



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA
SERGIO AROUCA
ENSP

Kaylanne Montenegro da Silva

Caracterização de *Enterobacteriales* multirresistentes em estações de tratamento de esgoto e avaliação de sua remoção por processo foto-Fenton heterogêneo mediado por resíduo de mineração

Rio de Janeiro

2023

Kaylanne Montenegro da Silva

Caracterização de *Enterobacteriales* multirresistentes em estações de tratamento de esgoto e avaliação de sua remoção por processo foto-Fenton heterogêneo mediado por resíduo de mineração

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de Concentração: Gestão e Saneamento Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Rubens Guimarães Barrocas.

Coorientadores: Prof. Dr. Enrico Mendes Saggioro e Prof. Dr. Kayo Cesar Bianco Fernandes.

Rio de Janeiro

2023

Título do trabalho em inglês: Characterization of multidrug-resistant *Enterobacterales* in wastewater treatment plants and assessment of their removal through heterogeneous photo-Fenton process mediated by mining residue.

O presente trabalho foi realizado com apoio de Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - Código de Financiamento 001.

S586c

Silva, Kaylanne Montenegro da.

Caracterização de *Enterobacterales* multirresistentes em estações de tratamento de esgoto e avaliação de sua remoção por processo foto-Fenton heterogêneo mediado por resíduo de mineração / Kaylanne Montenegro da Silva. -- 2023.

149 f. : il.color.

Orientador: Paulo Rubens Guimarães Barrocas.

Coorientadores: Enrico Mendes Saggiaro e Kayo Cesar Bianco Fernandes.

Tese (Doutorado em Saúde Pública e Meio Ambiente) - Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Rio de Janeiro, 2023.

Bibliografia: f. 116-148.

1. Enterobacteriaceae. 2. Resistência a Antimicrobianos. 3. Enterobacteriáceas Resistentes a Carbapenêmicos. 4. Efluentes. 5. Processos Oxidativos Avançados. I. Título.

CDD 579.34

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Rede de Bibliotecas da Fiocruz com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecário responsável pela elaboração da ficha catalográfica: Cláudia Menezes Freitas - CRB-7-5348
Biblioteca de Saúde Pública

Kaylanne Montenegro da Silva

Caracterização de *Enterobacteriales* multirresistentes em estações de tratamento de esgoto e avaliação de sua remoção por processo foto-Fenton heterogêneo mediado por resíduo de mineração

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de Concentração: Gestão e Saneamento Ambiental.

Aprovada em: 06 de julho de 2023.

Banca Examinadora

Prof.^a Dra. Camila Costa de Amorim Amaral
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Dr. Felipe Piedade Gonçalves Neves
Universidade Federal Fluminense

Prof.^a Dra. Maysa Beatriz Mandetta Clementino
Fundação Oswaldo Cruz – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Prof.^a Dra. Joseli Maria Rocha Nogueira
Fundação Oswaldo Cruz – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

Prof. Dr. Kayo Cesar Bianco Fernandes (Coorientador)
Fundação Oswaldo Cruz – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Prof. Dr. Enrico Mendes Saggioro (Coorientador)
Fundação Oswaldo Cruz – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

Prof. Dr. Paulo Rubens Guimarães Barrocas (Orientador)
Fundação Oswaldo Cruz – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

Rio de Janeiro

2023

Dedico esta conquista ao meus pais Katia e Sidney e ao meu marido Felipe por todo apoio e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me dar saúde, me guiar e me fortalecer durante todo esse caminho.

Aos meu pais Sidney e Katia por todo o amor e ajuda incondicional.

Ao meu marido Felipe pelo seu amor, companheirismo, suporte e apoio em todos os momentos.

Aos orientadores Paulo Barrocas, Enrico Saggiore e Kayo Bianco por terem me aceitado como aluna, por todo apoio, confiança, oportunidade, paciência e ensinamentos.

À Maysa Mandetta pelo acolhimento em seu laboratório, oportunidade e todos os ensinamentos.

Ao Thiago Chagas e a Sheila Duque que foram essenciais para dar início a este projeto e me ajudaram muito.

Aos membros da banca examinadora Camila Amorim, Felipe Neves, Joseli Nogueira e Maysa Mandetta pela gentileza em aceitarem fazer parte da avaliação deste estudo.

Aos companheiros de laboratório e amigos Aninha, Andressa, Aline, Bia, Flores, Mari, Tati, Maiara, Vini, Vinicinho e Taíssa por toda ajuda, companheirismo e apoio que deixaram todo esse processo mais leve.

Aos parceiros do laboratório DSSA Maycon, Bárbara, Lícia e Larissa pela ajuda com as análises físico-químicas.

Aos parceiros do laboratório LAPSA que me receberam para as análises do reator e Michele que me ajudou a entender os procedimentos.

Às amigas Rapha e Nath que sempre estiveram ao meu lado me apoiando.

Aos funcionários dos setores de Meio de Cultura e Esterilização que me ajudaram muito sempre que puderam.

Ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente e aos professores da Escola Nacional de Saúde Pública e Meio Ambiente pela contribuição no meu crescimento acadêmico.

À CAPES pela concessão de bolsa.

Agradeço à todas as pessoas que contribuíram direta e indiretamente para realização deste trabalho.

“Não deixe de fazer algo que gosta, devido à falta de tempo, pois a única falta que terá, será desse tempo que infelizmente não voltará mais”

(QUINTANA, 1981, p. 67)

RESUMO

A presença de *Enterobacterales* resistentes aos carbapenêmicos e polimixinas no ecossistema aquático representa um grande desafio para a saúde pública globalmente. As Estações de Tratamento de Esgotos (ETEs) são consideradas como reservatórios desses patógenos, contribuindo com a sua disseminação para o ambiente. Desta forma, para a remoção de bactérias multirresistentes e, conseqüentemente, redução de riscos ambientais, é necessária a implementação de tecnologias de desinfecção, como os processos oxidativos avançados (POAs) catalisados por resíduos de mineração, fornecendo valor agregado a esse material. O objetivo deste estudo foi avaliar a ocorrência de *Enterobacterales* resistentes a carbapenêmicos e/ou polimixinas em efluentes de diferentes ETEs, além de investigar o potencial de POAs usando resíduo da mineração na remoção de *Klebsiella pneumoniae* multidroga resistente ao gene *bla_{KPC}* no efluente tratado por POA. Para este fim, foram coletadas e caracterizadas seis amostras de efluentes brutos e tratados de três diferentes ETEs localizadas no Rio de Janeiro. A partir de meios seletivos foram isoladas e identificadas, pelo sistema MALDI-TOF, 98 *Enterobacterales*. O perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos foi avaliado pelo método disco-difusão e concentração inibitória mínima por microdiluição em caldo. Das 98 cepas, 3,1% (3/98) foram suscetíveis a todos os antimicrobianos, 18,4% (18/98) apresentaram o perfil não-MDR (“*multidrug-resistant*”), 54,1% (53/98) o perfil MDR; 23,5% (23/98) XDR (“*extensively drug-resistant*”), e 1% (1/98) PDR (“*pandrug-resistant*”). A presença dos genes *bla_{NDM}*, *bla_{KPC}*, *bla_{OXA-48-like}*, *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*, *bla_{GES}*, *bla_{BKC}* e *mcr-1, 2, 3, 4, 5* foi investigada pela PCR. Entre os genes investigados, o gene *mcr-1* foi encontrado apenas em uma *Escherichia coli*, sendo este o primeiro relato deste gene em efluentes no Brasil. Além disso, foram detectados os genes *bla_{NDM}* (51,7%; 30/58); *bla_{KPC}* (24,1%; 14/58); *bla_{OXA-48-like}* (22,4%; 13/58); e *bla_{IMP}* (5,2%; 3/58). Avaliamos também a relação clonal de *K. pneumoniae* por MLST. A análise da relação clonal de *K. pneumoniae* revelou cinco “*sequence types*” (STs): ST11, ST37, ST147, ST281, ST244, sendo o primeiro relato da presença dos STs 244 e 281 em efluentes. Uma cepa *K. pneumoniae* ST11 carregando gene *bla_{KPC}* foi selecionada para os testes com os processos oxidativos combinados com resíduo de mineração. O processo combinado se mostrou eficiente para eliminação de *K. pneumoniae* e redução do número de cópias gene *bla_{KPC}* em efluentes tratados. Os resultados deste estudo destacam a importância do monitoramento da resistência antimicrobiana em ETEs, além da necessidade de implementação de tecnologias alternativas para desinfecção de efluentes, a fim de contribuir para a redução da propagação da resistência bacteriana no ambiente.

