido tratamento e desde que obedeçam às condições, padrões e exigências dispostos nesta Resolução e em outras normas aplicáveis”*. E o Art. 18 destaca: *“O efluente não deverá causar ou possuir potencial para causar efeitos tóxicos aos organismos aquáticos no corpo receptor, de acordo com os critérios de ecotoxicidade estabelecidos pelo órgão ambiental competente”*.

Devido a relevância do tema e a ausência de dados sobre a diversidade associada ao resistoma microbiano em efluentes hospitalares brasileiros, a realização desse estudo possibilitará uma melhor avaliação do resistoma desses efluentes, bem como, a divulgação dados inéditos sobre o tema no Brasil.

3. OBJETIVOS

3.1. GERAL

Determinar a estrutura taxonômica e o resistoma de comunidades microbianas e suas alterações no resíduo líquido tratado de uma ETEH na cidade do Rio de Janeiro

3.2. ESPECÍFICOS

- Realizar dosagens de parâmetros físicos e químicos dos pontos de coleta (afluente e efluente da ETEH): pH, turbidez, condutividade, oxigênio dissolvido, temperatura, salinidade e cloro;
- Identificar isolados de *P. aeruginosa*, determinar a susceptibilidade aos antimicrobianos e constituir uma coleção representativa dos isolados;
- Caracterizar a diversidade bacteriana do afluente e efluente da ETEH pelo sequenciamento de nova geração da região V4 do gene *rrs* do 16S rDNA;
- Determinar o resistoma microbiano do afluente e efluente da ETEH através do sequenciamento massivo de genes de resistência;
- Realizar análises taxonômicas e filogenéticas e calcular as coberturas do sequenciamento pelo banco de dados MG-RAST;
- Analisar os genes de resistência a antibióticos pelos bancos de dados ARDB e CARD.

4. METODOLOGIA

4.1. AMBIENTE SELECIONADO PARA O ESTUDO

4.1.1. Hospital Municipal Raphael de Paula Souza

O Hospital Municipal Raphael de Paula Souza, localizado em Curicica, Rio de Janeiro (latitude/longitude: 23°8'40.12"S/43°2'14.97"O), possui 602 funcionários (médicos e outros) e 67 leitos, distribuídos entre os setores de cirurgia geral, ginecologia, AIDS, clínica geral, pneumologia, pediatria clínica e pneumologia sanitária. É um hospital de média e alta complexidade, com ênfase para atividades na área de clínica médica, com um perfil assistencial de internação e de tratamento ambulatorial e com uma média diária de 582 atendimentos (CNES, 2015). A ETEH tem capacidade para tratar 220 mil litros de esgoto por dia, e realiza o tratamento classificado como terciário com objetivo de evitar o lançamento de esgoto sem tratamento no Rio Pavuninha, ou seja, além de realizar a fase primária (remoção de sólidos flutuantes) e a fase secundária (controle biológico), completa o tratamento com a adição de um produto químico (cloro) (Figuras 5 e 6).

As coletas foram realizadas com a autorização da Secretaria Municipal de Saúde (SMS) do Rio de Janeiro (Ofício S/Subg nº 317/2013).

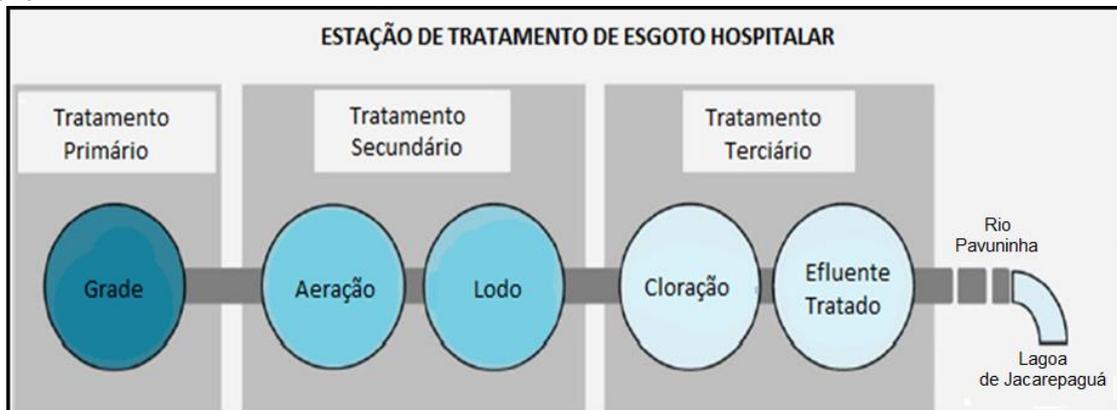
Figura 5. Vista da estação de tratamento de esgoto do Hospital Municipal Raphael de Paula Souza



4.2. AMOSTRAS

Foram realizadas 2 coletas de esgoto na ETEH: uma em agosto de 2013 e outra em fevereiro de 2014. Amostras de 500 mL do esgoto líquido antes do tratamento (afluente) e 500 mL do esgoto líquido após o tratamento (efluente) foram recolhidas de forma asséptica, em triplicata, a intervalos de 15 minutos em frascos de vidro estéreis. As amostras foram mantidas no gelo (4°C) e transportadas ao laboratório em recipiente isotérmico.

Figura 6. Esquema da estação de tratamento de esgoto do Hospital Municipal Raphael de Paula Souza



4.3. PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS

Foram analisados os seguintes parâmetros abióticos: temperatura, pH, condutividade, oxigênio dissolvido (OD), turbidez e salinidade com o equipamento Water Quality Checker U-10 (Horiba®), e a dosagem de cloro com o medidor de cloro (Homis®) nos pontos (afluente e efluente), logo após a coleta.

4.4. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA DE *P. aeruginosa*

Após a coleta, alíquotas de 20 µL das amostras foram diretamente semeadas em meio de cultura seletivo para *P. aeruginosa* (ágar cetrímide) e incubadas em estufa a 37°C por 24 horas. Os isolados bacterianos foram submetidos à identificação fenotípica presuntiva por meio da coloração de Gram e teste da oxidase.

4.5. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *P. aeruginosa*

4.5.1. Extração e purificação do DNA genômico

As culturas puras obtidas no ágar cetrímide foram submetidas à extração de DNA genômico segundo o protocolo *Pretreatment for Gram - Negative Bacteria* do *Dnaeasy Tissue Kit* (Qiagen®). Uma alça bacteriológica do crescimento bacteriano foi ressuspensa no tampão indicado e foi seguido todo o procedimento de acordo com as instruções do fabricante. A integridade do DNA genômico foi verificada em gel de agarose em Tris-Borato-EDTA 0,5X (TBE 0,5X), corado com brometo de etídio (3 mg/mL) e revelado em um sistema de vídeo documentação GE ImageQuant 300.

4.5.2. Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

Foi realizada a confirmação da identificação das cepas de *P. aeruginosa* pela PCR. A mistura de cada amostra totalizou 50 µL e foi composta pelos seguintes reagentes: 25 pmol/µL dos iniciadores específicos para *P. aeruginosa* (PA-SS-F e PA-SS-R) (SPILKER et al, 2004) (Tabela 1), 2 mM de MgCl₂, 200 µM de cada deoxinucleotídeo trifosfato (dNTPs - dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 1U/µL de *Taq* DNA polimerase, solução-tampão da PCR 1X (20mM Tris-HCl-pH 8.4, 50mM KCl), aproximadamente 50ng do DNA da amostra e água deionizada estéril (INVITROGEN®) q.s.p 50 µL. As cepas de referência *P. aeruginosa* INCQS: 00027/ATCC (American Type Culture Collection) 29336 e *E. coli* INCQS: 00031/ATCC 10536 foram empregadas para avaliar a especificidade dos iniciadores (controles das amostras) e uma alíquota de água deionizada estéril foi empregada para avaliar a ausência de DNA contaminante na mistura da PCR (controle da reação).

A amplificação ocorreu nas seguintes condições: desnaturação inicial 95°C por 2 minutos; 30 ciclos: 94°C por 20 segundos, 55°C por 20 segundos e extensão a 72°C por 40 segundos e uma extensão adicional a 72°C por 1 minuto.

Para visualização dos produtos amplificados, alíquotas de 10 µL dos produtos da reação foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,5% (Sigma®), a 70

volts por 50 minutos. Como tampão de corrida utilizou-se TBE 0,5X. Submeteu-se também à corrida eletroforética o padrão de peso molecular (100 pb DNA ladder INVITROGEN®). A coloração do gel foi realizada com solução de brometo de etídio (10 mg/mL) e foi analisada através do sistema de vídeo documentação ImageQuant 300 (GE Healthcare). Os produtos da PCR foram purificados pelo Kit *QIAquick PCR Purification* (Qiagen®).

Tabela 1. Iniciadores para amplificação do gene *rrs* 16S RNA utilizados neste estudo

iniciadores *	Sequência (5'- 3')	Gene alvo	Posição	Tamanho (bp)
PA-SS-F	GGGGGATCTTCGGACCTCA	SSU rRNA <i>P. aeruginosa</i>	189 – 206	956
PA-SS-R	TCCTTAGAGTGCCACCCG	SSU rRNA <i>P. aeruginosa</i>	1124 – 1144	

* F (*forward*) and R (*reverse*) são designações para a orientação do *primer* em relação ao rDNA

4.6. SEQUENCIAMENTO

Após a extração e purificação dos DNA, quatro isolados de *P. aeruginosa* do afluente e do efluente foram aleatoriamente selecionados, para a realização do sequenciamento. O DNA dos isolados foi quantificado e suas concentrações ajustadas para 200 ng/μL.

Utilizou-se o kit *BigDye Terminator Cycle Sequencing* e a reação de sequenciamento foi constituída de 5,5 μL de DNA (200 ng), 2 μL de iniciador (PA-SS-F) (1,6 pmol/μL), 1 μL de reativo *BigDye* (Applied Biosystems), 1,5 μL de tampão *BigDye*, em um volume final de 10 μL. A reação de sequenciamento foi conduzida em termociclador Apollo™ ATC 401 com as seguintes condições: 40 ciclos de 94°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos. A seguir, o produto das reações foi precipitado adicionando-se a cada poço 30 μL de isopropanol 75%. A placa foi levada à agitador tipo vortex e submetida a um *spin* por 10 segundos a 1000 rpm. A placa ficou em repouso sob proteção da luz por 15 minutos. A placa foi centrifugada por 90 minutos a 2000 rpm. O sobrenadante foi desprezado, invertendo a placa em papel toalha. Foi colocada a placa invertida na mesa e foi realizado movimento circular com a placa para desprezar o excesso de isopropanol. Adicionou-se 50 μL de etanol 75% em cada poço. Centrifugou-se por 30 minutos a 2000 rpm. O sobrenadante foi desprezado, invertendo a placa em papel toalha. Foi colocada a

placa invertida na mesa e foi realizado movimento circular com a placa para desprezar o excesso de etanol. A placa foi colocada invertida na centrífuga e deu-se um pulso até 500 rpm. A placa foi deixada à temperatura ambiente, protegida da luz, por 2 horas para secar. Após, o DNA presente no poço da placa, foi ressuspenso em 5,5 µL de água (GIBCO®). Deixou-se em repouso por 1 hora e agitou-se no vortex.

Após, a placa foi encaminhada para o setor de sequenciamento (Plataforma PDTIS/FIOCRUZ) para a reação de desnaturação. A reação de sequenciamento foi realizada segundo metodologia padrão, por eletroforese capilar em um aparelho ABI Prism 3700 Genetic Analyzer Sequencer usando o kit *BigDye Terminator* (Plataforma PDTIS/FIOCRUZ).

4.7. SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

Para verificar a susceptibilidade aos antimicrobianos foi empregado o método de difusão de discos em ágar Mueller Hinton de acordo com as recomendações do Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI, 2014). Os discos de antimicrobianos (SENSIFAR) foram os seguintes: piperacilina/tazobactam (100/10 µg); ticarcilina/ácido clavulânico (75/10 µg); ceftazidima (30 µg); cefepima (30 µg); imipenem (10 µg); meropenem (10 µg); polimixina B (300 UI); aztreonam (30 µg); gentamicina (10 µg); tobramicina (10 µg); ciprofloxacino (5 µg) e levofloxacino (5 µg). As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Após este período, com o auxílio de um paquímetro, foi realizada a leitura das placas, medindo os diâmetros dos halos de inibição (em mm) do crescimento bacteriano presentes ao redor dos discos de antimicrobianos, e as amostras foram classificadas em sensíveis ou resistentes, utilizando-se os limites de sensibilidade estabelecidos pelo CLSI (2014). O controle da qualidade dos discos foi realizado frente às seguintes cepas microbianas de referência: *E. coli* INCQS 00033 (ATCC 25922) e *P. aeruginosa* INCQS 00099 (ATCC 27853), sob as mesmas condições de meio de cultivo e incubação. O critério utilizado para definir uma cepa como MDR, foi a resistência a três ou mais classes de antimicrobianos utilizados: penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos, aminoglicosídeos e quinolonas (MAGIORAKOS et al, 2012).

4.8. PRESERVAÇÃO DOS ISOLADOS

Logo após o isolamento, as cepas foram preservadas em glicerol 20% e estocadas a -70°C . Após a identificação fenotípica e molecular, os isolados foram preservados por liofilização e armazenados na Coleção de Micro-organismos do INCQS/FIOCRUZ.

4.9. EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO TOTAL

O procedimento usado para extração do DNA foi uma versão modificada dos protocolos descritos previamente (OGRAM; SAYLER; BARKAY, 1987; SMALLA et al, 1993; GROBKOPF; JANSSEN; LIESACK, 1998). Para a extração do DNA genômico, aproximadamente 1500 mL do resíduo líquido hospitalar de cada ponto (afluente e efluente) foi filtrado mediante pressão negativa (vácuo) através de membrana filtrante com porosidade de $0,22\ \mu\text{m}$ de diâmetro. Com o auxílio da alça de Drigalski, as membranas foram esfregadas com 1 mL de solução de PBS (tampão fosfato em salina). Após, o líquido foi colocado em tubos tipo eppendorfs que foram centrifugados a 2800 rpm por 15 minutos. O pellet foi ressuscitado em 1 mL de PBS, centrifugado a 5000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado (2 vezes). O pellet foi ressuscitado em 1 mL de PBS para ser submetido ao choque térmico (*Freeze-Thaw*): -70°C por 2 minutos; 65°C por 2 minutos (3 vezes). Foi acrescentado $125\ \mu\text{L}$ de lisozima e incubado por 1 hora a 37°C . Acrescentou-se $225\ \mu\text{L}$ de SDS (dodecil sulfato de sódio) 10%, homogeneizou-se e incubou-se por 10 minutos a 60°C . Foi acrescentado $300\ \mu\text{g}$ de pérolas de vidro ou zircão - Glass bead ($0,1\ \text{mm}$) e o tubo foi colocado no aparelho mini-beadbeater (Biospec Products) por 80 segundos à velocidade máxima (3 vezes). Centrifugou-se a 13000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi recolhido. A seguir, as amostras foram submetidas à extração de DNA genômico segundo o protocolo para bactéria Gram-positiva do kit *Dnaeasy® & Blood Tissue* (Qiagen®).

Para visualização da integridade do DNA genômico, alíquotas de $10\ \mu\text{L}$ dos DNA extraídos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% (Sigma®), a 70 volts por 50 minutos. Como tampão de corrida utilizou-se TBE 0,5X. Submeteu-se

também à corrida eletroforética o padrão de peso molecular (100 pb DNA ladder). A coloração do gel foi realizada com solução de brometo de etídio (10 mg/mL) e foi realizada a análise através do sistema de vídeo documentação ImageQuant 300 (GE Healthcare).

4.10. BIBLIOTECA DO GENE *rrs* 16S rRNA

4.10.1. Amplificação do gene *rrs* 16S rRNA

As amostras foram submetidas à reação de PCR para a amplificação do gene *rrs* 16S rRNA (alvo a região V4). O desenho dos iniciadores específicos foi realizado de acordo com CAPORASO et al (2011). O iniciador *forward* foi o mesmo utilizado para todas as amostras, mas o iniciador *reverse* variou (Tabela 2). Na sequência do iniciador *reverse* é encontrada uma sequência adaptadora complementar de pareamento 3' com a sequência contida na plataforma, uma sequência de código de barras (*barcodes*) que varia de um iniciador para outro, sequências estabilizadoras e a sequência específica para pareamento com o gene *rrs* 16S rRNA. Por se tratar de um sequenciamento multiplex, em que todas as amostras foram agrupadas, foi utilizado um iniciador *reverse* diferente para cada amostra poder ser diferenciada durante a leitura das sequências.

Foi utilizado o kit AccuPrime™ *Pfx* SuperMix (Life Technologies™). A mistura de cada reação foi composta pelos seguintes reagentes: 10 pmol do iniciador *forward* (515F) com a sequência estabelecida 5'AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC TATGGTAATT GT GTGCCAGCMGCCGCGGTAA3', 10 pmol do iniciador *reverse* (806R) (Tabela 2), 22 U da enzima AccuPrime™ *Pfx* DNA polimerase, Mix (66 mM Tris-SO₄ (pH 8.4), 30.8 mM (NH₄)₂SO₄, 11 mM KCl, 1.1 mM MgSO₄, 330 μM dNTPs), 3 ng de DNA totalizando 25 μL. A PCR foi preparada em triplicata para cada amostra.

Tabela 2. Sequência dos iniciadores *reverse* (806R) utilizados para cada amostra

Amostra	Adaptador	Barcode	Estabilizador	Específica 16S rRNA
1	3'CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	CTCACCTAGGAA	AGTCAGTCAG CC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT5'
2	3'CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	GTGTTGTCGTGC	AGTCAGTCAG CC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT5'
3	3'CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	CCACAGATCGAT	AGTCAGTCAG CC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT5'
4	3'CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	TATCGACACAAG	AGTCAGTCAG CC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT5'

Amostra 1: afluyente da 1ª coleta; Amostra 2: efluente da 1ª coleta; Amostra 3: afluyente da 2ª coleta; Amostra 4: efluente da 2ª coleta

A amplificação do gene *rrs* 16S rRNA foi realizada no termociclador AB Applied Biosystems. Os ciclos de amplificação foram os mesmos para todas as amostras, e programados da seguinte forma:

95°C – 2 minutos	} 28 ciclos
95°C – 20 segundos *	
50°C – 30 segundos **	
68°C – 1 minuto 30 segundos ***	
68°C – 10 minutos	

*Desnaturação; **Anelamento; ***Extensão

4.10.2. Purificação do DNA e Sequenciamento

Os produtos da PCR foram purificados pelo Kit *QIAquick PCR Purification* (Qiagen®), seguindo as instruções do fabricante. Após, a concentração final do produto foi realizada a quantificação por fluorometria no aparelho Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen).

O sequenciamento do DNA dos micro-organismos foi realizado de acordo com o protocolo Miseq Reagent Nano Kit v.2 na plataforma MiSeq (Illumina®), localizada no Laboratório de Genoma, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

A análise das sequências, a identificação das unidades taxonômicas e a comparação entre dois conjuntos de dados metagenômicos diferentes baseou-se no sistema acessível na web que fornece um conjunto de ferramentas para análise e visualização de dados metagenômicos, o MG-RAST (Metagenomics Rapid Annotation using Subsystem Technology) (<http://metagenomics.anl.gov/>) (MEYER et al, 2008).