Palavras-chave: *Enterobacteriaceae*; Resistência a antimicrobianos; *Enterobacteriaceae* Resistentes a Carbapenêmicos; Efluentes; Processos Oxidativos Avançados.

ABSTRACT

The presence of carbapenem and polymyxin-resistant *Enterobacteriales* in the aquatic ecosystem represents a major challenge for global public health. Wastewater Treatment Plants (WWTPs) are considered reservoirs of these pathogens, contributing to their dissemination in the environment. In this way, for the removal of multidrug-resistant bacteria and consequently, reduction of environmental risks, the implementation of disinfection technologies, such as catalyzed advanced oxidative processes (AOPs) using mining waste, is necessary, providing added value to this material. The aim of this study was to assess the occurrence of carbapenem and/or polymyxin-resistant *Enterobacteriales* in effluents from different WWTPs, as well as to investigate the potential of combined advanced oxidative processes using mining waste in the removal of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* carrying the *bla_{KPC}* gene and this gene in the effluent treated by AOPs. For this purpose, six samples of untreated and treated wastewater from three different WWTPs located in Rio de Janeiro were collected and characterized. From selective media, 98 *Enterobacteriales* isolates were obtained and identified using the MALDI-TOF system. The antimicrobial susceptibility profile was evaluated by the disk diffusion method and minimum inhibitory concentration by broth microdilution. Out of the 98 strains, 3.1% (3/98) were susceptible to all antimicrobials, 18.4% (18/98) showed the non-MDR (multidrug-resistant) profile, 54.1% (53/98) showed the MDR profile, 23.5% (23/98) showed the XDR (extensively drug-resistant) profile, and 1% (1/98) showed the PDR (pandrug-resistant) profile. The presence of the *bla_{NDM}*, *bla_{KPC}*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*, *bla_{GES}*, *bla_{BKC}* and *mcr-1*, 2, 3, 4, 5 genes was investigated by PCR. Among the investigated genes, the *mcr-1* gene was found only in one *Escherichia coli*, representing the first report of this gene in effluents in Brazil. Additionally, the *bla_{NDM}* (51.7%; 30/58), *bla_{KPC}* (24.1%; 14/58), *bla_{OXA-48}*-like (22.4%; 13/58), and *bla_{IMP}* (5.2%; 3/58) genes were detected. We also evaluated the clonal relationship of *K. pneumoniae* by MLST. Analysis of the clonal relationship of *K. pneumoniae* isolates revealed five sequence types (STs): ST11, ST37, ST147, ST281, ST244, with the first report of the presence of STs 244 and 281 in wastewater. A *K. pneumoniae* ST11 strain carrying the, *bla_{KPC}* gene was selected for tests using combined oxidative processes with mining residues. The combined process proved to be efficient in eliminating *K. pneumoniae* and reducing the number of, *bla_{KPC}* gene copies in the treated effluents. The results of this study highlight the importance of monitoring antimicrobial resistance in WWTPs, as well as the need for the implementation of alternative technologies for wastewater disinfection, in order to contribute to the reduction of bacterial resistance propagation in the environment.

Keywords: *Enterobacteriaceae*; Antibiotic Resistance; Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*; Wastewater; Advanced Oxidative Processes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Esquema do processamento das amostras, isolamento e preservação das bactérias.....	55
Figura 2	(A) Reator de bancada com a lâmpada de radiação UVA desligada. (B) Reator com a luz UVA ligada com papel alumínio de proteção.....	62
Figura 3	Esquema geral dos experimentos de remoção da <i>K. pneumoniae</i> CCVSU 7173 e o gene <i>bla_{KPC}</i>	65
Figura 4	Total de isolados identificados classificados pelas ordens bacterianas.....	70
Figura 5	Distribuição dos gêneros bacteriano isolados na ETE1 (A), ETE2 (B) e ETE3(C).....	71
Figura 6	Distribuição dos gêneros bacterianos isolados nos pontos de coleta.....	71
Figura 7	Resistência antimicrobiana de <i>Enterobacterales</i> em função dos efluentes bruto e tratado das ETES 1, 2 e 3.....	73
Figura 8	Percentual do perfil de resistência de cada gênero bacteriano. MDR: <i>multidrug-resistant</i> , XDR: <i>extensively drug-resistant</i> e PDR: <i>pandrug-resistant</i>	76
Figura 9	Percentual de isolados com atividade de carbapenemases nos efluentes bruto e tratado das ETES 1, 2 e 3.....	80
Figura 10	Frequência da detecção dos genes nos isolados testados nas ETES 1, 2 e 3.....	81
Figura 11	Percentual dos perfis genéticos de resistência dos isolados dos efluentes bruto e tratado das ETES 1, 2 e 3.....	83
Figura 12	Perfis genéticos distribuídos entre os efluentes bruto e tratados das ETES 1, 2 e 3.....	84
Figura 13	Análise <i>Minimal Spanning Tree</i> (MST) de <i>Klebsiella pneumoniae</i> isoladas no Brasil depositadas no banco de dados MLST do Instituto Pasteur. O tamanho dos círculos representa a quantidade de isolados depositados de cada ST. Os STs encontrados neste estudo estão nomeados na Figura (ST11, ST37, ST147, ST244 e ST281). A fonte de isolamento é indicada por cores diferentes, as cepas de todos os isolados de fontes ambientais depositados no banco estão em laranja.....	90

- Figura 14** (A) Quantificação de *Klebsiella pneumoniae* CCVSU 7173 sob tratamento de H₂O₂ no escuro em solução salina 0,85% ao longo dos tempos 0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 min. (B) Consumo de H₂O₂. LD: Limite de detecção. [H₂O₂] = 10, 20 e 30 mg.L⁻¹; radiação acumulada = 6.80 mW cm⁻²; pH: 7..... 96
- Figura 15** (A) Quantificação de *Klebsiella pneumoniae* CCVSU 7173 sob tratamento UVA/ H₂O₂ em solução salina 0,85% ao longo dos tempos 0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 min. (B) Consumo de H₂O₂. LD: Limite de detecção. [H₂O₂] = 10, 20 e 30 mg.L⁻¹; radiação acumulada = 6.80 mW cm⁻²; pH: 7..... 97
- Figura 16** (A) Quantificação de *Klebsiella pneumoniae* CCVSU 7173 sob tratamento de H₂O₂/catalisador no escuro em solução salina 0,85% ao longo dos tempos 0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 min. (B) Consumo de H₂O₂. LD: Limite de detecção. [H₂O₂] = 10, 20 e 30 mg.L⁻¹; [catalisador] = 277 mg.L⁻¹; radiação acumulada = 6.80 mW cm⁻²; pH: 7..... 99
- Figura 17** (A) Quantificação de *Klebsiella pneumoniae* CCVSU 7173 sob tratamento UVA/ H₂O₂/catalisador em solução salina 0,85% ao longo dos tempos 0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 min. (B) Consumo de H₂O₂. LD: Limite de detecção. [H₂O₂] = 10, 20 e 30 mg.L⁻¹; [catalisador] = 277 mg.L⁻¹; radiação acumulada = 6.80 mW cm⁻²; pH: 7..... 100
- Figura 18** (A) Quantificação de *Klebsiella pneumoniae* CCVSU 7173 sob tratamento H₂O₂/catalisador no escuro em solução salina 0,85%, efluente sintético e efluente tratado ao longo dos tempos 0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 min. (B) Consumo de H₂O₂. LD: Limite de detecção. [H₂O₂] = 20 mg.L⁻¹; [catalisador] = 277 mg.L⁻¹; radiação acumulada = 6.80 mW cm⁻²; pH: 7..... 106
- Figura 19** (A) Quantificação de *Klebsiella pneumoniae* CCVSU 7173 sob tratamento UVA/ H₂O₂/catalisador em solução salina 0,85%, efluente sintético e efluente tratado ao longo dos tempos 0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 min. (B) Consumo de H₂O₂. LD: Limite de detecção. [H₂O₂] = 20 mg.L⁻¹; [catalisador] = 277 mg.L⁻¹; radiação acumulada = 6.80 mW cm⁻²; pH: 7..... 107