4.11. SELEÇÃO FUNCIONAL DE GENES DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

4.11.1. Biblioteca genômica (*Shotgun*) e Sequenciamento

As amostras obtidas no item 4.9 foram preparadas utilizando o Illumina TruSeq Nano DNA library preparation Kit, seguindo as recomendações do fabricante.

O sequenciamento do DNA dos micro-organismos foi realizado de acordo com o protocolo Miseq Reagent Kit v.3 na plataforma MiSeq (Illumina®), localizado no Laboratório de Genoma da UERJ.

4.11.2. Identificação de genes de resistência a antimicrobianos

A anotação dos genes de resistência aos antimicrobianos foi realizada pelo banco de dados ARDB (Antibiotic Resistance Genes DataBase) (<http://ardb.cbc.umd.edu/index.html>) (LIU; POP, 2009) e pela base de dados CARD (Comprehensive Antibiotic Resistance Database) (<http://arpcard.mcmaster.ca/>) (MCARTHUR et al, 2013).

5. RESULTADOS

5.1. PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS

O pH do afluente e do efluente da ETEH na primeira coleta foi 6,7 e 5,8, respectivamente, enquanto que na segunda coleta foi 6,5 e 7,01, dentro da faixa de pH de crescimento da maioria dos micro-organismos, inclusive a *P. aeruginosa* (Tabela 3). A turbidez apresentou concentrações mais elevadas na segunda coleta do que na primeira coleta. A turbidez foi maior no afluente da segunda coleta, principalmente devido à presença de partículas suspensas na água. A presença de matéria orgânica, micro-organismos e outros materiais diversos provocam a dispersão e a absorção da luz, dando à água uma aparência nebulosa (Tabela 3).

Os níveis de oxigênio dissolvido (OD) apresentaram o maior valor no efluente da segunda coleta, onde o pH se manteve neutro e elevou os níveis de OD que é essencial para os micro-organismos biodegradadores de matéria orgânica. A temperatura dos pontos da primeira coleta foi 26°C, enquanto que na segunda coleta foi 26,7°C (afluente) e 26,9°C (efluente), favorecendo as formas mesófilas presentes (Tabela 3).

A concentração de cloro foi nula nos dois pontos das duas coletas (Tabela 3).

Tabela 3. Parâmetros físicos e químicos dos pontos de coleta da ETEH

Parâmetros	Escala	Pontos da 1ª coleta		Pontos da 2ª coleta	
		afluente	efluente	afluente	efluente
pH	0 - 14	6,7	5,8	6,5	7,01
Condutividade (MS/cm)	0 - 100	0,39	0,35	0,45	0,30
Turbidez (UNT)	0 - 800	17	14	107	80
OD (mg/L)	0 - 19,9	1,7	1,1	1,64	2,30
Temperatura (°C)	0 - 50	26	26	26,7	26,9
Salinidade (%)	0 - 4	0,0	0,0	0,0	0,0
Cloro (ppm)	0,01 - 10	0	0	0	0

Os valores da escala foram estabelecidos de acordo com o manual dos equipamentos Horiba® e Extech®.

5.2. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *P. aeruginosa*

Após 24 horas de incubação, as 2 placas de ágar cetrimide (afluente e efluente da ETEH) da primeira coleta, e as 2 da segunda coleta apresentaram crescimento bacteriano uniforme. Foram selecionadas aleatoriamente (afluente e efluente da ETEH) um total de 57 colônias: 29 colônias do afluente e 28 colônias do efluente. Cinquenta e sete isolados apresentaram colônias com pigmento esverdeado e odor adocicado. A coloração de Gram dos 57 isolados revelou a presença de bactérias Gram-negativas na forma de bastonetes. Todos os isolados apresentaram resultados positivos para o teste de produção de oxidase. Cinquenta e sete isolados foram suspeitos de *P. aeruginosa*. Estes foram estocados em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) com glicerol 20% a -20°C.

5.3. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *P. aeruginosa*

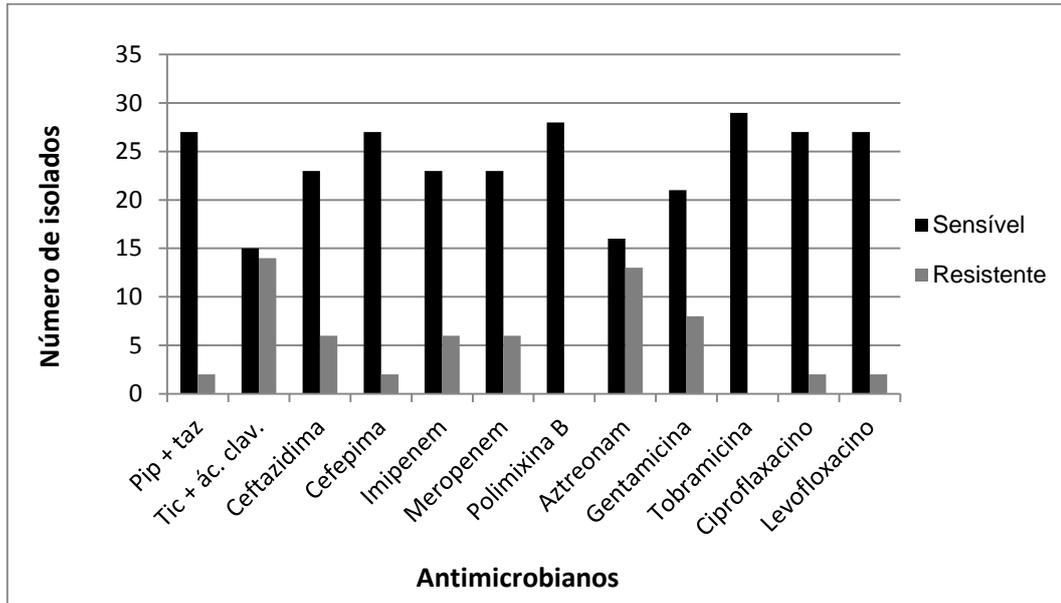
Os 57 isolados suspeitos de *P. aeruginosa* foram confirmados como *P. aeruginosa*, após PCR usando iniciadores específicos, e apresentando fragmentos de 956 bp. Após o sequenciamento, a análise de identidade das sequências foi realizada pelo programa BLASTn e as 57 sequências dos isolados apresentaram 97-98% de similaridade com o gene *rrs* do 16S rRNA de *P. aeruginosa*.

5.4. AVALIAÇÃO DOS PERFIS DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

Os 57 isolados de *P. aeruginosa* foram suscetíveis aos antimicrobianos polimixina B (100%) e tobramicina (100%). Os isolados de *P. aeruginosa* apresentaram maior resistência aos antimicrobianos ticarcilina/ácido clavulânico (48,3%), aztreonam (44,8%) e gentamicina (27,5%) no afluente da ETEH e aos antimicrobianos aztreonam (35,7%), ticarcilina/ácido clavulânico (28,6%), gentamicina (14,3%) e meropenem (14,3%) no efluente da ETEH (Gráficos 1 e 2).

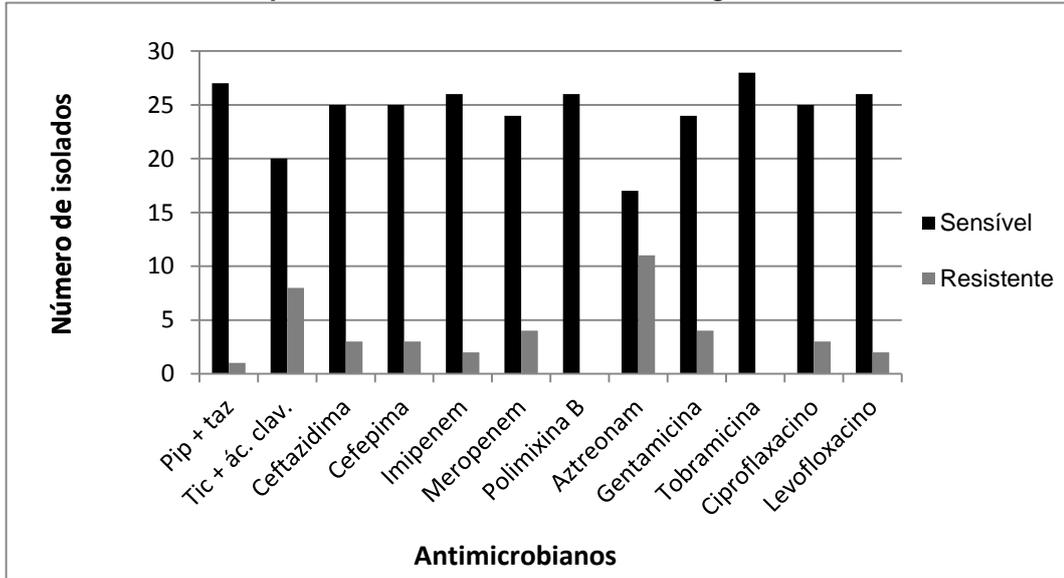
Treze isolados de *P. aeruginosa* do afluente (44,83%) apresentaram perfil de multidroga resistente (MDR \geq 3 classes) e foram classificados como MDR e seis isolados de *P. aeruginosa* do efluente (21,43%) apresentaram perfil de multidroga resistente e foram classificados como MDR (Tabela 4).

Gráfico 1. Perfil de susceptibilidade dos isolados de *P. aeruginosa* do afluente da ETEH



Pip + taz = piperacilina + tazobactam; Tic + ác.clav. = ticarcilina + ácido clavulânico

Gráfico 2. Perfil de susceptibilidade dos isolados de *P. aeruginosa* do efluente da ETEH

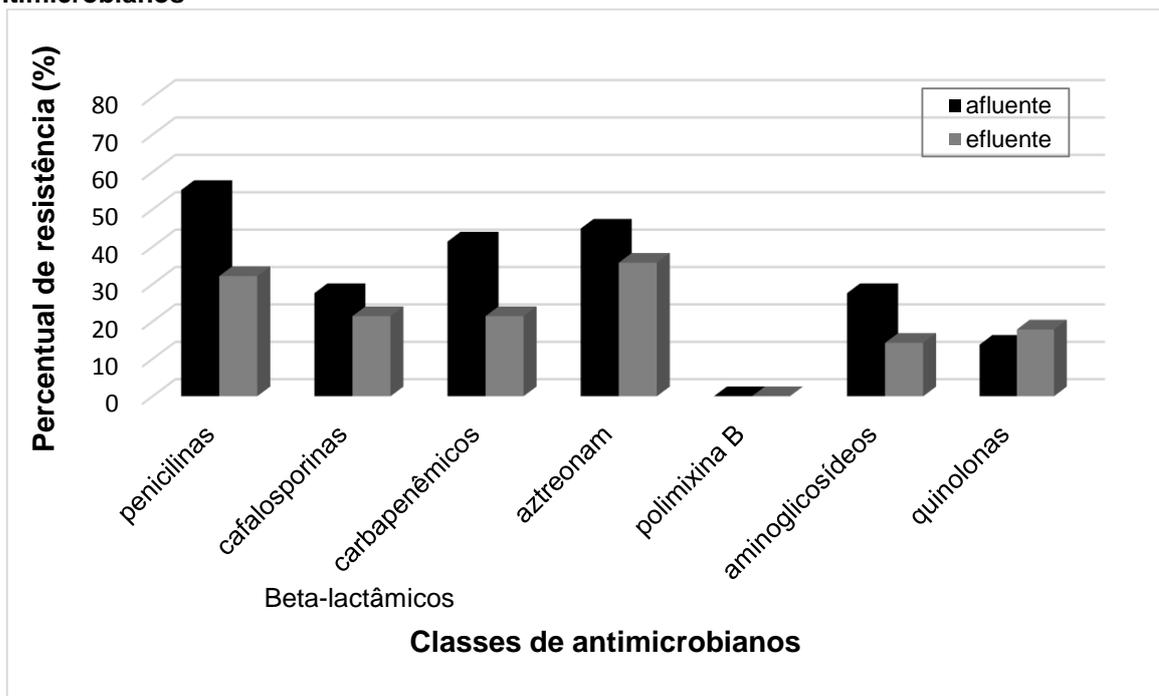


Pip + taz = piperacilina + tazobactam; Tic + ác.clav. = ticarcilina + ácido clavulânico

(PIP/TAZ) piperacilina/tazobactam; (TIC/ÁC.CL) ticarcilina/ácido clavulânico; (CAZ) ceftazidima; (CEF) cefepima; (IMI) imipenem; (MER) meropenem; (POL) polimixina b; (AZT) aztreonam; (GEN) gentamicina; (TOB) tobramicina, (CIP) ciprofloxacino; (LEV) levofloxacino. Quadrado preenchido – resistência aos antimicrobianos, quadrado vazio – susceptibilidade aos antimicrobianos, MDR – multidroga resistente

A análise comparativa do percentual de resistência de isolados de *P. aeruginosa* do afluente hospitalar e de isolados do efluente em relação às classes de antimicrobianos mostrou que os isolados do afluente apresentaram percentuais superiores de resistência à classe das penicilinas, as cefalosporinas, ao aztreonam e aos aminoglicosídeos que os do efluente. Os isolados do efluente apresentaram maior percentual de resistência às quinolonas (Gráfico 3).

Gráfico 3. Percentual de resistência dos isolados de *P. aeruginosa* frente às classes de antimicrobianos



5.5. CARACTERIZAÇÃO DO METAGENOMA DO AFLUENTE E EFLUENTE DA ETEH

5.5.1. ANÁLISE DOS DADOS GERADOS A PARTIR DA AMPLIFICAÇÃO DO GENE *rrs* 16S RIBOSSOMAL

5.5.1.1. Diversidade taxonômica

Foi demonstrada a predominância do domínio Bacteria (99,9%) no afluente da ETEH e no efluente da ETEH (99,6%) (Gráfico 4), como esperado em função da metodologia utilizada. Com base no banco de dados SILVA SSU (PRUESSE et al, 2007), o domínio Bacteria foi caracterizado principalmente pela presença dos filos Proteobacteria, Firmicutes e Bacteroidetes no afluente e no efluente da ETEH (Gráfico 5 e 6).

Gráfico 4. Distribuição dos domínios da vida no afluente e efluente da ETEH

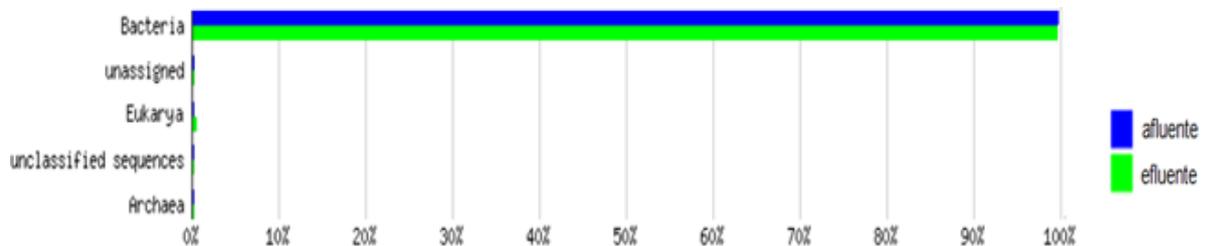


Gráfico 5. Abundância taxonômica do afluente da ETEH. O gráfico abaixo mostra a abundância de representantes dos filos dos domínios Bacteria, Eukarya e Archaea. Somente os 19 filos mais abundantes são mostrados. O eixo y representa graficamente a abundância de anotações em cada filo em uma escala logarítmica

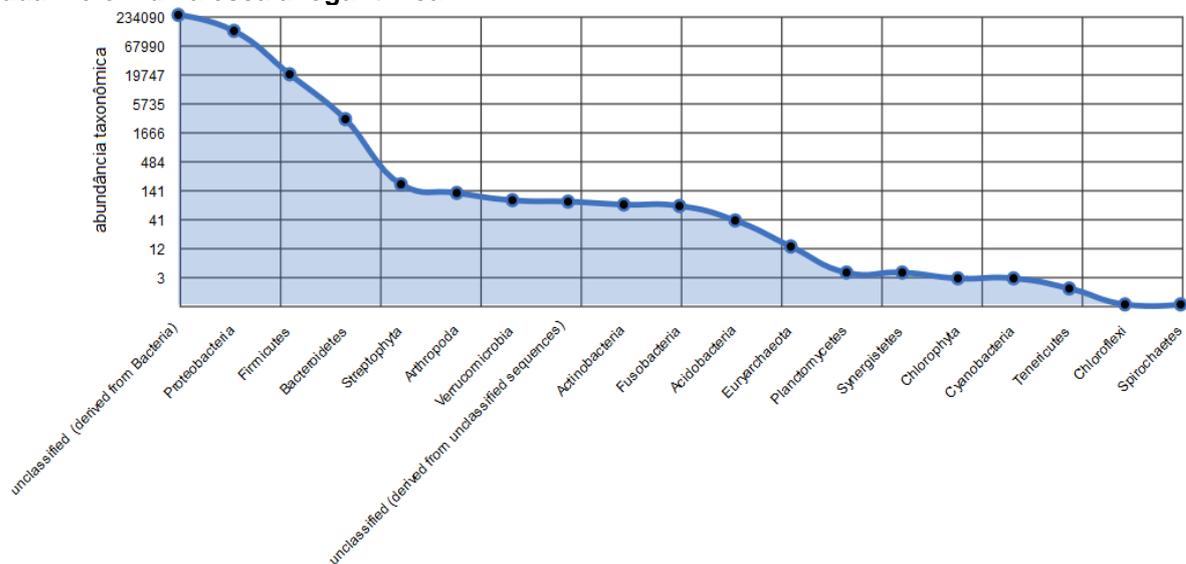
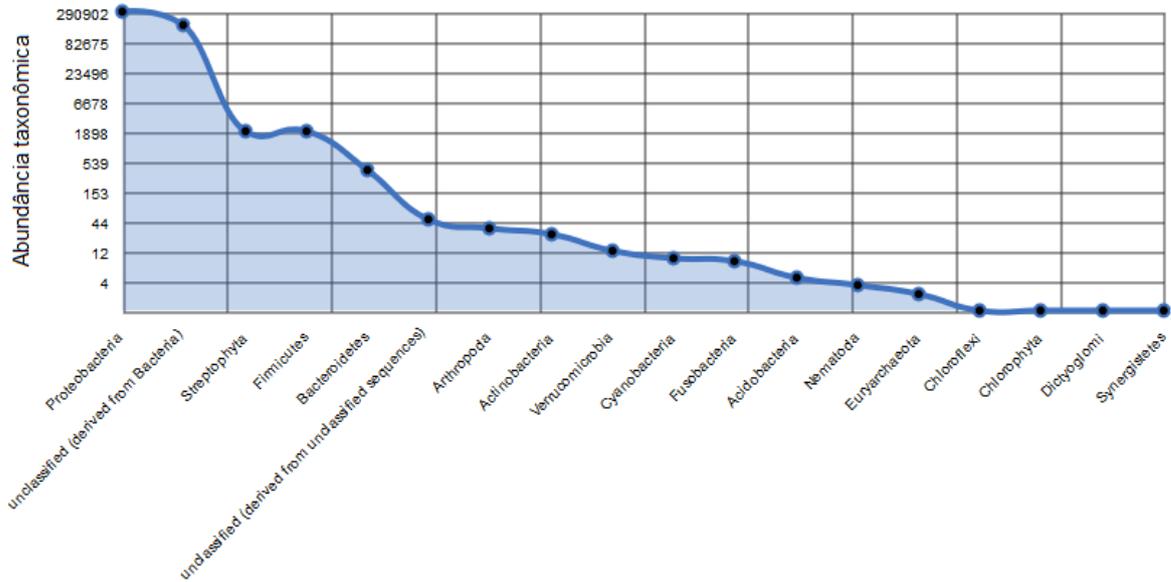
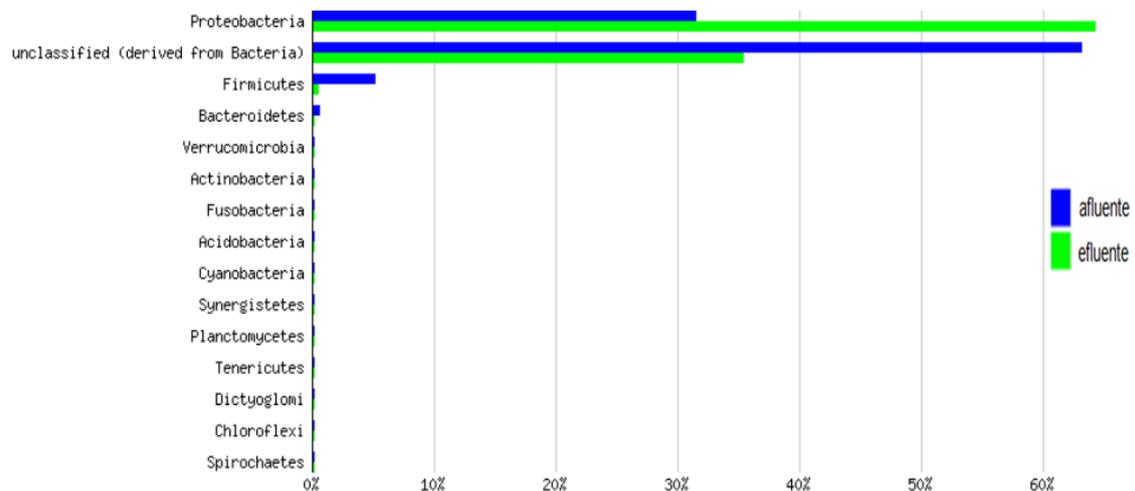