- Figura 20** Valores dos CT das qPCRs para o gene *bla_{KPC}* da *K. pneumoniae* CCVSU 7173 sob os tratamentos: (A) H₂O₂ no escuro e (B) UVA/ H₂O₂ em solução salina 0,85% ao longo dos tempos 0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 min. [H₂O₂] = 10, 20 e 30 mg.L⁻¹; radiação acumulada = 6.80 mW cm⁻²; pH: 7..... 110
- Figura 21** Valores dos CT das qPCRs para o gene *bla_{KPC}* da *K. pneumoniae* CCVSU 7173 sob os tratamentos: (A) H₂O₂/catalisador no escuro e (B) UVA/H₂O₂/catalisador em solução salina 0,85% ao longo dos tempos 0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 min. [H₂O₂] = 10, 20 e 30 mg.L⁻¹; [catalisador] = 277 mg.L⁻¹; radiação acumulada = 6.80 mW cm⁻²; pH: 7..... 111
- Figura 22** Valores dos CT das qPCRs para o gene *bla_{KPC}* da *K. pneumoniae* CCVSU 7173 sob os tratamentos: (A) H₂O₂/catalisador e (B) UVA/ H₂O₂/catalisador em solução salina 0,85%, efluente sintético e efluente tratado ao longo dos tempos 0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 min. [H₂O₂] = 20 mg.L⁻¹; [catalisador] = 277 mg.L⁻¹; radiação acumulada = 6.80 mW cm⁻²; pH: 7..... 112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Metodologias das análises físico-químicas das amostras de esgoto..	53
Tabela 2	Conjuntos de meios de cultura acrescidos de antimicrobianos.....	54
Tabela 3	Iniciadores específicos para detecção dos genes codificadores de carbapenemases.....	59
Tabela 4	Iniciadores específicos para detecção dos genes codificadores de fosfoetanolaminas transferases.....	60
Tabela 5	Parâmetros físico-químicos e microbiológicos dos efluentes bruto e tratado analisados.....	67
Tabela 6	Caracterização das cepas da espécie <i>Klebsiella pneumoniae</i> resistentes aos carbapenêmicos.....	89
Tabela 7	Parâmetros físico-químicos dos efluentes sintético e tratado.....	105

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BRA	Bactérias Resistentes a Antimicrobianos
CC	Complexo Clonal
CCVSU	Coleção de Culturas de Vigilância em Saúde Única
CIM	Concentração Inibitória Mínima
COT	Carbono Orgânico Total
CT	<i>Cycle Threshold</i>
DQO	Demanda Química de Oxigênio
DRSAI	Doenças Relacionadas ao Saneamento Ambiental Inadequado
EB	Efluentes brutos
EMB	<i>Eosin Methylene Blue</i>
ESBL	<i>Extended-Spectrum β-Lactamase</i>
ETAR	Estação de Tratamento de Águas Residuais
ET	Efluentes Tratados
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GES	Espectro Estendido da Guiana β -lactamase
GRA	Genes de Resistência a Antimicrobianos
IMP	Imipenemase
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
IPCS	Infecção Primária de Corrente Sanguínea
KPC	<i>Klebsiella Pneumoniae</i> Carbapenemase
KPRC	<i>Klebsiella Pneumoniae</i> Resistentes aos Carbapenêmicos
LMR/SBA	Laboratório de Microrganismos de Referência/Setor de Bactérias e Arqueas
LPS	Lipopolissacarídeo
MALDI-TOF-MS	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight</i>

MBBR	<i>Moving Bed Biofilm Reactor</i>
MβL	Metalo-β-Lactamase
MCR	<i>Mobile Colistin Resistance</i>
MDR	<i>Multidrug-resistant</i>
MLST	<i>Multilocus Sequence Type</i>
MS	Ministério da Saúde
NDM	New Delhi Metalo-β-Lactamase
NMP	Número Mais Provável
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
OMS	Organização Mundial de Saúde
OXA	Oxacilinas
PAN-BR	Plano de Ação Nacional para Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos do Brasil
pEtN	Fosfoetanolamina
PDR	<i>Pandrug-resistant</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PLP	Proteínas Ligantes de Penicilina
POA	Processos Oxidativos Avançados
qPCR	<i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
SβL	Serino-β-Lactamase
ST	<i>Sequence Typing</i>
SHV	β-lactamase Variante Sulfidríla
SME	Enzima <i>Serratia marcescens</i>
SST	Sólidos Suspensos Totais
TEM	Temoneira
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UTI	Unidade de Tratamento Intensivo
UV	Radiação Ultravioleta
VIM	Verona Imipenemase
XDR	<i>Extensively Drug-Resistant</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	21
2.1	GERAL	21
2.2	ESPECÍFICOS	21
3	REFERENCIAL TEÓRICO	22
3.1	A IMPORTÂNCIA DO SANEAMENTO NA SAÚDE HUMANA E AMBIENTAL	22
3.2	ORDEM <i>Enterobacterales</i>	23
3.3	RESISTÊNCIA BACTERIANA AOS β-LACTÂMICOS E POLIMIXINA	25
3.3.1	β-lactâmicos	27
3.3.2	Polimixinas	31
3.4	RESISTÊNCIA BACTERIANA NOS EFLUENTES	34
3.5	PROCESSOS DE DESINFECÇÃO DE EFLUENTES	41
3.6	PROCESSOS OXIDATIVOS AVANÇADOS	42
3.6.1	Processos Fenton e foto-Fenton	44
3.6.2	Minerais naturais de ferro como catalisador	46
3.7	INATIVAÇÃO BACTERIANA MEDIADA POR PROCESSOS OXIDATIVOS AVANÇADOS	48
4	METODOLOGIA	52
4.1	LOCAIS DE ESTUDO	52
4.2	COLETA, PROCESSAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS	52
4.3	ANÁLISE DE COLIFORMES TOTAIS E <i>Escherichia coli</i>	53
4.4	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA	54
4.5	AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS	55
4.5.1	Teste de disco-difusão	55
4.5.2	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos β-lactâmicos	56
4.5.3	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) da polimixina	56

4.6	DETECÇÃO DA ATIVIDADE DE CARBAPENEMASES.....	57
4.7	DETECÇÃO DE DETERMINANTES GENÉTICOS DE RESISTÊNCIA.....	58
4.7.1	Genes que codificam carbapenemases.....	58
4.7.2	Genes codificadores fosfoetanolamina transferase.....	59
4.8	ANÁLISE DA RELAÇÃO CLONAL DE <i>Klebsiella pneumoniae</i>	60
4.9	REMOÇÃO DE <i>Klebsiella pneumoniae</i> E GENE <i>bla</i> _{KPC}	61
4.9.1	Materiais e reagentes.....	61
4.9.2	Caracterização do resíduo da mineração e reator.....	61
4.9.3	Preparo da cultura bacteriana para inoculação na matriz.....	63
4.9.4	Otimização dos processos oxidativos.....	63
4.9.5	Avaliação dos processos oxidativos otimizados em efluente sintético e tratado.....	65
4.9.6	Detecção do gene <i>bla</i> _{KPC} no isolado após o tratamento.....	66
4.9.7	Análise do consumo de peróxido de hidrogênio.....	66
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
5.1	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DAS AMOSTRAS.....	67
5.2	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE <i>Enterobacteriales</i>	69
5.3	AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA.....	72
5.4	DETECÇÃO DE DETERMINANTES DE RESISTÊNCIA ÀS POLIMIXINAS.....	77
5.5	AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE DE CARBAPENEMASES.....	79
5.6	DETECÇÃO DE GENES QUE CODIFICAM CARBAPENEMASES.....	81
5.7	RELAÇÃO CLONAL DE ISOLADOS <i>Klebsiella pneumoniae</i>	88
5.8	REMOÇÃO DA <i>Klebsiella pneumoniae</i> CCVSU 7173 E GENE <i>bla</i> _{KPC}	95
5.8.1	Ensaio de otimização da concentração de peróxido de hidrogênio.....	95
5.8.2	Avaliação da eficiência dos POAs em efluentes sintético e tratado.....	105
5.8.3	Avaliação da eficiência dos POAs na remoção do gene <i>bla</i> _{KPC}	109
6	CONCLUSÃO.....	114
	REFERÊNCIAS.....	116

ANEXO A – ARTIGO PUBLICADO.....	149
--	------------

1. INTRODUÇÃO

As *Enterobacterales* são patógenos oportunistas de humanos e animais que podem fazer parte da microbiota natural do hospedeiro, e são ubíquos na natureza (ROCK; DONNENBERG, 2014). Bactérias desta ordem são consideradas os principais agentes causadores das infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) no Brasil, que são infecções associadas ao procedimento assistencial ou à internação (CONCEIÇÃO-NETO et al., 2022a). Em 2017, a Organização Mundial da Saúde (OMS) definiu uma lista de patógenos prioritários para os quais deveriam ser desenvolvidos novos antimicrobianos, e dentre esta lista, as *Enterobacterales* resistentes aos carbapenêmicos e as cefalosporinas de terceira geração foram elencadas como prioridade 1 ou crítica (WHO, 2017a).

Atualmente, a disseminação da resistência bacteriana aos antimicrobianos é considerada uma das preocupações de saúde pública global mais urgentes (WHO, 2022). O grande problema desse fenômeno, que atinge a todos os hospitais mundialmente, é a falha terapêutica de medicamentos, dificultando o tratamento de infecções bacterianas e aumentando a morbidade e mortalidade associadas a essas infecções (WHO, 2017b). Segundo a OMS, cerca de 700 mil pessoas morrem anualmente em todo o mundo, devido a infecções por microrganismos resistentes, caso medidas não forem tomadas, estima-se que até 2050, a resistência bacteriana poderá estar associada a 10 milhões de mortes anuais (WHO, 2019a). Doenças comuns, como infecções respiratórias e urinárias podem se tornar intratáveis com os medicamentos disponíveis atualmente (IOC, 2019). Com o surgimento da pandemia de COVID-19, a resistência antimicrobiana continua avançando, impulsionada pelo aumento do uso de antibióticos no tratamento de pacientes com COVID-19. À medida que essa resistência se agrava devido à pandemia, é mais urgente do que nunca priorizar esforços para contê-la (PAHO, 2021).

Por isso é importante a investigação e monitoramento sobre uma possível co-resistência desses medicamentos, a fim de conhecer a dimensão da disseminação dessas resistências e poder realizar planejamentos de mitigação deste grave problema de saúde pública. O problema da resistência é tão preocupante, que em 2018 foi elaborado pelo Ministério da Saúde (MS), o Plano de Ação Nacional para Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos do Brasil (PAN-BR) a fim de implementar ações para combater a resistência antimicrobiana no Brasil, respeitando a abordagem sobre o conceito *One Health*, que requer o trabalho em conjunto dos setores da saúde humana, animal e ambiental (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

As bactérias, que apresentam naturalmente resistência aos antimicrobianos, estão cada vez mais eficientes no desenvolvimento de novos mecanismos de resistência a ação dos

antimicrobianos principalmente por causa do uso indiscriminado de antimicrobianos, e dentre eles, os medicamentos β -lactâmicos, que atualmente são um grupo de grande uso clínico, devido a sua alta eficácia e segurança nos tratamentos (NORDMANN, 2014; REDDY et al., 2020). Dentre os β -lactâmicos, os carbapenêmicos e as cefalosporinas de 3ª e 4ª gerações são considerados os antimicrobianos mais eficazes disponíveis no tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-negativas multirresistentes (BOU et al., 2014; ZHANG et al., 2020). O mecanismo mais comum de resistência a esses antimicrobianos é a produção de enzimas carbapenemases, que hidrolisam o anel β -lactâmico presente nos carbapenêmicos, e representam a maior ameaça ao uso destes antimicrobianos, devido a sua capacidade de inativação de quase todos os β -lactâmicos (REYGAERT, 2018). Como exemplo, pode-se citar a *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) (FLORES et al., 2020), New Delhi metalo- β -lactamases (NDM) (YAO et al., 2022) e oxacilinases (OXA) (RIVERA-IZQUIERDO et al., 2021). O aumento da prevalência das enzimas KPC e NDM em hospitais já foi relatado no Brasil (VIVAS et al., 2020; WINK et al., 2021a).

O aumento da prevalência de bactérias resistentes produtoras de β -Lactamase de espectro estendido (ESBL, sigla do inglês para “*extended-spectrum β -lactamase*”) levou ao aumento do uso de carbapenêmicos em todo o mundo para tratar infecções hospitalares graves e, conseqüentemente, o surgimento e propagação da resistência a estes medicamentos (LOGAN; WEINSTEIN, 2017; OTEO et al., 2014). Atualmente as opções para tratar infecções de bactérias resistentes aos carbapenêmicos são limitadas (ALIZADEH et al., 2018; SHEU et al., 2019). Na busca por alternativas de tratamento dessas infecções, tem sido utilizada na prática clínica combinações de β -lactâmicos com inibidores de β -lactamases, como a ceftazidima/avibactam (KHANNA; GERRIETS, 2022). Além disso, também foi retomado o uso das polimixinas, uma classe de antimicrobiano que foi descoberta em 1947 e que, a partir dos anos 1980, havia deixado de ser utilizado na prática clínica devido a alta nefrotoxicidade e neurotoxicidade (MACNAIR et al., 2018). Uma vantagem de sua utilização é que a maioria destas bactérias ainda é susceptível a esse antimicrobiano, se tornando uma opção para o tratamento dessas infecções, desde então, houve o aumento do seu uso em todo o mundo (DA SILVA et al., 2022). Porém, estudos no Brasil relatam um aumento anual preocupante na taxa de resistência as polimixina B entre isolados de bactérias resistentes aos carbapenêmicos, demonstrando uma estreita relação entre sua utilização e o aumento da resistência bacteriana a este antimicrobiano (BARTOLLETTI et al., 2016; CARDOSO et al., 2014). As enzimas carbapenemases são codificadas por genes frequentemente localizados em elementos genéticos móveis e os mecanismos que conferem resistências às polimixinas também podem estar

presentes nesses elementos móveis, sendo as *Enterobacterales* consideradas vetores importantes na disseminação desses genes em bactérias (NORDMANN, 2014).

A resistência antimicrobiana é um problema caracterizado por interações complexas, envolvendo populações microbianas diversas que afetam ao mesmo tempo a saúde de humanos, animais e do meio ambiente (MIŁOBEDZKA et al., 2022). Há algum tempo que o problema da resistência antimicrobiana não é mais restrito ao ambiente clínico, os ecossistemas naturais também foram reconhecidos como importantes reservatórios de bactérias e genes de resistência aos antimicrobianos (GRA) (ANYANWU; JAJA; NWABI, 2020a; TIEDJE et al., 2019). É conhecido que as Estações de Tratamento de Esgotos (ETEs) desempenham um papel importante na disseminação da resistência antimicrobiana no ambiente, devido a isso, cada vez mais, vem sendo estudada a presença de bactérias resistentes aos antimicrobianos (BRA) em efluentes de ETEs no Brasil (ABRANTES, 2022; CHAGAS et al., 2011b; CONTE et al., 2017; FRÓES et al., 2016; MACHADO et al., 2023; PICÃO et al., 2013b; ZAGUI et al., 2021). A rota da resistência antimicrobiana perpassa pela ETEs seja ela de efluentes hospitalar ou urbanos, através da geração de resíduos humanos e animais seguindo para o meio ambiente, retornando para o ser humano através de interação com ambientes aquáticos, contato com animais e alimentação, incluindo água potável (FIGUEIRA et al., 2012).

As ETEs recebem constantemente esgoto bruto contendo resíduos de antimicrobianos e a microbiota presente nos efluentes é exposta a esses resíduos, gerando assim uma pressão seletiva, abrindo espaço para um crescimento bacteriano mais resistente e promovendo condições favoráveis para a transferência horizontal de genes, permitindo a propagação de determinantes de resistência a antimicrobianos na comunidade bacteriana presente (AARESTRUP; WOOLHOUSE, 2020; AUGUET et al., 2017a). Os tratamentos convencionais das ETEs não são eficientes na desinfecção de bactérias resistentes em efluentes, já que após estes tratamentos, os microrganismos patogênicos podem permanecer nos efluentes tratados (ABRANTES, 2022; NOGUERA-OVIEDO; AGA, 2016; PANDIS et al., 2022; RIZZO et al., 2013a). Sendo assim, as ETEs são consideradas como reservatórios e podem servir como um “celeiro” de troca de GRA e potencializar o desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos, assim como sua disseminação para o ambiente (AUGUET et al., 2017a; MICHAEL et al., 2013; TUROLLA et al., 2018a). Devido a isso, este tema tem sido abordado através da perspectiva *One Health*, e vários países e agências internacionais incluíram essa abordagem em seus planos de ação contra a resistência antimicrobiana medidas de vigilância e prevenção, como o monitoramento da resistência nos ambientes naturais (COLLIGNON; MCEWEN, 2019; MCEWEN; COLLIGNON, 2018), além da conscientização da necessidade

da implementação de tecnologias avançadas de desinfecção, a fim de melhorar a qualidade dos efluentes tratados, e interromper o ciclo de disseminação da resistência bacteriana pelo meio ambiente (BIANCULLO et al., 2019).