Gráfico 6. Abundância taxonômica do efluente da ETEH. O gráfico abaixo a abundância taxonômica de representantes dos filos dos domínios Bacteria, Eukarya e Archaea. Somente os 18 filos mais abundantes são mostrados. O eixo y representa graficamente a abundância de anotações em cada filo em uma escala logarítmica



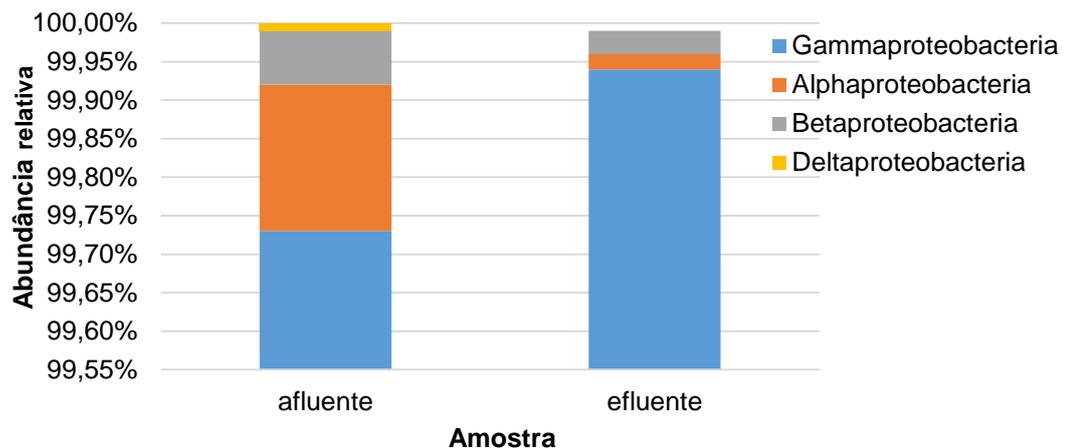
No afluente da ETEH, 62,7% das sequências derivadas do domínio Bacteria não foram classificadas, enquanto que no efluente, 35,3%. A elevada proporção de sequências não classificadas pode ser explicada pelo fato de o banco de dados não ser completo o suficiente para classificar a grande variedade de sequências obtidas (Gráfico 7). O filo Proteobacteria foi mais predominante no efluente (64,33%) que no afluente (31,35%), enquanto que o Firmicutes e o Bacteroidetes foram mais predominantes no afluente (Gráfico 7).

Gráfico 7. Distribuição dos filos no afluente e efluente da ETEH



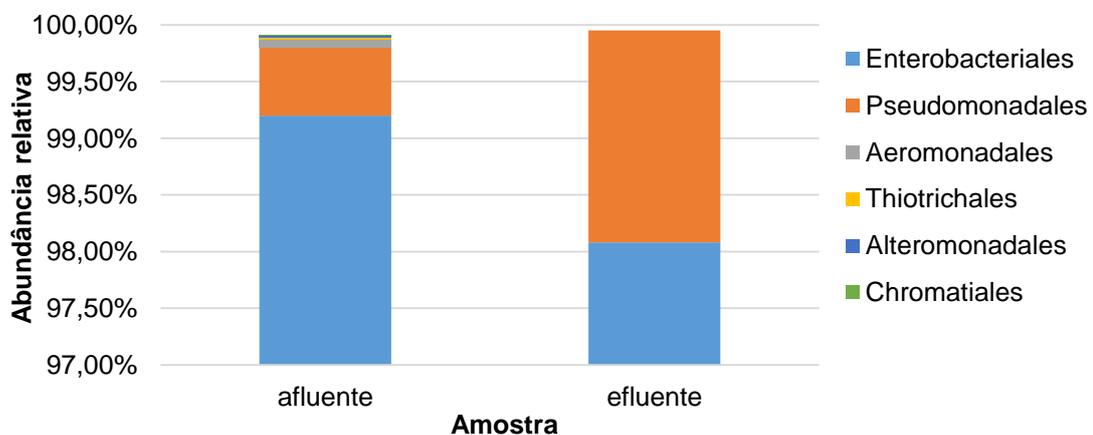
No domínio Bacteria, a classe predominante do filo Proteobacteria foi Gammaproteobacteria (99,73% no afluente) e (99,94% no efluente). Em menor abundância, foram as classes Alphaproteobacteria (0,19% e 0,02%), Betaproteobacteria (0,07% e 0,03%) e Deltaproteobacteria (0,01% e 0%) para afluente e efluente, respectivamente (Gráfico 8).

Gráfico 8. Distribuição taxonômica de classes do filo Proteobacteria presente no afluente e efluente da ETEH



Considerando a classe Gammaproteobacteria, as ordens predominantes foram Enterobacteriales (99,20% e 98,08%), Pseudomonadales (0,60% e 1,87%), Aeromonadales (0,07% e 0%), Thiotrichales (0,02% e 0%), Alteromonadales (0,01% e 0%) e Chromatiales (0,01% e 0%) para afluente e efluente, respectivamente (Gráfico 9).

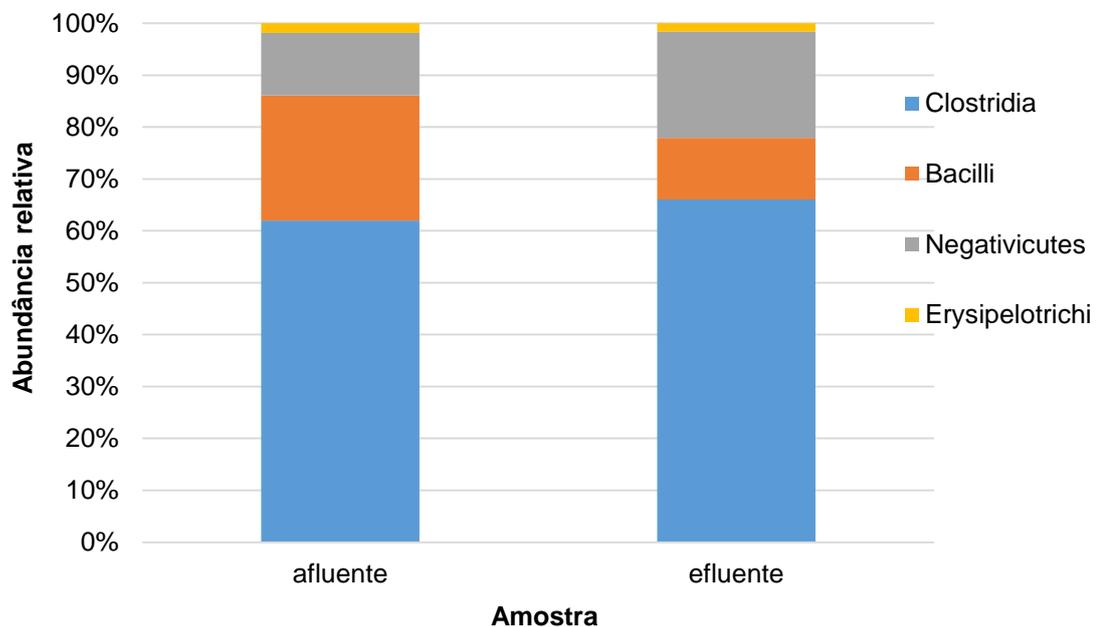
Gráfico 9. Distribuição taxonômica de ordens da classe Gammaproteobacteria presente no afluente e efluente da ETEH



Considerando a ordem Enterobacteriales, a família mais abundante foi Enterobacteriaceae, sendo os gêneros *Enterobacter*, *Salmonella* e *Buttiauxella* os mais prevalentes no afluente e efluente da ETEH.

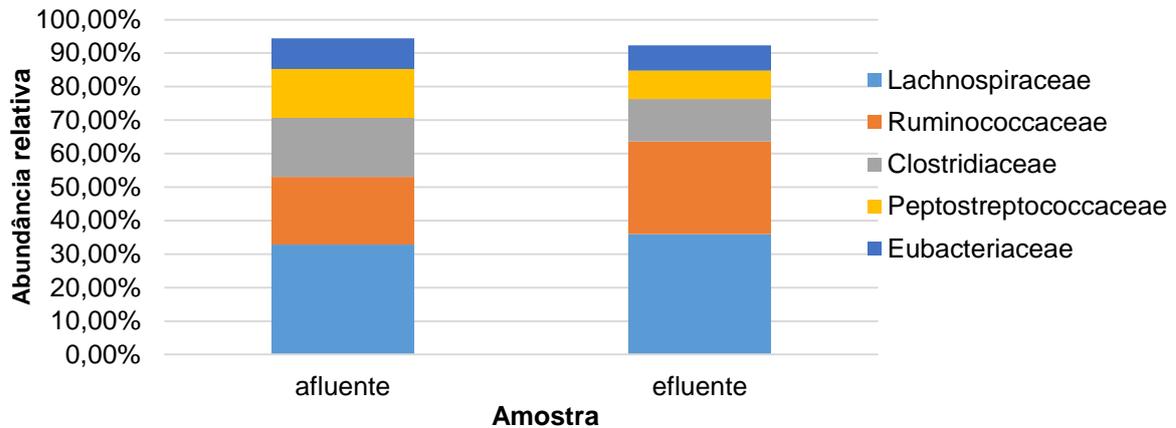
Considerando o filo Firmicutes, a classe mais abundante encontrada foi Clostridia (61,97% no afluente) e (66,06% no efluente), e em menor abundância, Bacilli (24,13% e 11,86%), Negativicutes (12,09% e 20,50%) e Erysipelotrichi (1,81% e 1,58%) para afluente e efluente, respectivamente (Gráfico 10).

Gráfico 10. Distribuição taxonômica de classes do filo Firmicutes presente no afluente e efluente da ETEH



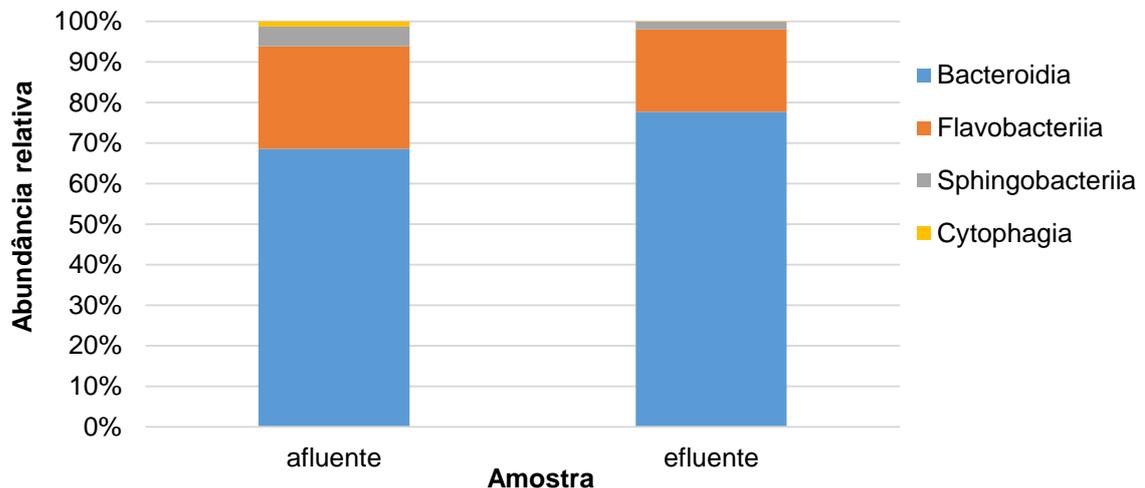
Em relação à classe Clostridia, 99,99% das sequências do afluente e 100% das sequências do efluente pertencem à ordem Clostridiales. Considerando a ordem Clostridiales, as famílias mais abundantes para afluente e efluente, respectivamente, foram: Lachnospiraceae (32,85% e 36,01%), Ruminococcaceae (20,19% e 27,60%), Clostridiaceae (17,61% e 12,70%), Peptostreptococcaceae (14,59% e 8,50%) e Eubacteriaceae (9,14% e 7,55%) (Gráfico 11). Dessas famílias, os gêneros mais prevalentes no afluente e efluente da ETEH foram: *Blautia*, *Ruminococcus*, *Faecalibacterium*, *Clostridium* e *Eubacterium*.

Gráfico 11. Distribuição taxonômica de famílias da ordem Clostridiales presente no afluente e efluente da ETEH



Considerando o filo Bacteroidetes, a classe mais abundante foi Bacteroidia com 68,59% no afluente e 77,43% no efluente. Em menor abundância, foram as classes Flavobacteriia (25,30% e 20,23%), Sphingobacteriia (4,90% e 1,95%) e Cytophagia (1,21% e 0,01%) para afluente e efluente, respectivamente (Gráfico 12).

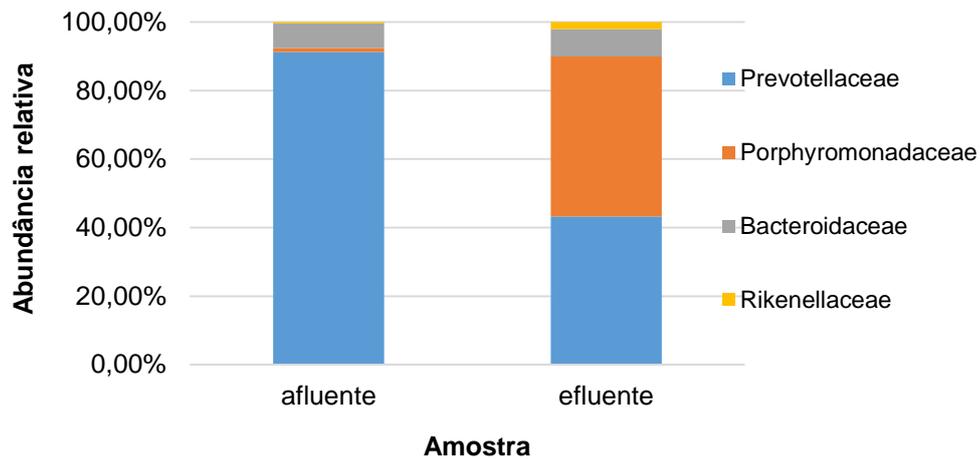
Gráfico 12. Distribuição taxonômica de classes do filo Bacteroidetes presente no afluente e efluente da ETEH



Em relação à classe Bacteroidia, 100% das sequências do afluente e do efluente pertencem à ordem Bacteroidales. Considerando a ordem Bacteroidales, as famílias mais abundantes para afluente e efluente, respectivamente, foram: Prevotellaceae (91,26% e 43,22%), Porphyromonadaceae (1,09% e 46,73%), Bacteroidaceae (7,31% e 8,04%) e Rikenellaceae (0,34% e 2,01%) (Gráfico 13).