Os Processos Oxidativos Avançados (POAs) são tecnologias eficientes de tratamento de água e efluentes, pois são considerados de baixo custo e não seletivos (DENG; ZHAO, 2015). Os POAs podem ser uma abordagem promissora para degradação de micropoluentes e inativação de patógenos, pela ação de espécies oxidantes (compostos químicos que têm a capacidade de oxidar outras substâncias geradas no processo que leva à formação de produtos intermediários ou a completa mineralização, com formação de dióxido de carbono (CO₂) e água (JIMÉNEZ-TOTOTZINTLE et al., 2018; MENDES SAGGIORO et al., 2011; SHARMA et al., 2019; UMAR; RODDICK; FAN, 2019). Estudos demonstraram a eficiência da utilização de POAs na remoção de bactérias resistentes aos antimicrobianos em efluentes tratados (AHMED et al., 2021a; JIMÉNEZ-TOTOTZINTLE et al., 2018; TUROLLA et al., 2018a). Diversos tipos de POAs podem ser combinados e utilizados para aumentar a eficiência na desinfecção de efluentes, e a utilização de minerais de ferro, como a hematita e a ilmenita, têm sido utilizados como catalisadores e fonte de íons de ferro nesses processos (GARCÍA-MUÑOZ et al., 2017b; LAI et al., 2021; RUALES-LONFAT et al., 2015). Porém, a utilização de minerais de ferro para desinfecção ainda está em fase de pesquisa e desenvolvimento, e mais estudos são necessários para avaliar a eficiência e a viabilidade econômica desse método em larga escala. Alguns estudos reportaram a eficiência da utilização de minérios de ferro como catalisadores em POAs na inativação de bactérias (ALATON et al., 2019; GIANNAKIS et al., 2016b; RUALES-LONFAT et al., 2015).

Nesse contexto, o presente estudo tem como objetivos isolar e identificar *Enterobacteriales* resistentes aos carbapenêmicos e/ou polimixinas, assim como seus determinantes genéticos de resistência, presentes nos efluentes bruto e tratado de três ETEs, localizadas no município do Rio de Janeiro. A primeira ETE é uma estação municipal, a segunda ETE é considerada uma ETE mista, que recebe efluentes domésticos e de um complexo de laboratórios e a terceira ETE é hospitalar. Além disso, foi realizada a avaliação da eficiência de processos oxidativos avançados utilizando resíduos de mineração na remoção de *Klebsiella pneumoniae* multirresistente e seu gene de resistência *bla*_{KPC} em diferentes matrizes aquosas. Desta maneira, verifica-se a contribuição das estações de tratamento na disseminação de resistência bacteriana, assim como testar a eficiência de processos oxidativos avançados na redução de BRA e de GRA nos efluentes tratados.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Caracterizar *Enterobacteriales* resistentes a carbapenêmicos e/ou polimixinas em estações de tratamento de esgoto, bem como avaliar sua remoção e do gene *bla_{KPC}* por processo foto-Fenton heterogêneo mediado por resíduo de mineração.

2.2 ESPECÍFICOS

- Caracterizar os efluentes bruto e tratado coletados de três estações de tratamento de esgotos, por meio de parâmetros físico-químicos e microbiológicos;
- Identificar bactérias da ordem *Enterobacteriales* isoladas a partir dos efluentes coletados;
- Determinar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados;
- Avaliar a presença de atividade de carbapenemases entre os isolados;
- Pesquisar os principais determinantes genéticos de resistência nos isolados resistentes aos carbapenêmicos e polimixinas;
- Estabelecer as relações clonais de *Klebsiella pneumoniae* isoladas dos efluentes;
- Avaliar a eficiência do processo foto-Fenton heterogêneo na remoção de *Klebsiella pneumoniae* multidroga resistente, bem como, do gene *bla_{KPC}*.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 A IMPORTÂNCIA DO SANEAMENTO NA SAÚDE HUMANA E AMBIENTAL

Nos últimos anos, os estudos sobre saneamento, saúde humana e ambiental estão cada vez mais interligados. A compreensão da relação entre essas áreas é de extrema importância para uma efetiva extensão dos necessários serviços de saneamento para toda a população, eliminação da discriminação atualmente observada e assim, priorizar os impactos positivos para a saúde pública e sobre o meio ambiente. Porém, sua plena compreensão ainda apresenta lacunas que constituem obstáculos para o avanço desses serviços no país (SILVA et al., 2018).

Na Conferência de Ottawa, em 1986, a OMS propôs o conceito de Promoção de Saúde, que até hoje é visto como o princípio orientador das ações de saúde em todo o mundo. A promoção da saúde tem como propósito ações de prevenção e assistência, atuando sobre os determinantes da saúde (WHO, 2005). Desta maneira, considera-se que as condições ambientais são um dos fatores mais importantes nos determinantes da saúde (ROLIM TAVARES et al., 2019).

No Brasil, o saneamento básico é assegurado pela Lei nº 11.445/2007 (Lei Federal do Saneamento Básico) e garante como direito universal o conjunto de serviços tratados como essenciais: infraestrutura e instalações operacionais de abastecimento de água, de coleta de esgotamento sanitário, limpeza urbana, drenagem urbana e manejos de resíduos sólidos. (ROLIM TAVARES et al., 2019). O tratamento de esgoto no Brasil atinge, em parte, aos objetivos de países desenvolvidos determinados antes da década de 1970, focados apenas na remoção de matéria orgânica, restando ainda um déficit na remoção de organismos patogênicos (CHERNICHARO et al., 2018). O país ainda apresenta um déficit sanitário, gerando baixa qualidade de vida a grande parte da população brasileira. Cerca de 45,9% da população brasileira não dispõe da cobertura de rede coletora de esgoto e mais agravante ainda é que do esgoto coletado apenas 78,5% são tratados (SNIS, 2019). Desta maneira, estima-se que mais de 50% do esgoto gerado no Brasil é lançado *in natura* diretamente na natureza sem nenhum tipo de tratamento prévio. A maior parte das ETEs do país ainda apresentam diversos problemas relacionados à concepção e projeto, estrutural e operacional, comprometendo assim sua eficiência no tratamento.

Atualmente, a relação entre saneamento, saúde e ambiente é amplamente abordada através da perspectiva *One Health*, e vem sendo utilizada como estratégia de resolução dos desafios globais de saúde. Apresentado formalmente pela *One Health Commission* em 2007, o conceito é definido como “o esforço colaborativo de várias áreas, agindo localmente,

nacionalmente e globalmente, para atingir a saúde ideal para pessoas, animais e meio ambiente” (ONEHEALTH COMMISSION, 2018). A abordagem *One Health* é uma estrutura estratégica para reduzir o risco da disseminação de doenças infecciosas na interface homem-ambiente-animal, e foi oficialmente adotada por organizações internacionais em 2008 (WHO; UNICEF, 2008). Diante deste cenário de desigualdade dos serviços de saneamento prestados, fica claro, através da perspectiva *One Health*, a necessidade da ação coletiva de profissionais de diversas áreas, o envolvimento da sociedade civil, de instituições governamentais e a participação de políticos comprometidos com as políticas públicas voltadas para a implementação ações de saneamento seguro, que devem ser adotadas em locais desprovidos ou não de redes de esgotamento sanitário, que apresentem como foco principal a promoção da saúde para a população, de forma a minimizar os riscos associados a saúde humana, animal e ambiental (RYU et al., 2017). Uma das consequências de condições sanitárias precárias, que continuam a representar um papel significativo no quadro de morbimortalidade da população, são as Doenças Relacionadas ao Saneamento Inadequado (DRSAI), ocasionadas principalmente por agentes gastroentéricos como as bactérias da ordem *Enterobacterales* (WHO, 2020).