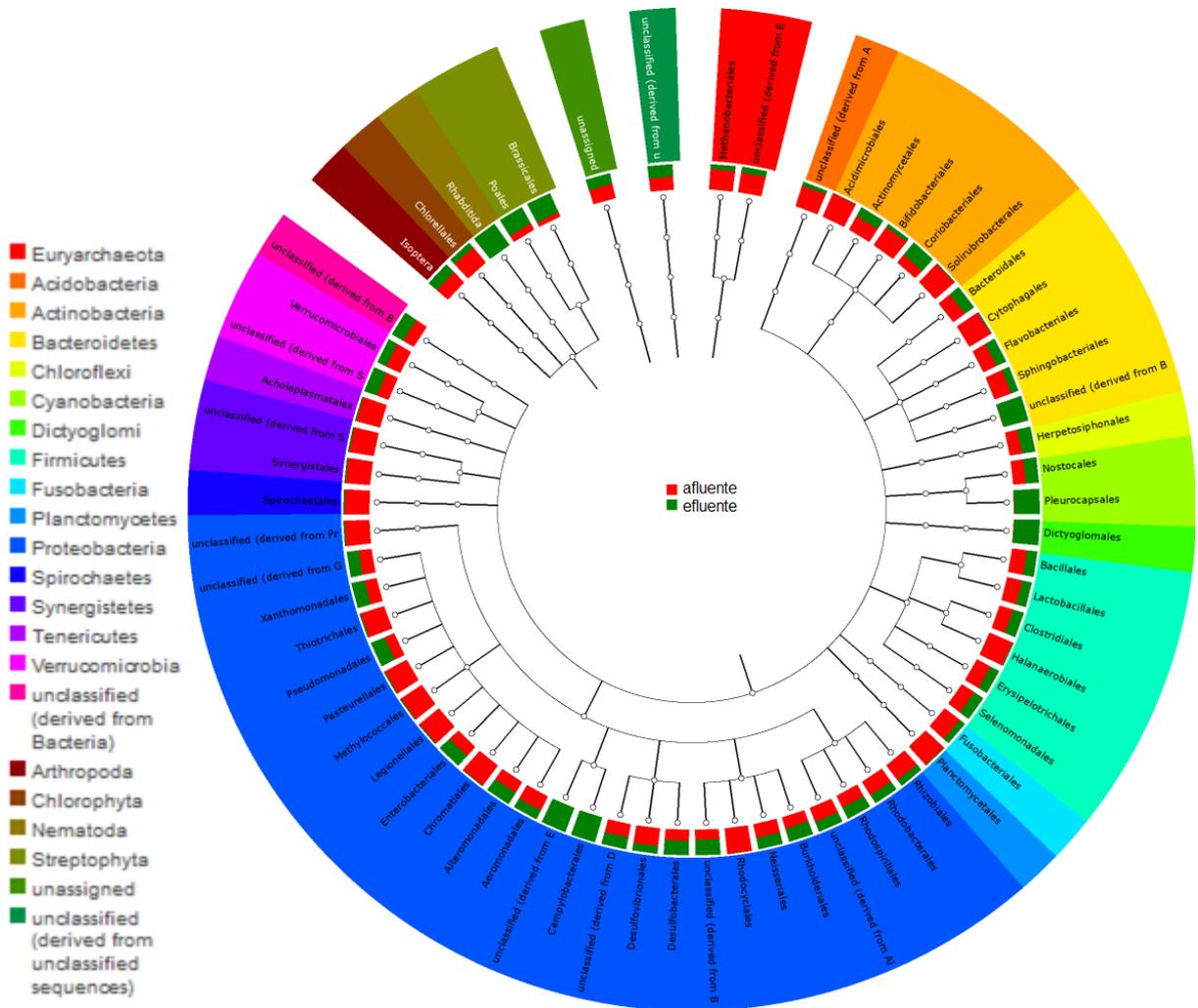
Dessas famílias, os gêneros mais prevalentes no afluente e efluente da ETEH foram: *Prevotella*, *Parabacteroides*, *Porphyromonas*, *Bacteroides* e *Alistipes*.

Gráfico 13. Distribuição taxonômica de famílias da ordem Bacteroidales presente no afluente e efluente da ETEH



A análise realizada através da plataforma MG-RAST, utilizando como referência o banco de dados SILVA SSU, permitiu a obtenção da árvore filogenética demonstrando também que dentro do Domínio Bacteria, os filos predominantes foram: Proteobacteria, Firmicutes e Bacteroidetes, tanto no afluente quanto no efluente da ETEH (Gráfico 14).

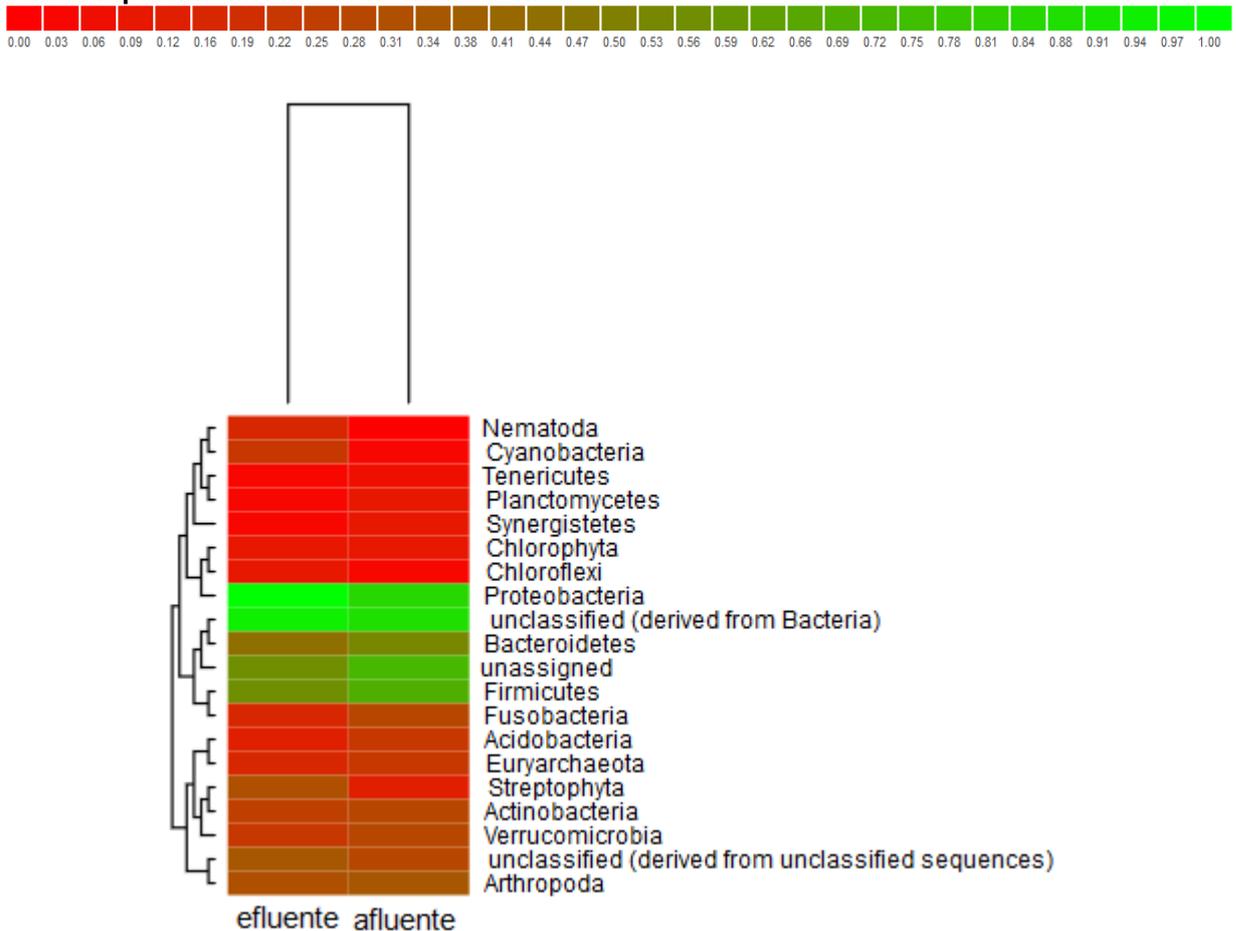
Gráfico 14. Árvore filogenética indicando os filos e suas ordens encontradas no afluente e efluente da ETEH. Agrupamento realizado pela plataforma MG-RAST, utilizando como referência o banco de dados SILVA SSU



A análise por *heatmap* foi utilizada para organizar as sequências obtidas baseadas nas semelhanças taxonômicas (Gráfico 15). O *heatmap* foi construído na plataforma do MG-RAST, utilizando como referência o banco de dados SILVA SSU, e agrupou as sequências de acordo com os filos. A análise mostrou que tanto na biblioteca do afluente da ETEH quanto na biblioteca do efluente houve alta abundância de sequências não classificadas derivadas do domínio Bacteria. Os grupos de maior abundância na biblioteca do afluente e efluente foram Proteobacteria, Firmicutes e Bacteroidetes, no domínio Bacteria.

Nesta análise podemos observar novamente os mesmos filos predominantes no domínio Bacteria já mencionados na classificação taxonômica do gene *rrs* 16S rRNA.

Gráfico 15. Heatmap mostrando o agrupamento dos filos baseado nas semelhanças taxonômicas das sequências. Linhas vermelhas representam baixa abundância do filo e linhas verdes representam alta abundância do filo

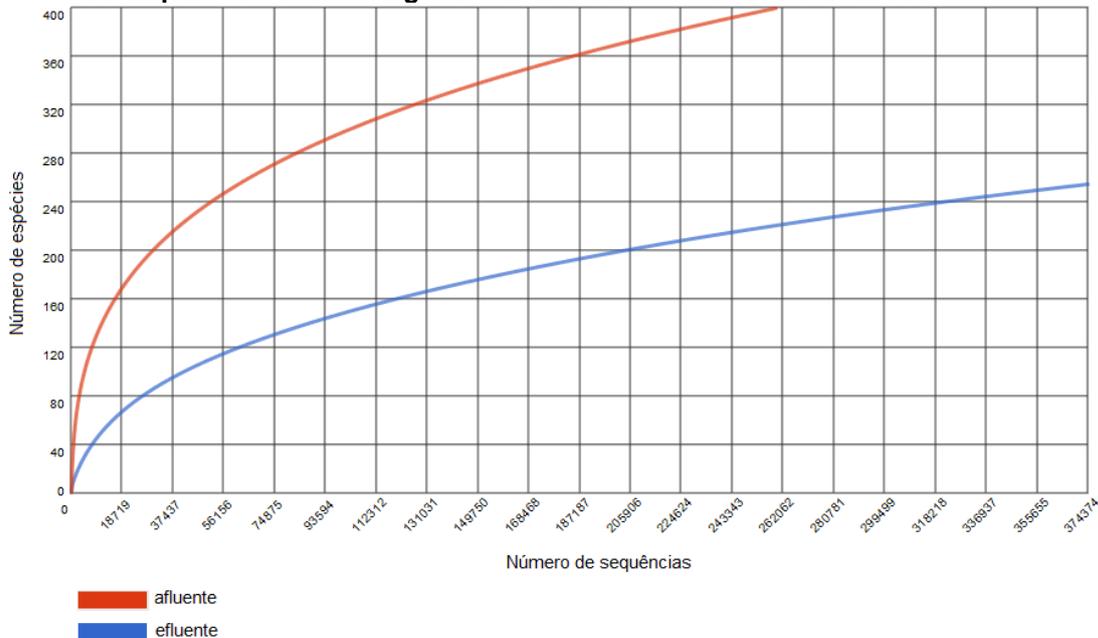


5.5.1.2. Curva de rarefação

Curvas de rarefação foram construídas após a anotação das sequências na plataforma MG-RAST com o objetivo de se verificar a variação na riqueza de espécies e na diversidade microbiana entre as amostras avaliadas (Gráfico 16). As curvas de rarefação obtidas plotando a contagem de espécies encontradas na biblioteca em relação ao número de sequências demonstrou tendência à estabilidade. As amostras mostraram curvas de rarefação pouco íngremes à esquerda e quase planas à direita, indicando que a amostragem e o sequenciamento foram responsáveis por uma boa

cobertura das espécies que compõem esse ambiente. A diversidade alfa no afluente da ETEH (3,03) foi maior que no efluente (2,27), indicando maior diversidade de espécies.

Gráfico 16. Curvas de rarefação extraídas da plataforma MG-RAST, mostrando a disposição dos reads do sequenciamento metagenômico entre as 2 amostras analisadas



5.6. ANOTAÇÃO FUNCIONAL DAS COMUNIDADES MICROBIANAS

As sequências obtidas nas bibliotecas genômicas foram analisadas no banco de dados ARDB e CARD.

A ferramenta *Resistance Gene Identifier* (RGI) *Version 2*, fornece uma anotação automática de sequências de DNA com base nos dados disponíveis no site CARD, proporcionando assim uma previsão de genes de resistência a antibióticos. Os contigs foram enviados para o RGI e obtivemos 33 genes de resistência aos antibióticos no afluente da ETEH. A maioria dos genes de resistência a antibióticos foi do tipo efluxo (25), de resistência a beta-lactâmicos (2) e de resistência a glicopeptídeo (6) (Gráfico 17). A Tabela 5 mostra a relação das *opening reading frame* (*orf*), genes de resistência e identidade bacteriana no afluente da ETEH gerados no banco de dados CARD. No efluente, obtivemos 29 genes de resistência aos antibióticos. A maioria dos genes de resistência a antibióticos foi do tipo efluxo (23), de resistência a

Tabela 5. Relação das orfs, genes de resistência e identidade bacteriana no afluente hospitalar gerados no banco de dados CARD

open reading frame	Genes de resistência	BLASTp Hit in CARD	e-value	ID (%)
Orf32	<i>ampC</i>	<i>Escherichia coli</i> _strain_MEV_AmpC_(<i>ampC</i>)_gene	1e-175	76,38
Orf13	<i>oxa59</i>	<i>Burkholderia pseudomallei</i> _K96243_chromosome_2	2e-159	100
Orf5	<i>vanrA</i>	<i>Bacillus circulans</i> _vanR_gene	2e-127	92,64
Orf3	<i>vanrG</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> _VanRG_vancomycin_resistance_operon	2e-137	100
Orf31	<i>vansB</i>	<i>Clostridium hathewayi</i> _strain_MLG661_VanSB_(<i>vanSB</i>)_gene	0.0	97,81
Orf12	<i>vansG</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> _vanG_vancomycin_resistance_locus	0.0	97,55
Orf27	<i>vanwB</i>	<i>Enterococcus faecium</i> _Aus0085	1e-161	97,82
Orf14	<i>vanwG</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> _VanG_vancomycin_resistance_operon	2e-147	100
Orf9	<i>acrA</i>	<i>Enterobacter cloacae</i> _AcrA_(<i>acrA</i>)_gene	0.0	100
Orf0	<i>acrB</i>	<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i> ATCC 13047	0.0	73,54
Orf1	<i>mexB</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	0.0	95,83
Orf2	<i>mexD</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> _membrane_fusion_protein_MexD gene	0.0	100
Orf10	<i>ceoB</i>	<i>Burkholderia cepacia</i> _CeoB_(<i>ceoB</i>)_gene	0.0	100
Orf11	<i>mexF</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> _pv._phaseolicola_1448A	0.0	86,06
Orf20	<i>mexY</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> _gene_for_MexX_and_MexY	0.0	100
Orf28	<i>mexC</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> membrane fusion protein <i>MexC</i>	0.0	100
Orf29	<i>smeE</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> _D457	0.0	99,90
Orf8	<i>tolC</i>	<i>Escherichia coli</i> _strain_0919S911_TolC_(<i>tolC</i>)_gene	0.0	100
Orf15	<i>mexA</i>	<i>Pseudomonas knackmussii</i> _B13_complete_genome	5e-170	79,78
Orf24	<i>oprM</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	0.0	100
Orf4	<i>mexW</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	1e-30	100
Orf7	<i>oqxB</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain 324-FL <i>OqxB</i> (<i>oqxB</i>)	0.0	100
Orf18	<i>mexI</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> _PA38182	0.0	99,09
Orf25	<i>macA</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> _MacA_(<i>macA</i>)_gene	0.0	100
Orf6	<i>macB</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> _subsp._pneumoniae_MGH_78578	0.0	71,38
Orf21	<i>oprJ</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> _membrane_fusion_protein_OprJ	0.0	100
Orf16	<i>mexE</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> _F113	7e-157	71,18
Orf22	<i>oprN</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> _oprN_genes_strain_PAO1	0.0	96,61
Orf17	<i>mexH</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> _LESB58	0.0	100
Orf30	<i>mdtK</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> _str._Kp52.145	0.0	87,31
Orf26	<i>amrA</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> _transcriptional_regulator_putative_membrane	0.0	100
Orf19	<i>mexX</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> _gene_for_MexX	0.0	100
Orf23	<i>mdtP</i>	<i>Burkholderia cenocepacia</i> _H111_chromosome_2	2e-144	85,44

Gráfico 18. *Orf* referentes a genes de resistência a antibióticos no efluente gerados no banco de dados CARD

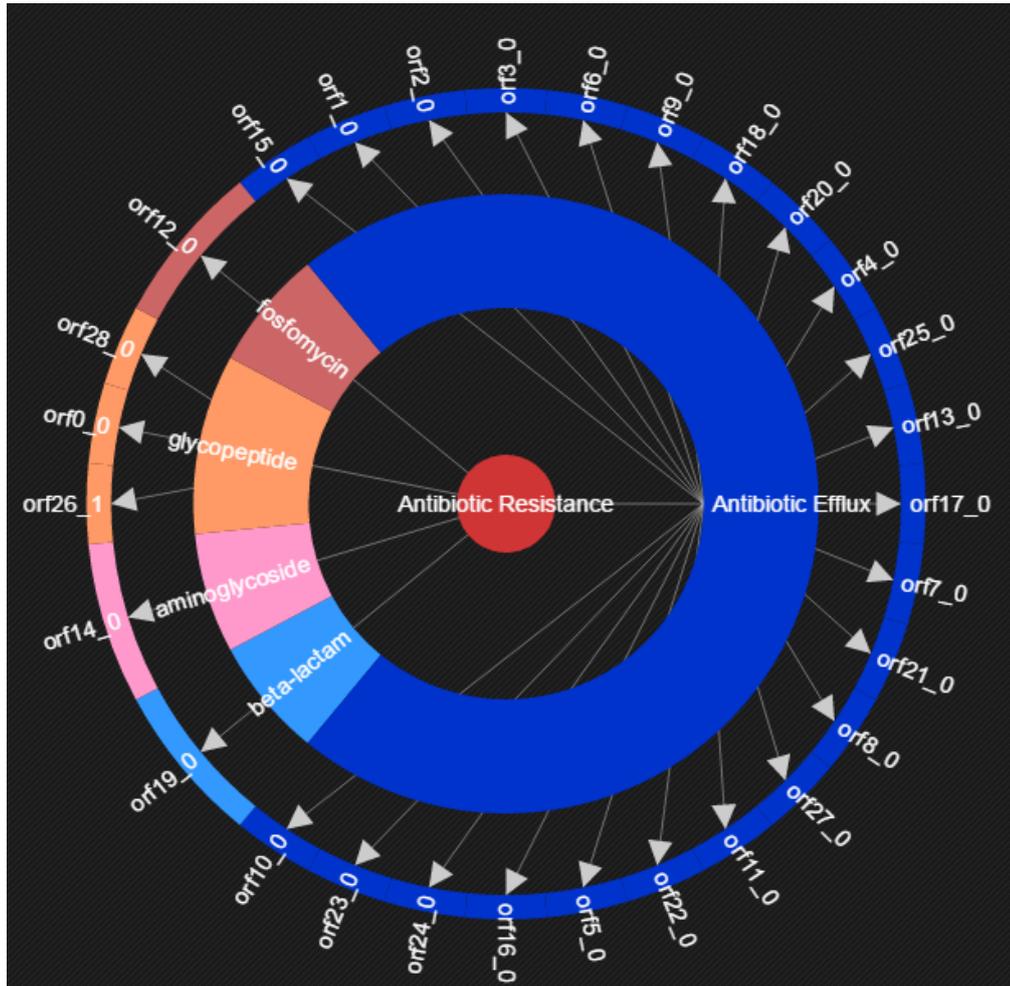


Tabela 6. Relação das orfs, genes de resistência e identidade bacteriana no efluente hospitalar geradas no banco de dados CARD

open reading frame	Genes de resistência	BLASTp Hit in CARD	e-value	ID (%)
Orf12	<i>fosA5</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> _str._Kp52.145,_chromosome	1e-77	96,40
Orf28	<i>vansG</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> _vanG_vancomycin_resistance_locus	2e-175	97,21
Orf0	<i>vanRE</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> _strain_N00-041	1e-84	100
Orf26	<i>vanRB</i>	<i>Clostridium hathewayi</i> _strain_MLG661_VanRB_(vanRB)_gene	7e-111	100
Orf14	<i>aadA</i>	<i>Escherichia coli</i>	4e-151	99,62
Orf19	<i>ampC</i>	<i>Serratia marcescens</i> _beta-lactamase (<i>ampC</i>)	0.0	98,41
Orf10	<i>mdtP</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	4e-144	75,46
Orf23	<i>smeD</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> _K279a_complete genome, strain K279a	0.0	97,76
Orf24	<i>smeA</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> _multidrug_efflux_system_SmeA	0.0	100
Orf16	<i>oprA</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> _oprA_gene_for_outer_membrane_protein	0.0	100
Orf5	<i>mexX</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> _gene_for_MexX, complete_cds	0.0	100
Orf22	<i>cml</i>	<i>Streptomyces lividans</i> _cml gene for chloramphenicol resistance protein	0.0	100
Orf11	<i>mdtK</i>	<i>Escherichia coli</i> , k-12	0.0	87,31
Orf27	<i>mexH</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> _PA96_genome	0.0	99,73
Orf8	<i>oprN</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.0	96,61
Orf21	<i>mexE</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> _F113,complete_genome	7e-157	71,78
Orf7	<i>oprJ</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> _membrane_fusion_protein_MexC	0.0	100
Orf17	<i>mdtC</i>	<i>Escherichia coli</i>	0.0	82,77
Orf13	<i>macB</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> _(macB)_gene, complete_cd	0.0	100
Orf25	<i>macA</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> _(macA)_gene, complete_cds	0.0	100
Orf4	<i>mexI</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> _PA38182, complete_genome	0.0	99,90
Orf20	<i>mexA</i>	<i>Pseudomonas knackmussii</i> _B13 complete_genome	4e-172	80
Orf18	<i>ceoB</i>	<i>Burkholderia cepacia</i> _CeoB_(ceoB)_genes,complete_cds	0.0	100
Orf9	<i>mexF</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.0	88,79
Orf6	<i>mexY</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , gene_for_MexY,complete_cds	0.0	100
Orf3	<i>mexD</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , membrane fusion protein	0.0	100
Orf2	<i>mexB</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.0	86,30
Orf1	<i>acrB</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	0.0	83,76
Orf15	<i>acrA</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	0.0	100

6. DISCUSSÃO

Os antibióticos e genes de resistência vêm sendo disseminados em praticamente todos os ecossistemas terrestres desde o início da era de antibióticos na metade do século XX (BERKNER; KONRADI; SCHONFELD, 2014).

Descargas críticas, como efluentes hospitalares, em recursos hídricos ocorrem tanto em países em desenvolvimento como em países industrializados. Estes efluentes são matrizes complexas que justificam a adoção de tratamentos adequados antes de seu lançamento nos corpos hídricos (PAUWELS; VERSTRAETE, 2006).

Estudos tem demonstrado que determinados sistemas de tratamento de água residual hospitalar podem favorecer rotas que disseminam bactérias resistentes aos antibióticos em ambientes aquáticos (CHITNIS et al, 2004; SAYAH et al, 2005; KIM; AGA, 2007; PRADO et al, 2008; FASIH et al, 2010; ROBLEDO; AQUINO; VÁSQUEZ, 2011). De fato, Reinthaler e colaboradores (2003) verificaram que 40% de *E. coli* isoladas de estações de tratamento de esgoto doméstico e hospitalar, foram resistentes a mais de três antibióticos. O comportamento de resistência de linhagens associadas à pressão de seleção de antibióticos parcialmente metabolizados e outros compostos químicos liberados no esgoto hospitalar facilita a aquisição e proliferação de características de resistência entre bactérias (KÜMMERER; HENNINGER, 2003; JACOBSEN et al, 2008).

No presente estudo, os isolados do afluente da ETEH apresentaram percentuais superiores de resistência aos antibióticos beta-lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas e aztreonam) e aminoglicosídeos. No entanto, a resistência às quinolonas foi superior no efluente, o que nos leva a sugerir, a presença desse fármaco no efluente, uma vez que esta é uma molécula estável em ambiente aquático. Um trabalho recente demonstrou que a contaminação de águas de rio por quinolonas favoreceram bactérias aquáticas, contendo genes *qnr* plasmidiais, realizando a transferência deste gene para patógenos humanos (CATTOIR et al, 2008). É importante ressaltar, que a resistência às quinolonas surgiu logo após a introdução desses fármacos na prática clínica onde foi inicialmente observada em *P. aeruginosa* e outros não fermentadores da glicose, onde a atividade das quinolonas foi, até certo ponto, limitado (TURIEL et al, 2004). Muitos estudos têm reportado o isolamento de genes *qnr* de fontes ambientais. O gene *qnrS* foi isolado de várias fontes, incluindo

lodo ativado de estação de tratamento de esgoto da Alemanha, do rio Sena, na França, de um lago na Suíça e em um rio na Turquia (BÖNEMAN et al, 2006; CATTOIR et al, 2008; PICÃO et al, 2008; OZGUMUS et al, 2009).

Assim, podemos sugerir que, no presente estudo, concentrações sub-inibitórias de quinolonas no efluente hospitalar geraram uma pressão seletiva capaz de promover a transferência horizontal do determinante da resistência (gene *qnr*) para outras linhagens de *P. aeruginosa*, aumentando assim o percentual de resistência encontrado no efluente hospitalar. O papel das quinolonas na indução da transferência de genes de resistência a antibióticos pode ser relacionado com a indução do sistema de reparação por bactérias que possuem o sistema SOS (BEABER; HOCHHUT; WALDOR, 2004).

Até 2003 não havia no Brasil uma preocupação efetiva com relação ao gerenciamento e ao descarte adequado dos resíduos gerados pelos estabelecimentos de assistência à saúde, bem como para as águas residuárias provenientes destes locais. Com o aumento da carga poluidora nos corpos hídricos e devido às condições bastante favoráveis no país à propagação de doenças veiculadas pela água, cada vez mais vem sendo enfatizada a necessidade das ações de vigilância ambiental em saúde.

Micro-organismos potencialmente patogênicos (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *Bacillus* sp e *P. aeruginosa*) já foram detectados em efluentes hospitalares de várias regiões do Brasil e em muitos outros países (DEPIZZOL et al, 2006; EKHAISE; OMAVWOYA, 2008; RESENDE et al, 2009; ABREU et al, 2010; SLEKOVEC et al, 2012).

Isolados de *P. aeruginosa* multi-resistentes foram identificados em estações de tratamento de esgoto de um complexo hospitalar no Rio de Janeiro, Brasil, mostrando resistência a todos os antibióticos testados (gentamicina, ciprofloxacino, cefepima, imipenem e aztreonam) (NOVAES, 2008). Rothenbach (2008) encontrou seis cepas de *P. aeruginosa* resistentes em efluentes de um hospital localizado na cidade de Itajaí, Santa Catarina, Brasil, sendo uma delas resistentes a todos os antibióticos testados. Outro estudo foi realizado para comparar os perfis de resistência aos antibióticos dos isolados de *P. aeruginosa* obtidos a partir dos efluentes do hospital Vicente de Paulo (Passo Fundo, Rio Grande do Sul) e de isolados do rio Passo Fundo. Cento e sete isolados de *P. aeruginosa* foram identificados a partir de águas residuais

hospitalares e 71 de água de superfície do rio. A resistência a várias classes de antibióticos foi maior entre as cepas de águas residuais do efluente hospitalar que também revelou fenótipo multirresistente, apenas entre estas estirpes (FUENTEFRÍA; FERREIRA; CORÇÃO, 2011). Linhagens de *P. aeruginosa* também foram isoladas em efluentes de um hospital em Coruripe, Alagoas, onde, 9 dos 43 isolados foram resistentes a todos os antibióticos analisados (LÓPEZ, 2011).

No Brasil, o controle microbiológico para verificar a eficiência do tratamento de efluentes hospitalares é realizado pela determinação de coliformes totais e fecais. Além disso, alguns estudos têm utilizado outros biomarcadores para verificar a eficiência do tratamento. Prado e colaboradores (2008) analisaram a eficiência de uma planta de tratamento de esgoto hospitalar no Rio de Janeiro e demonstraram a presença de *K. pneumoniae* multirresistentes no efluente tratado. A planta foi considerada ineficiente na remoção de micro-organismos patogênicos, permitindo a disseminação dessas bactérias no ambiente. A *P. aeruginosa* também vem sendo utilizada como marcador e alguns estudos já demonstraram sua presença em efluentes hospitalares nas cidades de Goiânia (GO), Itajaí (SC) e Rio de Janeiro (RJ) (NOVAES, 2008; RESENDE et al, 2009; ABREU et al, 2010). Estes estudos demonstraram cepas multidroga resistentes nos efluentes tratados reforçando a importância do tratamento desses resíduos antes do lançamento no meio ambiente.

Neste estudo, a ticarcilina/ácido clavulânico e o aztreonam foram os antimicrobianos que apresentaram menor susceptibilidade no afluente e efluente da ETEH, seguido da gentamicina. Altas taxas de resistência do aztreonam, além de outros beta-lactâmicos sugerem a presença de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) e/ou organismos produtores de *ampC*, enzimas capazes de hidrolisar cefalosporinas de espectro estendido, penicilinas e aztreonam (RUPP; FEY, 2003). O aumento da taxa de resistência ao aztreonam ocorre pela combinação de pelo menos três mecanismos: impermeabilidade da membrana externa, aumento da ação de sistemas de bombas de efluxo a multidrogas e alterações em sítios alvo ou degradação enzimática (KARLOWSKY et al, 2003; SOARES, 2005). Resultados similares foram observados em um estudo envolvendo uma outra planta de tratamento de esgoto hospitalar no Rio de Janeiro onde 71% dos isolados de *P. aeruginosa* foram resistentes à ticarcilina/ácido clavulânico e 59% ao aztreonam (MIRANDA et al, 2015).

Isso nos permite sugerir a possibilidade de elevada taxa de prescrição dessas drogas nos hospitais do Rio de Janeiro.

Em relação às associações de beta-lactâmicos com inibidores de beta-lactamases, nossos resultados foram semelhantes aos mencionados em estudos com isolados nosocomiais (SADER et al, 2000; SOARES, 2005), mostrando taxas de sensibilidade mais elevadas para piperacilina/tazobactam quando comparadas com as obtidas para ticarcilina/ácido clavulânico. Estas diferenças podem ser explicadas pela maior eficácia do tazobactam para inibir as beta-lactamases de Gram-negativos em relação ao ácido clavulânico. A elevada resistência demonstrada à ticarcilina/ácido clavulânico pode ser decorrente de seu uso indiscriminado e também por apresentar menor atividade antimicrobiana na terapêutica de infecções graves por *P. aeruginosa* em comparação ao beta-lactâmico piperacilina/tazobactam (WILLIAM, 2006).

Nos Estados Unidos, a resistência da *P. aeruginosa* ao aztreonam tem aumentado significativamente, de 26% em 1993 para 32% em 2002 (OBRITSCH et al, 2004). O alto nível de resistência ao aztreonam (50%) e ticarcilina/ácido clavulânico (43,7%) também tem sido mencionado em vários estudos com isolados nosocomiais (VAN ELDERE, 2003).

Neste estudo, treze isolados de *P. aeruginosa* do afluente (44,8%) foram classificados como MDR enquanto que no efluente foram seis os isolados com esse perfil (21,4%). Em um estudo anterior, foi observado altos níveis de resistência nas três primeiras etapas da ETEH, em comparação com a última etapa do tratamento. Este fato pode ser atribuído à mistura de águas residuais com medicamentos, desinfetantes e micro-organismos patogênicos resistentes aos antibióticos ainda nas dependências do hospital, onde a transferência de genes pode resultar no aumento de organismos MDR (SANTORO et al, 2015). Estes dados são consistentes com aqueles observados em um estudo onde não foram encontradas aumento significativo nas taxas de resistência dos isolados de *E. coli*, no decurso do processo de tratamento de esgoto (REINTHALER et al, 2003). Por outro lado, em um estudo recente, nosso grupo de pesquisa demonstrou que o tratamento de águas residuais do hospital estimulou o aumento de bactérias resistentes aos antimicrobianos, revelando a presença de *P. aeruginosa* XDR, isolada da etapa de cloração da ETEH (MIRANDA et al, 2015). O mesmo foi encontrado em isolados de *P. aeruginosa* de efluente hospitalar tratado contendo cepas MDR, antes de sua liberação para o ambiente

aquático, em um hospital na França. Os autores concluíram que o tratamento foi eficaz na diminuição de isolados de *P. aeruginosa* no efluente, porém não diminuiu a proporção de cepas resistentes aos antibióticos. Embora o tratamento de esgoto líquido dos hospitais possa remover até quatro ciclos logarítmicos de bactérias, a prevalência de bactérias resistentes a antibióticos normalmente não diminui (GALVIN et al, 2010; VARELA et al, 2014). Em vez disso, alguns perfis de resistência podem até mesmo tornar-se mais prevalente após o processo de tratamento e assim, constituir um risco de contaminação ambiental com *P. aeruginosa* MDR de origem hospitalar (SLEKOVEC et al, 2012; NOVO et al, 2013).

O comportamento inconstante de micro-organismos isolados de efluentes hospitalares tratados, em relação ao aumento e diminuição nas taxas de resistência, pode estar relacionados a outros fatores ambientais, uma vez que a presença de micro-organismos resistentes aos antibióticos no ambiente não é totalmente associada à poluição por antimicrobianos ou genes de resistência (MARTINEZ, 2009). Genes de resistência aos antibióticos existem naturalmente no ambiente, mesmo antes da terapia com antimicrobianos, o que é caracterizado tanto pela ocorrência natural dos genes resistentes a antibióticos quanto pela contribuição antropogênica (BERGLUND, 2015).

A aquisição de genes de resistência a antibióticos também pode acontecer independente da presença de antibióticos. Porém, a exposição de bactérias aos antibióticos confere uma vantagem ecológica às cepas resistentes quando comparadas às cepas sensíveis, permitindo-as predominarem na população bacteriana. Esta situação é geralmente denominada de pressão seletiva antibiótica e pode acontecer no hospedeiro em consequência da quimioterapia ou no ambiente, por exemplo, pelos resíduos de antibióticos que são lançados no esgoto (DEPIZZOL, 2006).

Sabe-se que o trato gastrointestinal de um humano adulto contém representantes dos três domínios da vida, Bacteria, Eukarya e Archaea, além de vírus. Porém, a maioria do seu microbioma é composta por bactérias que vivem no intestino humano (BACKHED et al, 2005). Os principais grupos que compõem o microbioma intestinal humano e logo predominam nas fezes humanas, são: Bacteroidetes (sendo o gênero *Bacteroides* o mais abundante) e Firmicutes, sendo 95% das sequências pertencentes à classe Clostridia (os gêneros mais prevalentes são *Clostridium*,

Ruminococcus e *Eubacterium*) (ECKBURG et al, 2005; GILL et al, 2006). Esses dois grupos juntos compõem mais de 90% da microbiota intestinal humana (ECKBURG et al, 2005).

No presente estudo, o domínio Bacteria foi o mais representado com prevalência dos filos Proteobacteria e Firmicutes, além de uma grande diversidade de bactérias não classificadas tanto no afluente como no efluente hospitalar. O filo Proteobacteria é o grupo mais numeroso reconhecido no domínio Bacteria, apresenta grande diversidade, fato este que possibilita encontrar membros deste grupo nos mais variados ambientes (PINI et al, 2011). Em um estudo sobre a diversidade bacteriana em sedimentos de uma estação de tratamento de esgoto, com altas cargas de antibióticos, também verificou predominância de bactérias pertencentes aos filos Firmicutes, Bacteroidetes e Proteobacteria (KRISTIANSSON et al, 2011). Mariat e colaboradores (2009) verificaram que na presença de terapia com antibióticos as bactérias pertencentes ao grupo Proteobacteria se tornam mais abundantes, sugerindo que apresentem um aumento relativo em seu desempenho durante o período da terapia (SOMMER; CHURCH; DANTAS, 2010). Desta forma, podemos sugerir que o mesmo ocorreu no efluente analisado neste estudo, onde bactérias do filo Proteobacteria foram mais abundantes e apresentaram várias espécies contendo genes de resistência aos antibióticos, revelando assim, uma possível correlação entre esses genes e as comunidades bacterianas.

No presente estudo, além dos filos Proteobacteria, Firmicutes e Bacteroidetes verificamos, em menor abundância, representantes do filo Actinobacteria, que é um dos grupos bem conhecidos por conter organismos produtores de antibióticos e portadoras de perfis MDR e também de uma das fontes mais prevalentes de ARG (D’COSTA et al, 2006; FORSBERG et al, 2014). Juntamente com o filo Firmicutes, as actinobactérias possuem acetiltransferases e fosfotransferases, que representam o maior mecanismo de resistência aos aminoglicosídeos (FORSBERG et al, 2014), também detectados no efluente analisado em nosso estudo (Gráfico 5).

Chagas e colaboradores (2011) estudaram a diversidade da comunidade bacteriana de um efluente hospitalar localizado na Zona Oeste do Rio de Janeiro (não tratado e tratado) e também demonstraram, na amostra não tratada, uma maior abundância de Proteobacteria, Firmicutes e Spirochaetes. Esse resultado difere um pouco do encontrado no presente estudo, uma vez que o grupo Spirochaetes foi

encontrado em uma proporção baixíssima no afluente e efluente hospitalar. Já os altos percentuais de Firmicutes e Bacteroidetes encontrados em nosso estudo é justificada pelo fato de se tratar de amostras de esgoto onde membros desses filos são comumente encontrados, conforme resultados obtidos em outros estudos (PALMER et al, 2007; MARIAT et al, 2009; FROES, 2013). Estudos anteriores também já haviam encontrado representantes dos principais grupos de bactérias gastrointestinais, incluindo os gêneros *Bacteroides*, *Bifidobacterium* e *Bacillus* e cocos proteolíticos (FLUGGE, 1886; MORO, 1900; TISSIER, 1908; DISTASO, 1911). Durante este período que durou até o final dos anos sessenta do século 20, *Bifidobacterium* e *Bacteroides* spp. foram considerados os grupos dominantes no trato gastrointestinal humano. Vale ressaltar, que a maioria das sequências classificadas, no presente estudo, foi associada a gêneros que compõem a comunidade bacteriana do intestino humano de adultos saudáveis como os anaeróbios *Eubacterium*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Faecalibacterium* e *Blautia*.

Muitos estudos têm contado com métodos dependentes de cultivo para isolamento e análise de patógenos e determinação de seus padrões de resistência as drogas usando técnicas bioquímicas (KURIA et al, 2009; AL-GHAMDI et al, 2011). No entanto, a disponibilidade de abordagens de sequenciamento de nova geração, juntamente com análises computacionais têm sido implementadas nos últimos anos para investigar a diversidade, caracterização e enumeração de seu conteúdo gênico (KURIA et al, 2009; DE FILIPPO et al, 2012; ANGELAKIS et al, 2014; JALALI et al, 2015). Recentemente, a análise metagenômica baseada no sequenciamento também têm sido usada para explorar a diversidade e abundância de genes de resistência em antibióticos em vários ambientes (ZHANG; ZHANG, YE; 2011; MA; LI; ZHANG, 2014; LI et al, 2015).