3.2 ORDEM *Enterobacterales*

A ordem *Enterobacterales* é a maior e mais heterogênea ordem de importância médica. Esta ordem consiste em sete famílias: *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae*, *Pectobacteriaceae*, *Yersiniaceae*, *Hafniaceae*, *Morganellaceae* e *Budviciaceae* (NCBI et al., 2020). Podem ser encontradas em diversos tipos de ambientes: no solo, na água, em plantas e fazem parte da microbiota de humanos e animais de sangue quente. Membros desta ordem são bactérias da microbiota intestinal saudável e também bactérias patogênicas (ROCK; DONNENBERG, 2014).

Os componentes deste grupo são bacilos Gram-negativos, apresentando de 1 a 5 µm de comprimento, maioria anaeróbios facultativos, e geralmente móveis. De modo geral, bioquimicamente a família é oxidase negativa, catalase positiva, fermentadores de glicose com ou sem produção de gás e reduzem nitrato a nitrito. Apresentam ótimo crescimento a uma temperatura de 37°C, e crescem em meios básicos, como caldo peptona, meios ricos, como ágar sangue e meios seletivos como MacConkey e Ágar EMB (*Eosin Methylene Blue*) (JANDA; ABBOTT, 2021).

Muitas *Enterobacterales* são consideradas patógenos oportunistas e causam infecções que podem ocorrer tanto na comunidade, quanto em ambientes de assistência à saúde, sendo os

patógenos mais frequentes em IRAS, que são qualquer infecção adquirida pelo paciente durante a prestação de algum serviço de saúde, incluindo diarreia, infecção das vias urinárias, respiratórias, da corrente sanguínea e meningite (ALVIM; COUTO; GAZZINELLI, 2019). Essas infecções comprometem principalmente os pacientes imunodeprimidos ou debilitados que são altamente suscetíveis a infecções hospitalares, seja por colonização de cepas ambientais ou procedimentos como o cateterismo, broncoscopia ou biopsias cirúrgicas (CDC, 2017). Representam um grave problema de saúde pública mundial, pois acarretam o prolongamento do tempo de internação, a elevação dos custos assistenciais e o aumento da morbimortalidade nos serviços de saúde (CDC, 2020).

Os principais gêneros, que são 99% dos isolamentos de *Enterobacterales* de importância clínica, são: *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Providencia* spp., *Morganella* spp., *Citrobacter* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp. e *Serratia* spp. As *Enterobacterales* que atualmente predominam nas IRAS são *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp. (ALVIM; COUTO; GAZZINELLI, 2019; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017). No Brasil, dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), do ano de 2019, apresentam a *Klebsiella pneumoniae* como o microrganismo com maior quantidade de isolados, e com o segundo maior percentual de resistência microbiana para Infecção Primária de Corrente Sanguínea (IPCS), tanto na UTI adulta, quanto na UTI neonatal (ANVISA, 2021).

Os membros da ordem *Enterobacterales* estão se tornando cada vez mais resistentes aos antimicrobianos, e tem sido um problema crescente nas últimas décadas. Alguns membros, como as bactérias *K. pneumoniae* e *E. coli* são particularmente preocupantes, pois apresentam uma grande capacidade de desenvolver resistência a múltiplos antimicrobianos usados para tratar infecções graves e disseminar essa resistência para bactérias sensíveis (ALEIDAN et al., 2020). A resistência a antimicrobianos, como os β -lactâmicos e as polimixinas, entre as *Enterobacterales*, tem agravado a capacidade de tratar infecções bacterianas, aumentando a morbidade e a mortalidade associadas. A combinação de resistência a β -lactâmicos e polimixinas é especialmente preocupante, pois isso limita ainda mais as opções de tratamento eficaz para infecções graves causadas por esses microrganismos. A resistência a esses antimicrobianos representa um desafio clínico e de saúde pública significativo, exigindo esforços coordenados em nível global para conter sua disseminação e garantir que opções de tratamento eficazes estejam disponíveis para infecções bacterianas. (TILAHUN et al., 2021).

3.3 RESISTÊNCIA BACTERIANA AOS β -LACTÂMICOS E POLIMIXINAS

Em 1928, o médico microbiologista escocês Alexander Fleming observou acidentalmente que a presença do fungo *Penicillium notatum* estava inibindo o crescimento de *Staphylococcus aureus*, em colônias esquecidas em seu laboratório. Assim, isolou e purificou a molécula que foi denominada penicilina (MONTES, 2009). No entanto, sua introdução como agente terapêutico ocorreu apenas em 1940, através de estudos dos cientistas americanos Howard Florey e Ernst Chain (DURAND; RAOULT; DUBOURG, 2019). A introdução da penicilina na prática clínica, revolucionou a medicina, e foi muito importante para a saúde pública, pois aumentou a expectativa de vida da humanidade, principalmente no controle de doenças infecciosas bacterianas. A partir da industrialização da penicilina, principalmente em consequência da Segunda Guerra Mundial, foi observado um rápido crescimento no desenvolvimento de novos antimicrobianos. Desde então, estes medicamentos são utilizados em larga escala tanto na saúde humana, quanto no setor animal (GUIMARÃES; DA SILVA MOMESSO; PUPO, 2010).

Devido à alta eficácia dos antimicrobianos no controle de vários microrganismos, o número de prescrições é elevado e o uso indiscriminado dos antimicrobianos por instituições de saúde humana e animal, pela população e em práticas agropecuárias acontece em todo o mundo (ROBERTS; ZEMBOWER, 2021; WHO, 2019b). Muitos médicos ainda prescrevem os antimicrobianos sem critério, e fazem a troca destes medicamentos no tratamento desnecessariamente. Além disso, muitas vezes pacientes em domicílio fazem o mal uso destes medicamentos. Em 2019 foi realizada uma estimativa longitudinal de consumo humano de antimicrobianos para 204 países, e alertou que do ano 2000 a 2018 houve um aumento de 46% desse consumo (BROWNE et al., 2021). O desenvolvimento cada vez mais rápido da resistência antimicrobiana representa uma ameaça para a saúde pública global, pois está crescendo para níveis elevados em todo o mundo, principalmente resistência aos antimicrobianos considerados de último recurso na prática clínica (ASLAM et al., 2018; MURRAY et al., 2022).

Os microrganismos que causam as infecções mais recorrentes e preocupantes estão apresentando resistência aos medicamentos comumente utilizados na prática clínica. Novos mecanismos de resistência estão surgindo e se espalhando globalmente, diminuindo cada vez mais as opções de tratamento de doenças infecciosas (WHO, 2017b). Apesar de existir numerosos agentes antimicrobianos, há relatos recentes de resistência a todos eles, e essa resistência ocorre logo após um novo medicamento ser aprovado para uso (WHO, 2014). A limitação do tratamento com antimicrobianos aumenta cada vez mais a necessidade do

desenvolvimento de novos medicamentos modernos e complexos, e a velocidade do surgimento destes medicamentos é inferior à velocidade de seleção e disseminação da resistência bacteriana (CARDOSO et al., 2014).

O desenvolvimento de resistência bacteriana aos antimicrobianos é um fenômeno de evolução natural, porém ela foi intensificada devido ao uso excessivo de antimicrobianos, causando impactos na saúde pública e ambiental (REYGAERT, 2018; TADEUSZ; KONIECZNY; ALICJA, BARANOWSKA ZBIGNIEW, 2019). As bactérias passam por mutações e tornam-se resistentes aos medicamentos utilizados para tratar as infecções. A resistência bacteriana é inevitável, pois da utilização de antimicrobianos, sempre haverá bactérias que se tornarão resistentes a ele, porém, a utilização correta destes medicamentos pode gerar um menor índice dessa resistência. O uso indevido desses medicamentos acelera este fenômeno, havendo uma correlação muito evidente entre um maior consumo de antimicrobianos e níveis mais elevados de resistência microbiana (WHO, 2018a).