No presente estudo, a determinação do resistoma pela metagenômica funcional do afluente da ETEH revelou 33 genes de resistência aos antimicrobianos enquanto o efluente tratado apresentou 29 genes. Vale ressaltar, que 75,8% e 79,3%, respectivamente afluente e efluente, correspondem a genes envolvidos em sistemas de efluxo (Gráficos 17 e 18).

Os sistemas de efluxo de *P. aeruginosa* pertencem à família RND (LOMOVSKAYA et al, 2001; LLANES et al, 2004; PIDDOCK, 2006). Esses sistemas têm como base a abertura de um canal que atravessa as membranas interna e externa

da bactéria, permitindo a remoção de moléculas para o exterior celular. O genoma de *P. aeruginosa* contém genes que codificam sistemas de efluxo da família RND denominados *multidrug efflux pump* (*Mex*), dos quais dez já foram caracterizados: MexAB-OprM (POOLE et al, 1993), MexCD-OprJ (POOLE et al, 1996), MexEF-OprN (POOLE et al, 1996), MexXY-OprM (MINE et al, 1999), MexGHI-OpmD (AEDEKERK et al, 2002), MexVW-OprM (LI et al, 2003), MexPQ-OpmE (MIMA et al, 2005), MexMN-OprM (MIMA et al, 2005) e TriABC-OpmH (MIMA et al, 2007). Esses sistemas são denominados MDR, pois são capazes de conferir resistência a um amplo espectro de quimioterápicos (KRIENGKAUYKIAT et al, 2005; PIDDOCK, 2006).

Neste estudo, detectamos os genes *mexB*, *mexD*, *mexF* e *mexY* que codificam as proteínas de transporte localizadas na membrana interna, os genes que codificam as proteínas transmembrana, *mexA*, *mexC*, *mexE* e *mexX* e aqueles genes *oprJ*, *oprM* e *oprN*, que codificam proteínas de membrana externa formadoras de porinas (Tabelas 5 e 6). Assim, podemos sugerir que os micro-organismos presentes no efluente aqui analisado apresentam resistência a vários antibióticos por meio da expressão de um ou mais sistemas de efluxo presentes em bactérias Gram-negativas (AESCHLIMANN, 2003).

Entre as bombas de efluxo caracterizadas em *P. aeruginosa*, a expressão de quatro sistemas (MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN e MexXY-OprM) foram mais relatados entre isolados clínicos e relacionados com a resistência a múltiplos antibióticos (MASUDA et al, 2000; AESCHLIMANN, 2003). Considerando os genes detectados em nossas análises, a resistência aos antibióticos beta-lactâmicos, aminoglicosídeos e quinolonas revelada nos isolados de *P. aeruginosa* do afluente e efluente da ETEH, também podem estar associados a esses sistemas de efluxo (Gráficos 1 e 2).

No presente estudo, os maiores percentuais de genes revelados pela metagenômica foram aqueles envolvidos em sistemas de efluxo. No entanto, verificamos, em menor proporção, genes presentes em elementos móveis, principalmente no efluente tratado, o que nos permite sugerir a presença de disseminação de ARG por transferência lateral de genes, assim como demonstrado em um estudo anterior em nosso laboratório (MIRANDA et al, 2015).

Nossos resultados nos permitem sugerir que a abordagem da metagenômica, aqui adotada, na determinação de comunidades microbianas e de seus resistomas

em efluentes hospitalares tratados foi relevante, pois nos permitiu realizar a caracterização taxonômica e funcional em relação à resistência aos antibióticos, em esgoto hospitalar tratado brasileiro, pela primeira vez.

Além disso, concluímos que o descarte de resíduos líquidos provenientes de hospitais, ainda que tratados, vem contribuindo para a disseminação de bactérias resistentes, uma vez que, como demonstramos, essas comunidades bacterianas possuem genes envolvidos em vários mecanismos de resistência aos antibióticos que participam da disseminação de organismos e genes de resistência aos corpos hídricos receptores.

7. CONCLUSÃO

- Os isolados de *P. aeruginosa* apresentaram perfis de resistência MDR no afluente e no efluente da ETEH, confirmando sua relevância como bioindicador de resistência aos antibióticos;
- De acordo com os genes detectados, a resistência aos antibióticos ticarcilina/ácido clavulânico, aztreonam e gentamicina pelos isolados de *P. aeruginosa* do afluente e efluente da ETEH está sendo mediada por bombas de efluxo e/ou por genes de resistência presentes em elementos móveis, provavelmente via transferência lateral de genes;
- A prevalência de bactérias pertencentes aos filos Proteobacteria, Firmicutes e Bacteroidetes e outros no efluente hospitalar pode estar relacionada à presença de antibióticos e outros compostos no efluente hospitalar, com base em estudos divulgados na literatura;
- A caracterização de comunidades microbianas e de seus resistomas em efluentes hospitalares pela metagenômica foi essencial no acompanhamento de alterações na diversidade bacteriana e no resistoma microbiano antes e pós-tratamento do efluente hospitalar;
- O resistoma pela metagenômica funcional do esgoto hospitalar revelou que 75,8% do afluente e 79,3% do efluente da ETEH foram de genes envolvidos em sistemas de efluxo;
- A revelação de grande diversidade de bactérias não classificadas tanto no afluente como no efluente da ETEH sinaliza a possibilidade da presença de linhagens ainda não descritas;
- O descarte de resíduos líquidos provenientes de hospitais, ainda que tratados, vem contribuindo para a disseminação de bactérias resistentes, uma vez que, como demonstramos, essas comunidades bacterianas possuem genes envolvidos em vários mecanismos de resistência aos antibióticos que participam da disseminação de organismos e genes de resistência;

- Nossos resultados certamente poderão contribuir com a Vigilância Sanitária Ambiental no que se refere ao desenho de ações preventivas aos impactos desses efluentes no ambiente e na saúde pública.

REFERÊNCIAS

- ABREU, E.T. et al. Avaliação da resistência a antibióticos de bactérias isoladas de efluente hospitalar. **Acta Scientiarum Technology**, v.32, n.1, p.1-5, 2010.
- AEDEKERK, S. et al. Characterization of a new efflux pump, MexGHI-OpmD, from *Pseudomonas aeruginosa* that confers resistance to vanadium. **Microbiology**, v. 148, n. 8, p. 2371-81, may 2002.
- AESCHLIMANN, J. R. The role of multidrug efflux pumps in the antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* and other Gram-negative bacteria. **Pharmacotherapy**, v. 23, n. 7, p. 916-24, jul. 2003.
- AL-GHAMDI, A.K. et al. Bacterial contamination of Saudi "one" Riyal paper notes. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, v. 42, n.3. p. 711-716, may 2011.
- ALLEN, H.K. et al. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. **Nature Review Microbiology**, n.8, p. 251-259, apr. 2010.
- ANGELAKIS, E. et al. Paper money and coins as potential vectors of transmissible disease. **Future Microbiol**, v. 9, n.2, p. 249-261, 2014.
- ANSORGE, W.J. Next-generation DNA sequencing techniques. **New Biotech**, v.25, n.4, p.195-203, apr. 2009.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 7.501**: Transporte terrestre de produtos perigosos: terminologia. Rio de Janeiro: 1989.
- ATLAS, R. M.; BARTHA, R. Microbial evolution and biodiversity. In: ATLAS, R.M.; BARTHA, R. **Microbial Ecology**. Menlo Park: Benjamin/Cummings Science, 1998, 27-57 p.
- AUGUSTO, L.G.S. Saúde e vigilância ambiental: um tema em construção. **Epidemiol Serv Saúde**, v.12, n.4, p.177-86, 2003.
- BACKHED, F. et al. Host-bacterial mutualism in the human intestine. **Science**, v. 307, n. 5717, p.1915-1920, mar. 2005.
- BARCELLOS, C., QUITÉRIO, L.A. Environmental surveillance in health in Brazil's Unified Health System. **Rev Saude Publica**, v. 40, n.1, p. 170-7, feb. 2006.
- BEABER, J. W.; HOCHHUT, B.; WALDOR, M.K. SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. **Nature**, v. 427, p.72-74, jan. 2004.
- BEIER, S. et al. Full scale membrane bioreactor treatment of hospital wastewater as forerunner for hot-spot wastewater treatment solutions in high density urban areas. **Water Sci Technol**, v.63, n.1, p.66-71, 2011.

BERGLUND, E. C.; KIIALAINEN, A.; SYVANEN, A.C. Next-generation sequencing technologies and applications for human genetic history and forensics. **Investig Genet**, v. 2, p. 23, nov. 2011.

BERGLUND, B. Environmental dissemination of antibiotic resistance genes and correlation to anthropogenic contamination with antibiotics. **Infect Ecol Epidemiol**, v. 8, n. 5, p. 28564, sep. 2015.

BERKNER, S.; KONRADI, S.; SCHONFELD, J. Antibiotic resistance and the environment—there and back again. **EMBO Rep**, v. 15, n.7, p. 740-744, jul. 2014.

BIDONE, F.R.A. **Resíduos sólidos provenientes de coletas especiais: eliminação e valorização**. Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental. 2001.

BOILLOT, C. et al. Daily physicochemical, microbiological and ecotoxicological fluctuations of a hospital effluent according to technical and care activities. **Sci Total Environ**, v.15, p. 113-29, sep. 2008.

BÖNEMAN, G. et al. Mobilizable IncQ-related plasmid carrying a new quinolone resistance gene, *qnrS2*, isolated from the bacterial community of a wastewater treatment plant. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 9, p. 3075-80, sep. 2006.

BORGES, F. Crescem denúncias de venda de antibióticos sem receita. **em.com.br Estado de Minas**, Belo Horizonte. 15 dez. 2015. Disponível em: <http://www.em.com.br/app/noticia/economia/2015/12/14/internas_economia,716900/crescem-denuncias-de-venda-de-antibioticos-sem-receita.shtml>. Acesso em: 28 jan. 2016.

BRASIL. Lei nº 8.080 de 11 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 20 set.1990a. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L8080.htm>. Acesso em: 14 set. 2014

BRASIL. Lei nº 8.078 de 11 de setembro de 1990. Dispõe sobre a proteção do consumidor e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 12 set.1990b. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L8078.htm>. Acesso em: 21 jan. 2016

BRASIL. Ministério da Saúde. **Fundação Nacional de Saúde**. Vigilância ambiental em saúde: Textos de epidemiologia para a Vigilância Ambiental em Saúde. Brasília: MS/FUNASA, 2002.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 306, de 7 de dezembro de 2004. Dispõe sobre o regulamento técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 10 dez. 2004.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional de Meio Ambiente. Resolução nº 358, de 29 de abril de 2005. Dispõe sobre o tratamento e a disposição final dos resíduos dos serviços de saúde e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, nº 84, Seção I, 04 maio 2005, pág. 63-65.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de gerenciamento de resíduos de serviços de saúde**. Brasília, DF: Anvisa, 2006. 12 p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de vigilância em saúde. Departamento de vigilância em saúde ambiental e saúde do trabalhador. Parecer Técnico nº 003, de 11 de janeiro de 2011. Propostas complementares à Resolução CONAMA 357/2005 e a Resolução CONAMA 397/08, sobre condições e padrões de lançamento de efluentes. Brasília, DF, 2011a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 20, de 5 de maio de 2011. Dispõe sobre o controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos, de uso sob prescrição, isoladas ou em associação. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 09 maio 2011b, Seção 1.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional de Meio Ambiente. Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Diário Oficial da União**, nº 92, 16 maio 2011c, pág. 89.

CAI, H.; ARCHAMBAULT, M.; PRESCOTT, J.F. 16S ribosomal RNA sequence-based identification of veterinary clinical bacteria. **J Vet Diagn Invest**, v. 15, n. 5, p. 465-469, sep. 2003.

CAPORASO, J.G. et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. **Proc Natl Acad Sci**, v.108, p. 4516-4522, mar. 2011.

CARDOSO, A. M. et al. Metagenomics in polluted aquatic environments. In: BALKIS, N. (Ed.). **Water Pollution**. New York: InTech, 2012. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/water-pollution/metagenomics-in-polluted-aquatic-environments>>. Acesso em: 10 maio 2013.

CARVALHO, M. C. C. G.; SILVA, D.C.G. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. **Ciência Rural**, v.40, n.3, mar. 2010.

CATTOIR, V. et al. Unexpected occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in environmental *Aeromonas* spp. **Emergency Infect Diseases**, v. 14, n.2, p. 231-237, feb. 2008.

CAUMO, K. et al. Resistência bacteriana no meio ambiente e implicações na clínica hospitalar. **Revista Liberato**, n. 11, v.16, p.89-188, dez. 2010.

CHAGAS, T. P. et al. Multiresistance, beta-lactamase-encoding genes and bacterial diversity in hospital wastewater in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 11, n.3, 572-581, sep. 2011.

CHITNIS, V. et al. Bacterial population changes in hospital effluent treatment plant in central India. **Water Research**, v. 38, n.2, p. 441-447, jan. 2004.

CLEMENTINO, M.M. et al. Prokaryotic diversity in one of the largest hypersaline coastal lagoons in the world. **Extremophiles**, v. 12, n. 4, p. 595-604, jul. 2008.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute - M100-S23, **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing**; approved standard - 23th informational supplement (M100-S23). Wayne, PA-USA, 2014.

CNES – Cadastro Nacional de Estabelecimento de Saúde. Brasília, DF, 2015.

Disponível em:

<http://cnes.datasus.gov.br/Mod_Conjunto.asp?VCo_Unidade=3304552291266>.

Acesso em: 13 julho. 2015.

COUTINHO, F.H. et al. Antibiotic resistance in aquatic environments of Rio de Janeiro, Brazil. In: AHMAD, I.; AHMAD DAR, M. (Ed.). **Water Pollution**. New York: InTech, 2013. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/perspectives-in-water-pollution/antibiotic-resistance-in-aquatic-environments-of-rio-de-janeiro-brazil>>. Acesso em: 15 maio 2013.

CZEKALSKI, N.; GASCON DIEZ, E.; BURGMANN, H. Wastewater as a point source of antibiotic-resistance genes in the sediment of a freshwater lake. **ISME J**, v.8, p. 1381-1390, mar. 2014.

DAMS, E. et al. Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. **Nucleic Acids Res**, v. 16, p. 87-173, 1988.

DANIEL, R. The metagenomics of soil. **Nat Rev Microbiol**, v.3, n.6, p. 470-478, jun. 2005.

D’COSTA, V. M. et al. Sampling the antibiotic resistome. **Science**, v. 311, n. 5759, p. 374-377, jan. 2006.

DE FILIPPO, C. et al. Bioinformatic approaches for functional annotation and pathway inference in metagenomics data. **Brief Bioinform**, v. 13, n.6, p. 696-710, 2012.

DELCOUR, A.H. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. **Biochim Biophys Acta**, v. 1794, n. 5, p. 808-816, may 2009.

DEPIZZOL, F. **Avaliação da resistência a antibióticos em isolados de *Escherichia coli* provenientes de esgoto hospitalar e sanitário**. 2006. 145p. Dissertação (Pós-Graduação em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2006.

DIÁRIO OFICIAL DO MUNICÍPIO DO RIO DE JANEIRO. **Programa Especial e Permanente de Fiscalização do Sistema de Tratamento de Esgotos de Hospitais e Clínicas criado pelo Decreto no. 19.789/2001**. Decreto no. 21.006/02. D.O., Ano XV, n. 210, 23 de janeiro de 2002.

DISTASO, A. Sur les microbes proteolytiques de la flore intestinale de l'homme et des animaux. **Zbl Bakt Parasit**, v. 59, p. 97-103, 1911.

DREMONT, C.; HADJALI, J. La gestion des effluents liquides en Milieu Hospitalier. **Projet DESS "Technologies Biomédicales Hospitalières"**, Université de Technologie de Compiègne, 1997, p. 30. Disponível em: <<http://www.utc.fr/~farges/DESS,TBH/96-97/Projects/EL/EL.htm>>. Acesso em: 14 set. 2013.

DZIDIC, S.; SUSKOVIC, J.; KOS, B. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: biochemical and genetic aspects. **Food Technology Biotechnology**, v. 46, n. 11, p. 11-21, nov. 2007.

ECKBURG, P.B. et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. **Science**, v. 308, n. 5728, p. 1635-1638, jun. 2005.

EMMANUEL, E. et al. Ecotoxicological risk assessment of hospital wastewater: a proposed framework for raw effluents discharging into urban sewer network. **Journal of Hazardous Materials**, v. 117, n.1, p.1-11, jan. 2005.

ESCHER, B.I. et al. I Environmental toxicology and risk assessment of pharmaceuticals from hospital wastewater. **Water Res**, v. 45, n.1, p. 75-92, jan. 2011.

EKHAISE, F.O.; OMAVWOYA, B.P. Influence of hospital wastewater discharged from University of Benin Teaching Hospital (UBTH), Benin City on its receiving environment. **American-Eurasian J Agric & Environ Sci**, v. 4, v. 4, p. 484-488, 2008.

FASIH, N. et al. Clonal dissemination of vanA positive Enterococcus species in tertiary care hospitals in Karachi, Pakistan. **Journal Pakistan Medical Association**, n. 60, v.10, p. 805-809, oct. 2010.

FLUGGE, C. **Die Mikroorganismen**. Vogel, Leipzig.1886.

FLUIT, A.C.; VISSER, M.R.; SCHMITZ, F.J. Molecular detection of antimicrobial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n.4, p. 837-862, oct. 2001.

FORMAGGIA, D. M. E. **Resíduos de serviço de saúde**. In: Gerenciamento de resíduos de serviços de saúde. São Paulo: CETESB, 1995, p.1-9.

FORSBERG, K. J. et al. Bacterial phylogeny structures soil resistomes across habitats. **Nature**, v. 509, p. 612-6, may 2014.

FRANCO NETTO, G.; CARNEIRO, F.F. Vigilância ambiental em saúde no Brasil. **Ciências Ambientais**, n. 25, p.47-58, 2002.

FROES, A.M. **Mineração de dados metagenômicos visando a análise da diversidade de serina β -lactamases em diferentes ambientes**. 2013. Tese (Doutorado em Biologia Computacional e Sistemas) - Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2013.

FUENTEFRIA, D.B. et al. *Pseudomonas aeruginosa*: disseminação de resistência antimicrobiana em efluente hospitalar e água superficial. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.41, n.5, p. 470-473, set.-out. 2008.

FUENTEFRIA, D.B.; FERREIRA, A.E.; CORÇÃO, G. Antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from hospital wastewater and superficial water: Are they genetically related? **J Environ Manage**, v. 92, n.1, p. 250-255, jan. 2011.

GALES, A.C. et al. Urinary tract infection trends in Latin American hospitals: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program (1997-2000). **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 44, n.3, p.289-99, nov. 2002.

GALVIN, S. et al. Enumeration and characterization of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* bacteria in effluent from municipal, hospital, and secondary treatment facility sources. **Appl Environ Microbiol**, v.76, n.14, p. 4772-4779, jul. 2010.

GARCIA, L.P.; ZANETTI-RAMOS, B.G. Gerenciamento dos resíduos de serviços de saúde: uma questão de biossegurança. **Cad Saúde Pública**, v. 20, n.3, p. 744-752, maio/jun. 2004.

GILL, S.R. et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. **Science**, v. 312, n. 5778, p.1355-1359, jun. 2006.

GILBERT, J.A.; DUPONT, C.L. Microbial metagenomics: beyond the genome. **Ann Rev Mar Sci**, v.3, p.347-71, 2011.

GONZALEZ, A. M. et al. Diversity of bacterial communities related to the nitrogen cycle in a coastal tropical bay. **Molecular Biology Reports**, v. 39, n. 4, p. 3401-3407, apr. 2012.

GROBKOPF, R.; JANSSEN, P.H.; LIESACK, W. Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence Retrieval. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n.3, p. 960-969, mar. 1998.

GRUNDFOS BIOBOOSTER. **Wastewater Treatment at Herlev Hospital, Denmark**. 2012. Disponível em: < http://www.herlevhospital.dk/NR/rdonlyres/74234BCB-4E38-4B84-9742-80FFCDB416AF/0/10988_Biobooster_Herlev_LOW_opslag.pdf.> Acesso em: 12 jan. 2015.

- GUSATTI, C.S. et al. Resistência a β -lactâmicos em *Acinetobacter spp.* isolados de efluente hospitalar no sul do Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.42, n.2, p.183-187, abr. 2009.
- HAWKSHEAD, J.J. Hospital wastewater containing pharmaceuticals active compounds and drug-resistant organisms: a source of environmental toxicity and increased antibiotic resistance. **J Residual Sci Tech**, v.5, n.2, p. 51-60, apr. 2008.
- HERNANDO, M.D. et al. Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. **Talanta**, v. 69, n.2, p.334-342, apr. 2006.
- HOFF, K. J. et al. Orphelia: predicting genes in metagenomic sequencing. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. W101-W105, jul. 2009.
- HURST, C.J. et al. **Manual of Environmental Microbiology**. Washington: ASM Press, 2002.
- ILLUMINA, Inc. DNA sequencing with Solexa technology. San Diego: Illumina, Inc. 2007. Disponível em: <http://www.plantsciences.ucdavis.edu/bit150/2006/JD_Lecture/Lecture%201%20Databases/Solexa_DNAsequencing.pdf>. Acesso em: 10 abril 2015.
- JACOBSEN, A.L. et al. Comparative community physiology: non-convergence in water relations among three semi-arid shrub communities. **New Phytologist**, v. 180, n.1, p. 100-113, 2008.
- JALALI, S. et al. Screening currency notes for microbial pathogens and antibiotic resistance genes using a shotgun metagenomic approach. **PLoS One**, v. 10, n. 6, jun. 2015. doi:10.1371/journal.pone.0128711.
- JOHNNING, A. Acquired genetic mechanisms of a multiresistant bacterium isolated from a treatment plant receiving wastewater from antibiotic production. **Appl Environ Microbiol**, v. 79, n.23, p. 7256-7263, dec. 2013.
- KARLOWSKY, J.A. et al. Surveillance for antimicrobial susceptibility among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* from hospitalized patients in the United States, 1998 to 2001. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 47, n.5, p. 1681- 688, may 2003.
- KIM, S.; AGA, D. S. Potential ecological and human health impacts of antibiotics and antibiotic-resistant bacteria from wastewater treatment plants. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 10, n.8, p. 559-573, dec. 2007.
- KIRCHER, M.; KELSO, J. High-throughput DNA sequencing--concepts and limitations. **Bioessays**, v. 32, n.6, p.524-36, jun. 2010.
- KOCZURA, R. et al. Antimicrobial resistance of integron-harboring *Escherichia coli* isolates from clinical samples, wastewater treatment plant and river water. **Sci Total Environ**, v. 414, p. 680-685, jan. 2012.

KOWALCHUK, G.A. et al. **Molecular microbial ecology manual** (2 ed., vols. 1 and 2). London: Kluwer Academic Publishers, 2004.

KRIENGKAUYKIAT, J. et al. Use of an efflux pump inhibitor to determine the prevalence of efflux pump-mediated fluoroquinolone resistance and multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 2, p. 565-70, 2005.

KRISTIANSSON, E. et al. Pyrosequencing of antibiotic-contaminated river sediments reveals high levels of resistance and gene transfer elements. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, e17038, feb. 2011.

KRUSE, H.; SORUM, H. Transfer of multiple drug resistance plasmids between bacteria of diverse origins in natural microenvironments. **Applied Environmental Microbiology**, v. 60, n.11, p. 4015-4021, nov.1994.

KÜMMERER, K. Significance of antibiotics in the environment. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n.1, p. 5-7, jun. 2003.

KÜMMERER, K.; HENNINGER, A. Promoting resistance by the emission of antibiotics from hospitals and households into effluents. **Clin Microbiol Inf**, v. 9, n.12, p.1203-1214, dec. 2003.

KUNIN, V. et al. A bioinformatician's guide to metagenomics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.72, n.4, p.557-578, dec. 2008.

KURIA, J.K. et al. Profile of bacteria and fungi on money coins. **East Afr Med J**, v. 86, n.4, p.151-155, apr. 2009.

LABAER, J. et al. The *Pseudomonas aeruginosa* PA01 gene collection. **Genome Research**, p. 2190-2200, oct. 2004. Disponível em: <<http://genome.cshlp.org/content/14/10b/2190.long>>. Acesso em: 15 maio 2013.

LAGATOLLA, C. et al. Endemic carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* with acquired metallo- β -lactamase determinants in European hospital. **Emerging Infectious Diseases**, v.10, n.3, p. 535-538, mar. 2004.

LAGO, A. et al. Enterobactérias produtoras de ESBL em Passo Fundo, estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Rev Soc Bras. Med Trop**, v.43, n.4, p. 430-434, jul./ago. 2010.

LAPARA, T.M. et al. Tertiary-treated municipal wastewater is a significant point source of antibiotic resistance genes into Duluth-Superior Harbor. **Environ Sci Technol**, v. 45, n.22, p. 9543-9549, oct. 2011.

LA ROSA, A.M.F. et al. Gestão de efluentes de serviços de saúde em Porto Alegre. In: CONGRESSO INTERAMERICANO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 17., 2000, Porto Alegre. **Anais**. Porto Alegre: ABES, 2000. Disponível em: <www.bvsde.paho.org/bvsaidis/impactos/vi-037.pdf> Acesso em: 01 mar. 2014.

LEE, L.; TIN, S.; KELLEY, S.T. Culture-independent analysis of bacterial diversity in a child-care facility. **BMC Microbiology**, v. 7, n.27, p.1-13, apr. 2007.

LEFF, E. **Epistemologia ambiental**. São Paulo: Cortez; 2002.

LEPRAT, E. Les effluents liquides hospitaliers: vers une meilleure maîtrise. **3ème Journée du réseau régional d'hygiène de Basse-Normandie**, p.2. 1999.

Disponível em: <<http://www.pharmacie.unicaen.fr/rrh/resj3/Res2.htm>>. Acesso em: 14 set. 2013.

LI, B. et al. Metagenomic and network analysis reveal wide distribution and co-occurrence of environmental antibiotic resistance genes. **ISME J**, v.9, n.11, p. 2490-502, nov. 2015, doi: 10.1038/ismej.2015.59.

LI, Y. et al. A new member of the tripartite multidrug efflux pumps, MexVW-OprM, in *Pseudomonas aeruginosa*. **J Antimicrob Chemother**, v.52, n.4, p.572-5, oct. 2003.

LIU, B.; POP, M. ARDB-Antibiotic Resistance Genes Database. **Nucleic Acids Res**, v. 37, p. D443–D447, jan. 2009.

LIVERMORE, D. M. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? **Clinical Infectious Disease**, v. 34, n.5, p. 634-640, mar. 2002.

LLANES, C. et al. Clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* overproducing MexAB-OprM and MexXY efflux pumps simultaneously. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, n. 5, p.1797-802, 2004.

LOMOVSKAYA, O. et al. Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, n.1, p.105-16, jan. 2001.

LÓPEZ, A. M. Q. Comparação de *Pseudomonas* isoladas de efluente hospitalar e do destino final do mesmo - Um estudo de disseminação e resistência. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 26., 2011, Foz do Iguaçu. **Anais**. Paraná: 2011.

MA, L. P.; LI, B.; ZHANG, T. Abundant rifampin resistance genes and significant correlations of antibiotic resistance genes and plasmids in various environments revealed by metagenomic analysis. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.98, n.11, p. 5195-5204, 2014.

MACEDO, M.L.A.P. et al. Mecanismos de resistência e detecção das beta-lactamases. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 7, n. 1, p. 59-63, out. 2005.

MACEDO, H.S. **Comunidades bacterianas em solos de mata nativa e cultivados com cana-de-açúcar**. 2012. 94p. Dissertação (Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, São Paulo, 2012.

MAGIORAKOS, A.P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clin Microbiol Infect**, v.18, n.3, p. 268-281, mar. 2012.

MARCHAND, I. et al. Expression of the RND - type efflux pump AdeABC in *Acinetobacter baumannii* is regulated by the AdeRS two - component system. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, n.9, p. 3298-3304, sep. 2004.

MARIAT, D. et al. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. **BMC Microbiology**, v. 9, n.123, jun. 2009.

MARTINEZ, J.L. et al. A global view of antibiotic resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 33, n.1, p. 44-65, jan. 2009. Disponível em: <[www.http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1574-6976.2008.00142.x/pdf](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1574-6976.2008.00142.x/pdf)>. Acesso em: 13 maio. 2013.

MARTINEZ, J.L. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. **Environmental Pollution**, v. 157, n. 11, p.2893-2902, nov. 2009.

MARTINS, S. T. **Análise de custos da internação de pacientes em unidades de terapia intensiva com infecções causadas por *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* multirresistentes**. 2002. 124p. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 2002.

MASUDA, N. et al. Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-OprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 44, n. 12, p.3322-7, dec. 2000.

MCARTHUR, A.G. et al. The comprehensive antibiotic resistance database. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 57, n.7, p. 3348-3357, jul. 2013.

MCQUILLAN, D. et al. Drug Residues in Ambient Water: Initial Surveillance in New Mexico, USA. In: ANNUAL NEW MEXICO ENVIRONMENTAL HEALTH CONFERENCE, 7., 2002, Albuquerque, New Mexico. **Anais**. New Mexico: 2002. p.26-34.

METZKER, M. L. Sequencing technologies - the next generation. **Nat Rev Genet**, v. 11, n.1, p.31-46, jan. 2010.

MEYER, F. et al. The metagenomics RAST server – a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. **BMC Bioinformatics**, v. 9, sep. 2008. doi:10.1186/1471-2105-9-386

- MIMA, T. et al. Gene cloning and properties of the RND-type multidrug efflux pumps MexPQ-OpmE and MexMN-OprM from *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiol Immunol**, v. 49, n. 11, p. 999-1002, 2005.
- MIMA, T. et al. Identification and characterization of TriABC-OpmH, a triclosan efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* requiring two membrane fusion proteins. **J Bacteriol**, v. 189, n. 21, p.7600-9, 2007.
- MINE, T. et al. Expression in *Escherichia coli* of a new multidrug efflux pump, MexXY, from *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 43, n. 2, p. 415-7, 1999.
- MIRANDA, C.C. et al. Genotypic characteristics of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from hospital wastewater treatment plant in Rio de Janeiro, Brazil. **J Appl Microbiol**, v.118, n.6, p. 1276-1286, jun. 2015.
- MORO, E. Ueber den Bacillus acidophilus. **Jahrb Kinderh**, v. 52, p. 38-55, 1900.
- NOVAES, R. M. P. **Avaliação da eficiência de uma estação de tratamento de efluente hospitalar através da detecção e caracterização molecular de *Pseudomonas aeruginosa* na cidade do Rio de Janeiro**. 2008. Monografia (Especialização em Vigilância Sanitária) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2008.
- NOVO, A. et al. Antibiotic resistance, antimicrobial residues and bacterial community composition in urban wastewater. **Water Res**, v. 47, n.5, p.1875-1887, apr. 2013.
- NOUÉR, S. A. et al. Risk factors for acquisition of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-beta-lactamase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 9, p. 3663-3667, sep. 2005.
- OBRITSCH, M.D. et al. Nation surveillance of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from intensive care units patients from 1993 to 2002. **Antimicrob Agent Chemother**, v. 48, n.12, p. 4606-4610, dec. 2004.
- OGRAM, A.; SAYLER, G.S.; BARKAY, T. The extraction and purification of microbial DNA from sediments. **J Microbiol Methods**, v. 7, n.1-2, p. 57-66, dec. 1987.
- OHLSSEN, K. et al. Impact of antibiotics on conjugational resistance gene transfer in *Staphylococcus aureus* in sewage. **Environmental Microbiology**, v. 5, n.8, p. 711-716, aug. 2003.
- OLIVEIRA, C. et al. Perfil de resistência a antimicrobianos de cepas *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de ralos e pias de enfermarias hospitalares em Santa Catarina, Brasil. **Rev Bras Anal Clin**, v.43, n. 3, p.192-6, 2011.
- ORT, C. et al. Determination of the fraction of pharmaceutical residues in wastewater originating from a hospital. **Water Res**, v. 44, n.2, p. 605-615, jan.2010.

OZGUMUS, O.B. et al. Class 1 and class 2 integrons and plasmid-mediated antibiotic resistance in coliforms isolated from ten rivers in northern Turkey. **J Microbiol**, v. 47, n. 1, p. 19-27, feb.2009.

PACE, N. R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. **Science**, v. 276, n. 5313, p.734-740, may 1997.

PALMER, C. et al. Development of the human infant intestinal microbiota. **PLoS Biology**, v. 5, n. 7, p. 177, jun. 2007.

PAUWELS, B; VERSTRAETE, W. The treatment of hospital wastewater: an appraisal. **J Water Health**, v. 4, n. 4, p. 405-16, dec. 2006.

PELLEGRINO, F.L. et al. Occurrence of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in different hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n.7, p. 2420-2424, jul. 2002.

PEREIRA, B.S.; LACERDA, G.C.; MARQUES, M.S. A promoção da saúde ambiental no contexto do programa de saúde da família. **C&D-Revista Eletrônica da Fainor**, v.3, n.1, p.2-11, jan./dez. 2010.

PICÃO, R.C. et al. Plasmid-mediated quinolone resistance in *Aeromonas allosaccharophila* recovered from a Swiss lake. **J Antimicrob Chemother**, v. 62, n. 5, p. 948-50, nov. 2008.

_____ The route of antimicrobial resistance from the hospital effluent to the environment: focus on the occurrence of KPC-producing *Aeromonas* spp. and Enterobacteriaceae in sewage. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 76, n.1, p. 80-85, mar. 2013.

PIDDOCK, L. J. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. **Clin Microbiol Rev**, v. 19, n. 2, p. 382-402, apr. 2006.

PILLS Report. Pharmaceutical residues in the aquatic system: — a challenge for the future. Final Report of the European Cooperation Project PILLS (available at the address: www.pills-project.eu (last access on January 5th 2015), Gelsenkirchen, september 2012.

PINI, F. et al. Plant-bacteria association and symbiosis: are there common genomic traits in *Alphaproteobacteria*? **Genes**, v. 2, n.4, p. 1017-1032, nov. 2011.

PISA, G. et al. Diversity of 16S rRNA genes from bacteria of sugarcane rhizosphere soil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, n. 11, p.1215-1221, dec. 2011.

PITOUT, J.D.D. et al. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo-lactamases in a large centralized laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n.7, p. 3129-3135, jul. 2005.

POOLE, K. et al. Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. **J Bacteriol**, v. 175, n. 22, p. 7363-72, nov. 1993.

POOLE, K.; SRIKUMAR, R. Overexpression of the mexC-mexD-oprJ efflux operon in nfxB-type multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. **Mol Microbiol**, v. 21, n. 4, p. 713-24, aug. 1996.

POOLE, K.; SRIKUMAR, R. Multidrug efflux in *Pseudomonas aeruginosa*: components, mechanisms and clinical significance. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v.1, n.1, p. 59-71, may 2001.

POOLE, K. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. **Front Microbiol**, v. 2, apr. 2011. doi.org/10.3389/fmicb.2011.00065.

PRADO, T. et al. Detection of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in effluents and sludge of a hospital sewage treatment plant. **Letters in Applied Microbiology**, v. 46, n.1, p. 136-141, jan. 2008.

PRUESSE, E. et al. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. **Nucleic acids research**, v. 35, n. 21, p.7188-7196, oct. 2007.

REINTHALER, F. F. et al. Antibiotic resistance of *E. coli* in sewage and sludge. **Water Research**, v. 37, n.8, p.1685-1690, apr. 2003.

RENNIE, R.P. et al. Occurrence and antimicrobial susceptibility patterns of pathogens isolated from skin and soft tissue infections: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (United States and Canada, 2000). **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 45, n. 4, p. 287-93, apr. 2003.

RESENDE, A.C.B. et al. Detection of antimicrobial-resistant gram-negative bacteria in hospital effluents and in the sewage treatment station of Goiânia, Brazil. **O Mundo da Saúde**, v.33, n.4, p.385-391, oct.- dec. 2009.

RICE, B.L.; BONOMO, R. A. Genetic and Biochemical mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. In: LORIAN, V. **Antibiotics in Laboratory Medicine**. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2005. p.441-476.

RIESENFELD, C. S.; SCHLOSS, P.D.; HANDELSMAN, J. Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. **Annual Review of Genetics**, v.38, p. 525-552, dec. 2004.

RIO DE JANEIRO (Estado). Lei nº 2.661, de 27 de dezembro de 1996 que regulamenta o disposto no art. 274 da Constituição do Estado do Rio de Janeiro no que se refere à exigência de níveis mínimos de tratamento de esgotos sanitários, antes de seu lançamento em corpos d'água e dá outras providências. **Diário Oficial do Estado do Rio de Janeiro**, 30 de dezembro de 1996.