As bactérias podem manifestar resistência aos antimicrobianos através de vários mecanismos. Os mecanismos de resistência mais comuns das bactérias Gram-negativas podem ser classificados de acordo com a forma de inativação do medicamento: (i) alteração na conformação do sítio alvo da bactéria, (ii) redução da permeabilidade da membrana externa, (iii) superexpressão dos sistemas de bomba de efluxo ativo, (iv) bloqueio ou proteção do sítio alvo do medicamento e (v) produção de enzimas modificadoras ou degenerativas dos antimicrobianos (LIMA et al., 2020; TENOVER, 2006; TOOKE et al., 2019a). As bactérias Gram-negativas são capazes de utilizar todos os principais mecanismos de resistência (REYGAERT, 2018).

A resistência bacteriana a antimicrobianos pode ser conferida por mutações cromossômicas, que desenvolvem genes de resistência responsáveis pela modificação do alvo, e essas mutações podem ser espontâneas ou induzidas (MUNITA; ARIAS, 2016). As causas comuns de mutações genéticas, como substituições ou deleções, podem ser a movimentação do material genético por sequências de inserção e integrons, fatores estressantes como escassez de nutrientes, exposição à radiação UV e produtos químicos, entre outros (REYGAERT, 2018).

As mutações que conferem resistência ocorrem em apenas alguns tipos de genes: aqueles que codificam alvos de drogas, aqueles que codificam transportadores de drogas, aqueles que codificam reguladores que controlam transportadores de drogas e aqueles que codificam enzimas modificadoras de antimicrobianos (MARTINEZ, 2014). A resistência pelos genes que codificam enzimas hidrolíticas e aqueles que codificam alvos de drogas são preocupantes, pois são consideradas os principais mecanismos de resistência a antimicrobianos

de último recurso clínico, como os β -lactâmicos e as polimixinas (ETEBU; ARIKEKPAR, 2016; KAPOOR; SAIGAL; ELONGAVAN, 2017; PEACH et al., 2013).

Os β -lactâmicos são uma das classes de antimicrobianos mais comumente prescritos, com inúmeras indicações clínicas (PAGE, 2020). Os medicamentos dessa classe apresentam em sua estrutura química um anel β -lactâmico, responsável pela sua ação antibacteriana, que contém três carbonos e um nitrogênio altamente reativo. São antimicrobianos que apresentam um amplo espectro de ação contra as bactérias, eficácia clínica em infecções graves e um ótimo perfil de segurança, uma vez que atuam em uma enzima presente somente em bactérias (GUIMARÃES; DA SILVA MOMESSO; PUPO, 2010). Estes fármacos são classificados como tempo-dependentes, em que sua eficácia aumenta conforme maior o tempo de exposição, acima da sua concentração inibitória mínima (ANVISA, 2007). Os integrantes mais representativos dessa classe são as penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos (ETEBU; ARIKEKPAR, 2016).

No ano de 2016, a OMS decretou um alerta mundial, na qual todos os países deveriam se mobilizar e realizar ações contra os efeitos da resistência aos antimicrobianos (WHO, 2018a). Em 2017, alertou que cerca de 700 mil pessoas morrem todos os anos de infecções por bactérias resistentes, em que os tratamentos atualmente disponíveis não funcionam (WHO, 2017b), além de definir uma lista de patógenos prioritários, para os quais deveriam ser desenvolvidos novos antimicrobianos e dentre esta lista, estão as bactérias da ordem *Enterobacterales* resistentes a antimicrobianos de última escolha clínica, como aos carbapenêmicos (WHO, 2017a). Em 2019, um estudo revelou que, na população europeia, entre os anos de 2009 e 2013, 40% das infecções hospitalares foram causadas por bactérias resistentes aos carbapenêmicos (β -lactâmicos) e às polimixinas (CASSINI et al., 2019). Esse aumento é alarmante, pois quando esses medicamentos não são mais eficazes, o tratamento hospitalar de infecções graves é dificultado (OECD, 2019). Desta maneira, é cada vez mais importante estudos sobre a disseminação da resistência a esses antimicrobianos.

3.3.1 β -lactâmicos

O mecanismo mais comum de resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos, adquirido por bactérias Gram-negativas clinicamente importantes, é a capacidade de produção de enzimas modificadoras ou degradativas, denominadas β -lactamases (ARISTIZÁBAL-HOYOS et al., 2019; KONG; SCHNEPER; MATHEE, 2010; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ; GONZÁLEZ-LÓPEZ, 2014). As β -lactamases foram identificadas pela primeira vez em cepas de *Staphylococcus aureus* no final da década de 1940, poucos anos após a introdução da penicilina

G na prática clínica, e se tornaram clinicamente importantes, pois comprometeram rapidamente a eficácia deste medicamento (LIMA et al., 2020; TOOKE et al., 2019a).

Atualmente, os carbapenêmicos são um grupo de antimicrobianos β -lactâmicos que cumprem um papel muito importante na luta contra as infecções bacterianas, pois embora compartilhem características gerais dos β -lactâmicos, são considerados como o grupo mais potente e com o mais amplo espectro de atividade antimicrobiana e devido a isso, são frequentemente prescritos na prática clínica (ALIZADEH et al., 2018; ARRUDA et al., 2019; ETEBU; ARIKEKPAR, 2016; VARDANYAN; HRUBY, 2016). Por serem o grupo de amplo espectro de atividade e maior potência contra Gram-positivos e Gram-negativos, são conhecidos por serem medicamentos de último recurso, pois são administrados quando pacientes internados apresentam infecções graves e em casos de infecções complicadas após falhas de tratamentos iniciais com outros antimicrobianos (ETEBU; ARIKEKPAR, 2016; VARDANYAN; HRUBY, 2016).

O uso indiscriminado dos carbapenêmicos nos últimos anos provocou o aumento de patógenos bacterianos resistentes a esses medicamentos, que desenvolveram enzimas que hidrolisam a maioria dos β -lactâmicos, as carbapenemases. As bactérias produtoras de carbapenemases têm alta capacidade de disseminação, devido a várias características que as tornam resistentes a múltiplos antibióticos e facilmente transferíveis entre diferentes espécies bacterianas, aumentando assim a população bacteriana resistente a esses antimicrobianos (ARRUDA et al., 2019; ETEBU; ARIKEKPAR, 2016).

As β -lactamases constituem um grande grupo heterogêneo de enzimas, sendo descritos mais de 7 mil enzimas (NAAS et al., 2021), por isso podem ser subdivididas em várias classes. A classificação de Ambler divide as β -lactamases em quatro classes moleculares (A, B, C e D), com base nas suas informações estruturais disponíveis, de acordo à similaridade das sequências primárias que constituem as moléculas de proteína e também por diferenças fundamentais no mecanismo hidrolítico (SAWA; KOOGUCHI; MORIYAMA, 2020; TOOKE et al., 2019a).

As classes A, C e D formam o grupo das serino- β -lactamases (S β Ls), pois empregam o aminoácido serina como centro ativo. As enzimas deste grupo agem por ataque nucleofílico, e hidrolisam a ligação amida do anel β -lactâmico, para formar um intermediário acil-enzima, ocorrendo desacilação. As diferenças entre os mecanismos catalíticos das S β Ls são em torno do tipo de resíduos básicos gerais usados nas etapas de acilação-desacilação (LIMA et al., 2020; TOOKE et al., 2019a).

As enzimas da classe A de Ambler compreendem as β -lactamases mais amplamente distribuídas e estudadas, que são capazes de degradar penicilinas, cefalosporinas de 1^a e 2^a

gerações e carbapenêmicos (LIMA et al., 2020; TOOKE et al., 2019a). Estas enzimas são produzidas pela maioria dos bacilos Gram-negativos e podem ser mediadas por genes cromossômicos (resistência intrínseca) e genes mutados, como por genes plasmidiais (resistência adquirida), sendo amplamente disseminadas. Geralmente são enzimas inibidas *in vitro* pelas associações de β -lactâmicos com inibidores clássicos de β -lactamases (ANDRADE; DARINI, 2017). As principais famílias de enzimas da classe A incluem TEM (Temoneira, nome da primeira paciente de isolamento), GES (espectro estendido da Guiana β -lactamase); SME (enzima *Serratia marcescens*); SHV (β -lactamase variante sulfidrílica), CTX-M (cefotaximase) e KPC (*K. pneumoniae* carbapenemase) (TOOKE et al., 2019a).