- ROBLEDO, I. E; AQUINO, E. E; VÁSQUEZ, G. J. Detection of the KPC gene in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* during a PCR-based nosocomial surveillance study in Puerto Rico. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n.6, p. 2968-297, jun. 2011.
- ROCHENBACH, G.C. **Avaliação do perfil e da resistência bacteriana no efluente de um hospital em Itajaí/ Santa Catarina**. 2008. 111p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) - Universidade do Vale do Itajaí, Santa Catarina, 2008.
- ROMÃO, C. et al. Presence of qacEΔ1 gene and susceptibility to a hospital biocide in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* resistant to antibiotics. **Current Microbiology**, v.63, n.6, p.16-21, jul. 2011.
- RUIZ, L. G. P. **Resistência aos beta-lactâmicos e detecção dos genes blashv, blatem, blactx-m e blages em Enterobacteriaceae isoladas de efluentes hospital e comunitário em um município do noroeste paulista**. 2010. 74 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 2010. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/94851>>. Acesso em: 13 setembro 2015.
- RUPP, M.E.; FEY, P.D. Extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae: considerations for diagnosis, prevention and drug treatment. **Drugs**, v. 63, n. 4, p.353-365, 2003.
- SADER, H.S. et al. Comparative evaluation of the in vitro activity of three combinations of beta-lactams with beta-lactamase inhibitors: piperacillin/tazobactam, ticarcillin/clavulanic acid and ampicillin/sulbactam. **Braz J Infect Dis**, v. 4, n. 1, p. 22-8, feb. 2000.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **In: Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, v.1, 2, 3, 1989.
- SANTORO, D.; ROMÃO, C.; CLEMENTINO, M. Decreased aztreonam susceptibility among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from hospital effluent treatment system and clinical samples. **International Journal of Environmental Health Research**, v. 22, n. 6, p. 560-70, apr. 2012.
- SANTORO, D. et al. Diversity and antibiotic resistance profiles of Pseudomonads from a hospital wastewater treatment plant. **J Appl Microbiol**, v. 119, n. 6, p.1527-40, dec. 2015.
- SANTOS, L.H.M.L.M. et al. Contribution of hospital effluents to the load of pharmaceuticals in urban wastewaters: identification of ecologically relevant pharmaceuticals. **Sci Total Environ**, v. 461-462, p.302-316, sep. 2013.

SAYAH, R. S. et al. Patterns of antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* isolates obtained from domestic- and wild-animal fecal samples, human septage, and surface water. **Applied Environmental Microbiology**, v. 71, n.3, p.1394-1404, mar. 2005.

SCHEFFER, M. C, et al. Intrahospital spread of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a University Hospital in Florianópolis, Santa Catarina, Brazil. **Rev Soc Bras de Medicina Tropical**, v. 43, n. 4, p.367-371, 2010.

SCHMIEDER, R.; EDWARDS, R. Insights into antibiotic resistance through metagenomic approaches. **Future Microbiology**, v.7, n.1, p.73-79, jan. 2012.

SHUQAIR, N. S. M. S. A. Q. **A Política de Vigilância Sanitária de Medicamentos: Um estudo de caso na região da Lapa – Município de São Paulo**. 1996. 109p. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Faculdade de Saúde Pública, São Paulo, 1996.

SILVA, G.C. **Manejo e descarte de resíduos laboratoriais. Estudo e levantamento de dados de Laboratórios Analíticos**. Anvisa, 2005. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/reblas/procedimentos/manejo.pdf>> Acesso em: 15 maio 2013.

SILVEIRA, I. C. T.; MONTEGGIA, L. O. Uso de contadores biológicos rotatórios no tratamento de efluente hospitalar. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 22., 2003, Porto Alegre. **Anais**. Porto Alegre: ABES, 2003.

SLEKOVEC, C. et al. Tracking down antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates in a wastewater network. **Plos one**, v.7, n.12, dec. 2012.

SMALLA, K. et al. Rapid DNA extraction protocol from soil for polymerase chain reaction-mediated amplification. **J Appl Bacteriol**, v. 74, n.1, p. 78-85, jan. 1993.

_____. Exogenous isolation of antibiotic resistance plasmids from piggery manure slurries reveals a high prevalence and diversity of IncQ-like plasmids. **Appl Environ Microbiol**, v. 66, n.11, p. 4854-4862, nov. 2000.

SOARES, M.C.S.T. **Estudo de resistência aos antimicrobianos em amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas em hospitais da cidade de Niterói - RJ**. 2005. 77p. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Federal Fluminense, Curso de Pós-Graduação em Patologia, Niterói, 2005.

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

SOTO, S.M. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. **Virulence**, v. 4, n. 3, p.223-9, apr. 2013.

SOUZA, E.L. Contaminação ambiental pelos resíduos de serviços de saúde. **Revista Fafibe on-line**, São Paulo, ano 2, n.2. 2006. Disponível em: <http://www.fafibe.br/revistaonline/arquivos/eduardo_contaminacaoambiental.pdf> Acesso em: 14 set. 2014.

SPIERS, A.J.; BUCKLING, A.; RAINEY, P.B. The causes of *Pseudomonas* diversity. **Microbiology**, v. 146, p. 2345-2350, oct. 2000.

SPIPKER, T. et al. PCR-based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n.5, p. 2074-2079, may 2004.

STEELE, H.; STREIT, W.R. Metagenomics: Advances in ecology and Biotechnology. **FEMS Microbiology Letters**, v. 247, p.105-111, may 2005.

STOVER, C.K. et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. **Nature**, v. 406, n. 6799, p. 959-964, aug. 2000.

TISSIER, M.H. Recherches sur la flore intestinale normale des enfants ages d'un an a cin ans. **Ann Inst Pasteur**, v. 22, p.189-207, 1908.

TURCATTI, G. et al. A new class of cleavable fluorescent nucleotides: synthesis and optimization as reversible terminators for DNA sequencing by synthesis. **Nucleic Acids Res**, v. 36, n. 4, mar. 2008.

TURIEL, E. et al. Stability of fluoroquinolones antibiotics in river water samples and in octadecyl silica solid-phase extraction cartridges. **Anal Bioanal Chem**, v. 380, n. 1, p.123-128, sep. 2004.

TURQUE, A.S. et al. Environmental shaping of sponge associated archaeal communities. **PLoS One**, v. 5, n. 12, e15774, dec. 2010.

VAL-MORAES, S. P. et al. Diversidade de bactérias de solo sob vegetação natural e cultivo de hortaliças. **Revista Ciência Agronômica**, v. 40, n.1, p.7-16, jan.-mar. 2009.

VAN ELDERE, J. Multicentre surveillance of *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility patterns in nosocomial infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n.2, p.347-352, jan. 2003.

VARELA, A.R. et al. Insights into the relationship between antimicrobial residues and bacterial populations in a hospital-urban wastewater treatment plant system. **Water Research**, v. 54, p. 327-336, may 2014.

VARUZZA, L. Introdução à análise de dados de sequenciadores de nova geração Versão 2.0.1, abril 2013.

VECCHIA, A.D. et al. Diagnóstico sobre a situação do tratamento do esgoto hospitalar no Brasil. **Revista Saúde e Ambiente**, v.10, n. 2, p.65-70, nov. 2009.

VERLICCHI, P. et al. Hospital effluents as a source of emerging pollutants: An overview of micropollutants and sustainable treatment options. **Journal of Hydrology**, v.389, n.3-4, p. 416-428, aug. 2010.

VERLICCHI, P.; AUKIDY, M. AL.; ZAMBELLO, E. Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment – A review. **Sci Total Environ**, v. 429, p. 123-155, jul. 2012.

VERLICCHI, P. et al. Hospital effluent: investigation of the concentrations and distribution of pharmaceuticals and environmental risk assessment. **Sci Total Environ**, v.430, p. 109-118, jul. 2012.

VERLICCHI, P.; AUKIDY, M. AL.; ZAMBELLO, E. What have we learned from worldwide experiences on the management and treatment of hospital effluent? — An overview and a discussion on perspectives. **Sci Total Environ**, v. 514, p. 467-491, feb. 2015.

VIEIRA, R.P. et al. Archaeal communities in a tropical estuarine ecosystem: Guanabara Bay, Brazil. **Microbial Ecology**, v. 54, n. 3, p.460-468, oct. 2007.

VILA, J.; MARTÍ, S.; SÁNCHEZ-CÉSPEDES, J. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.59, n.6, p.1210-1215, jun. 2007.

VILMORE, J. Antibióticos somente ser vendidos com retenção de receita. **180graus**. Piauí, 29 out. 2010. Disponível em: <<http://www.180graus.com/farmacia/10>>. Acesso em: 16 set. 2014.

WILLIAM, A.P. Penicilinas, cefalosporinas e outros antibióticos betalactâmicos. In: Goodman E Gilman. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 11a. ed. Rio de Janeiro: Mc Graw-Hill, 2006. p.1025-1035.

WOESE, C.R. Bacterial evolution. **Microbial Rev**, v. 51, n. 2, p. 221-271, jun. 1987.

WRIGHT, G.D. Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. **Advanced Drug Delivery Review**, v.57, n .10, p. 1451-1464, jul. 2005.

XU, J. et al. Employment of 16 S rDNA gene sequencing techniques to identify culturable environmental eubacteria in a tertiary referral hospital. **J Hosp Infect**, v. 57, n.1, p. 52-8, may 2004.

YANG, Y. et al. Fate of antibiotic resistance genes in sewage treatment plant revealed by metagenomic approach. **Water Research**, v.62, p. 97-106, oct. 2014.

ZHANG, X.X.; ZHANG, T. Occurrence, abundance, and diversity of tetracycline resistance genes in 15 sewage treatment plants across China and other global locations. **Environ Sci Technol**, v. 45, n.7, p. 2598-2604, apr. 2011.

ZHANG, T.; ZHANG, X. X.; YE, L. Plasmid metagenome reveals high levels of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements in activated sludge. **PLoS One**, v. 6, n.10, oct. 2011.

ZHU, Y.G. et al. Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms. **Proc Natl Acad Sci**, v.110, n. 9, p.3435-40, feb. 2013.

ANEXO A - MEIOS DE CULTURA

1. Caldo Nutriente

Cloreto de sódio.....5g
 Peptona.....10g
 Extrato de carne3g
 Água destilada q.s.p.....1000 mL

- Pesar cada um dos reagentes separadamente.
- Verter os reagentes no erlenmeyer solubilizando-os com água sob a placa de agitação e aquecimento, até o volume final de 1000 mL.
- Ajustar o pH para 7,4 com NaOH ou HCl.
- Autoclavar durante 15 minutos a 121°C.

Inoculação e cultivo

- O meio líquido será distribuído no volume de 5 mL em tubos de ensaio 18x160mm.
- A inoculação e semeadura serão realizadas em capela de fluxo laminar.

2. Ágar Nutriente

Cloreto de sódio.....5g
 Peptona.....10g
 Extrato de carne3g
 Ágar.....20g
 Água destilada q.s.p.....1000 mL

- Pesar cada um dos reagentes separadamente.
- Verter os reagentes no erlenmeyer solubilizando-os com água sob a placa de agitação e aquecimento, até o volume final de 1000 mL.
- Solubilizar por último o ágar.
- Ajustar o pH para 7,4 com NaOH ou HCl.
- Autoclavar durante 15 minutos a 121°C.

Inoculação e cultivo

- O meio sólido será distribuído no volume de 20 mL em placas de Petri.
- A inoculação e semeadura serão realizadas em capela de fluxo laminar.

3. Ágar Cetrimide

Finalidade: O ágar cetrimide é um meio seletivo utilizado para isolamento e identificação de *P. aeruginosa*. Outras bactérias são inibidas pelo composto cetrimide (brometo e cetilamônio). O resultado positivo indica o crescimento da cepa com produção de pigmento azul, azul-esverdeado, amarelo-esverdeado ou sem pigmento.

Preparo

Peptona	20g
Cloreto de magnésio.....	14g
Sulfato de potássio.....	10g
Cetrimide	0,3g
Ágar	13,6g
Glicerol.....	10 mL
Água destilada q.s.p.....	1000 mL

- Suspender os componentes em água destilada.
- Dissolver por aquecimento à ebulição.
- Autoclavar a 121°C por 15 minutos.
- Resfriar a 50°C.
- Distribuir em placas de Petri (15x100mm). pH final = 7,1 ± 0,2.

4. Ágar Mueller Hinton

Finalidade: O ágar Mueller Hinton é um meio de cultura microbiológico que é frequentemente usado para testes de susceptibilidade antimicrobiana.

Preparo

Infusão de carne	300 g/L
Caseína hidrolisada.....	17,5 g/L
Amido.....	1,5 g/L
Ágar	17 g/L

Oxoid Lote: 767739

Preparado de acordo com as instruções do fabricante. pH final = $7,3 \pm 0,1$.

Distribuir em placas de Petri (15x100mm).

ANEXO B - PROVAS BIOQUÍMICAS

1. Método de Gram:

Finalidade: A coloração de Gram é muito utilizada em bacteriologia permitindo a distinção entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. A diferença entre os dois tipos de células relaciona-se com a estrutura da parede celular das bactérias. Assim a parede celular de bactérias Gram-positivas é formada por uma camada espessa de peptidoglicano, enquanto que a parede celular de bactérias Gram-negativas é formada por uma camada fina de peptidoglicano, rodeada por uma membrana externa de lipopolissacarídeo (LPS) e proteína. Diferenças na permeabilidade destas membranas aos reagentes químicos levam a diferenças de coloração. Na técnica de Gram utiliza-se primeiro um corante básico, o cristal violeta, seguido de um mordente, o iodo de Gram que aumenta a afinidade da célula para o corante. O cristal violeta mais o lugol formam um complexo insolúvel (pararosanilina) no interior das células. Após é adicionado um agente descolorante, o álcool a 95%, que remove o corante, e finalmente um segundo corante básico, a fucsina. As células que retêm o primeiro corante chamam-se Gram-positivas e as que descoram ficarão coradas pelo segundo corante, são as Gram-negativas. Nas Gram-negativas, o solvente álcool ou acetona remove a membrana externa da parede destas bactérias, e como a camada de mucocomplexo é pouco espessa não consegue reter o corante violeta de cristal que é assim retirado da célula por lavagem.

Preparo dos reagentes

Cristal Violeta (Segundo Hucker)

Solução A:

Cristal violeta.....2g
Álcool etílico q.s.p.....20 mL

Solução B:

Oxalato de amônio.....0,8g
 Água destilada q.s.p80 mL

- Misturar as soluções A e B.
- Deixar em repouso por 24 horas.
- Filtrar em papel whatman nº 1.
- Armazenar em frasco escuro.

Solução de Lugol

Iodo..... 1g
 Iodeto de potássio2g
 Água destilada q.s.p 300 mL

- Macerar o iodo e o iodeto de potássio em um gral.
- Adicionar água aos poucos e misturar bem. Completar o volume com água destilada.
- Armazenar em frasco escuro.

Descorante

Agente intermediário: álcool - acetona (100 mL de álcool etílico 95% e 100 mL de acetona)

Misturar e guardar em frasco escuro.

Fucsina Fenicada (Segundo Ziehl)

Fucsina básica.....1g
 Álcool etílico 95%10 mL
 Fenol fundido.....5g
 Água destilada q.s.p.....100 mL

- Dissolver em um gral a fucsina no álcool.
- Acrescentar aos poucos o fenol.
- Homogeneizar até completa dissolução.

- Completar o volume com água para 100 mL.
- Filtrar após 24 horas de repouso.
- Guardar em frasco escuro.

Procedimento:

- Fixar o esfregaço bem homogêneo ao calor (bico de bunsen).
- Cobrir o esfregaço com solução de cristal violeta por 1 minuto.
- Escorrer o corante e cobrir durante 1 minuto com solução de lugol.
- Lavar em água corrente.
- Descorar com álcool-acetona.
- Lavar a lâmina rapidamente com água corrente.
- Cobrir o esfregaço com fucsina e deixar corar por trinta segundos com fucsina de Ziehl.
- Lavar em água corrente.
- Deixar secar.
- Pingar na lâmina 1 gota de óleo mineral e observar ao microscópio.

Interpretação:

Micro-organismos Gram-positivos: cor roxa

Micro-organismos Gram- negativos: cor rosa

2. Oxidase

Finalidade: verificar se a bactéria é produtora da enzima citocromo oxidase.

Os citocromos são proteínas que contém ferro e agem como o elo final da cadeia respiratória transferindo elétrons (hidrogênio) para o oxigênio, com formação de água. O teste da oxidase utiliza reagente, como o dicloridrato de tetrametil-p-fenilenodiamina, que substitui o oxigênio como acceptor de elétrons. No estado reduzido o indicador é incolor; entretanto na presença de citocromo oxidase e oxigênio atmosférico, forma-se um produto colorido rosa.

As bactérias aeróbias estritas são oxidase positiva e as bactérias aeróbias anaeróbias facultativas são oxidase negativa.

Preparo

Reativo de Kovacs

Dicloridrato de tetrametil-p-fenilenodiamina.....1g
Água destilada q.s.p.....100 mL

- Dissolver 1g do reagente em menos de 100 mL de água destilada.
- Aquecer para solubilizar.
- Transferir para um balão volumétrico e avolumar com água destilada até 100 mL.
- Deixar descansar por 15 minutos antes de usar.
- Estocar em frasco escuro para evitar exposição à luz.

Procedimento:

- Colocar um pedaço de papel de filtro Whatman em uma placa de Petri.
- Transferir a colônia suspeita, com o auxílio de uma haste de madeira ou plástica, para um papel de filtro.
- Adicionar 2 a 3 gotas do reagente de Kovacs no centro do papel.
- Observar a reação.

Interpretação:

Teste positivo: cor rosa/ púrpura em 10 segundos.

Teste negativo: ausência de troca de cor.

ANEXO C - MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO

Liofilização (Freeze-drying)

As culturas foram semeadas em meios de cultivo apropriados e após a incubação o crescimento foi coberto com "Skim Milk" (DIFCO 0001) a 10%, retirado com o auxílio de uma alça de Drigalsky e transferido para ampolas estranguladas, em volumes de 0,3 a 0,5 mL por ampola. Após a distribuição da suspensão em ampolas, estas foram colocadas em um banho de gelo seco e etanol absoluto, para congelamento rápido, aonde a temperatura do banho chega à $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Em 30 - 60 segundos de imersão no banho gelado, a suspensão congelou e foi transferida para um freezer à $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, onde permaneceu por 24-48 horas, antes de ser liofilizada. Este congelamento rápido é importante para evitar a formação de cristais de gelo entre as membranas dos micro-organismos, o que poderia inviabilizar as células, levando a ruptura de estruturas vitais das células.

Após 72 horas à $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, as ampolas foram colocadas no liofilizador com o objetivo de retirar toda água da amostra por meio do congelamento à vácuo. O processo acontece por conta da pressão que o vácuo ocasiona no material fazendo com que haja a passagem da água em estado sólido para o estado gasoso. Após 18 horas, as ampolas foram transferidas para uma "árvore", que permite a finalização do processo e o fechamento das ampolas com auxílio de um maçarico de chama dupla. Foram liofilizadas 5 ampolas de cada micro-organismo.

ANEXO D - PREPARO DE TAMPÕES E GEL

Tampão Tris-Borato – EDTA 10X (TBE 10X)

TRIS base.....	121,1g
Ácido bórico	61,8g
NA ₂ EDTA.....	3,7g
Água MilliQ esterilizada q.s.p.....	1000 mL

Tampão TBE 0,5 X

Tampão TBE 10X.....	50 mL
Água MilliQ esterilizada q.s.p.....	500 mL

Gel de agarose (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989)

Agarose (Sigma A-0169).....	1,5g
TBE (0,5X).....	100 mL
Brometo de etídio (10 mg/mL).....	3,0 µL

**APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO NA JOURNAL OF APPLIED
MICROBIOLOGY (2015)**