A enzima do tipo KPC é codificada por alelos do gene *bla*_{KPC}, transmitida através de plasmídeo e é o exemplo mais representativo de uma carbapenemase classe A desempenha um papel importante no controle das características das bactérias *Enterobacteriaceae* resistentes aos carbapenêmicos (SAWA; KOOGUCHI; MORIYAMA, 2020). A primeira detecção da KPC foi proveniente de um isolado clínico de *K. pneumoniae* e o potencial de hidrólise era de carbapenemase, assim foi denominada como *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, e originou a sigla KPC. Sua atividade foi associada a um plasmídeo não conjugativo, o qual codificava a KPC-1 (YIGIT et al., 2001). Posteriormente, a KPC foi detectada em diversos gêneros de bacilos Gram-negativos, incluindo *Enterobacter* spp., *Escherichia coli* e *Serratia marcescens*, não sendo exclusiva de *K. pneumoniae*. Também foram descobertas outras variantes da KPC-1, como as KPC-2 e KPC-3, que desde então se espalharam em pontos de acesso endêmicos como nos Estados Unidos, Grécia, Israel, China e América Latina (MUNOZ-PRICE et al., 2013).

As enzimas KPC têm o potencial para hidrolisar todos os β -lactâmicos, são pouco inibidas pelos inibidores clássicos, além de serem as serino-carbapenemases mais detectadas no mundo, sendo grande problema em infecções hospitalares, pois são associadas a grandes surtos de infecções por Gram-negativas multirresistentes em hospitais de grandes metrópoles do mundo todo (BUSH; JACOBY, 2010). No Brasil, as primeiras KPCs foram detectadas em 2006, no Recife, e em 2009 no Rio de Janeiro (MONTEIRO et al., 2009; PEIRANO et al., 2009). Logo após, foi relatada em várias localidades do país, principalmente nas UTIs nos hospitais (ANTOCHEVIS et al., 2018; BIBERG et al., 2015; SEIBERT et al., 2014; SOUSA; RAMALHO; CAMARGO, 2020; VIEGAS; SOARES, 2018).

A classe B forma o grupo das metalo- β -lactamases (M β Ls), que são β -lactamases de amplo espectro de ação, como as carbapenemases. O mecanismo de hidrólise destas enzimas requer a participação de metais no sítio ativo (um ou dois íons de Zn²⁺) para ativar uma molécula

de água do sítio ativo para a hidrólise de abertura do anel β -lactâmico (LIMA et al., 2020; PALZKILL, 2013). O espectro de atividade destas enzimas é excepcionalmente amplo, pois tem potencial para hidrolisar todos os β -lactâmicos, embora apresentem pouca ou nenhuma atividade contra os monobactâmicos (BUSH; JACOBY, 2010; PALZKILL, 2013; TOOKE et al., 2019a). Inicialmente, as M β LS foram identificadas como enzimas cromossômicas, em bacilos Gram-positivos ou Gram-negativos, e depois passaram a ser identificadas em elementos transferíveis, como transposons e plasmídeos, se tornando mais versáteis e sujeitas a pressões evolutivas em uma variedade de hospedeiros, resultando em enzimas com várias dezenas de variantes (BUSH; JACOBY, 2010; SAWA; KOOGUCHI; MORIYAMA, 2020).

As principais famílias de M β LS adquiridas são as enzimas IMP (imipenemase) e VIM (verona imipenemase), isoladas pela primeira vez na década de 1990, são encontradas principalmente em bacilos Gram-negativos não fermentadores, mas também em *Enterobacteriaceae*. Atualmente novas variantes de IMP e VIM são constantemente identificadas e com diferentes prevalências em vários países no mundo (ANDRADE; DARINI, 2017; BUSH; JACOBY, 2010). Estas enzimas são incluídas, principalmente, na estrutura de integrons e são integradas em cromossomo e plasmídeo, em associação com o transposon (LARAKI et al., 1999; LAURETTI et al., 1999). Em 2009, foi relatada pela primeira vez em Nova Deli, Índia, a enzima NDM (New Delhi metalo- β -lactamase) em um isolado de *K. pneumoniae* (YONG et al., 2009), em seguida houve uma rápida disseminação global, incluindo o Brasil, com crescente detecção do gene *bla*_{NDM}, principalmente em enterobactérias e bacilos Gram-negativos não fermentadores causando infecções hospitalares e também na comunidade, sendo assim considerada a principal M β L adquirida (ANDRADE; DARINI, 2017). Devido a disseminação de *bla*_{NDM-1} em uma variedade de suportes genéticos, se tornou um gene epidêmico e reconhecido como um dos principais contribuintes para a falha dos carbapenêmicos em *Enterobacterales* resistentes.

As enzimas da classe D são conhecidas como OXA (oxacilinasas). As enzimas OXA-10 e suas variantes OXA-11 e OXA-15 são reconhecidas como cefalosporinasas de espectro estendido (oximino- β -lactamases), enquanto OXA-23 e OXA-48 são reconhecidas como carbapenemases, sendo a OXA-48 mais epidemiologicamente relacionada com as *Enterobacterales*. As OXAs carbapenemases têm sido detectadas em diversas partes do mundo (ANDRADE; DARINI, 2017; BUSH; JACOBY, 2010). Recentemente, as enzimas OXA se tornaram importantes clinicamente, pois embora muitos exemplares detectados tenham origem cromossômica, também há sua disseminação por plasmídeos em *Enterobacterales*, principalmente por *K. pneumoniae*, pelas enzimas do grupo OXA-48, que representam um

desafio crescente para a comunidade científica devido ao seu envolvimento cada vez mais comum na falha de carbapenêmicos (SAWA; KOOGUCHI; MORIYAMA, 2020; TOOKE et al., 2019b).

O aumento no uso de β -lactâmicos, inclusive os carbapenêmicos, resultou na disseminação generalizada de carbapenemases entre bactérias patogênicas de relevância clínica em todo o globo. Isso tem levado à necessidade de buscar alternativas terapêuticas. (CARDOSO et al., 2014; ECHEVERRI TORO; ATEHORTÚA MUÑOZ; ROBLEDO RESTREPO, 2009). Assim, foi necessária a retomada do uso de um grupo de antimicrobianos que tinha sido deixado de ser utilizado, as polimixinas (VELKOV et al., 2014).

3.3.2 Polimixinas

As polimixinas são peptídeos catiônicos que formam um grupo de antimicrobianos de amplo espectro contra bactérias Gram-negativas. As polimixinas são consideradas como anfipáticos conferindo, assim, uma propriedade de ampla distribuição em ambientes aquosos ou não aquosos, o que resulta em boa solubilidade em água ou sangue, e em membranas lipídicas procarióticas e eucarióticas (YU et al., 2015). Os efeitos adversos mais importantes destas drogas são neurotoxicidade e nefrotoxicidade (MENDES; BURDMANN, 2009). No entanto, das duas polimixinas sistematicamente ativas, a polimixina B é a mais utilizada, pois exibe menos variabilidade farmacocinética devido ao fato de ser administrada por via intravenosa em sua forma ativa, além de ser menos neurotóxica que a colistina (AVEDISSIAN et al., 2019). Além disso, em termos de potência *in vitro*, o sulfato de polimixina B é mais potente, comparado com o sulfato de colistina (YU et al., 2015).

Foram descritas inicialmente sendo sintetizadas por cepas de *Paenibacillus polymyxa*, e foram aprovadas para uso clínico na década de 1950 (DA SILVA et al., 2022). Constituem um grupo de cinco substâncias intimamente relacionadas, porém somente as polimixinas B e E são utilizadas clinicamente, em virtude da grande toxicidade das demais. A polimixina E é comumente chamada de colistina. Estes medicamentos apresentam efeito bactericida rápido e dependente de concentração (MENDES; BURDMANN, 2009). Na década de 1970, o uso clínico das polimixinas foi reduzido, em virtude de ser um composto nefrotóxico e pelo desenvolvimento de outros agentes antimicrobianos mais ativos e menos tóxicos (BERGEN et al., 2012). Na década de 1990, à medida que bactérias multirresistentes entre patógenos Gram-negativos, inclusive em relação a β -lactâmicos, aminoglicosídeos e quinolonas, aumentavam em prevalência e resultavam em infecções hospitalares, especialmente em unidades de terapia intensiva, as polimixinas foram reintroduzidas para uso clínico como antimicrobianos de último

recurso (AVEDISSIAN et al., 2019; POIREL; JAYOL; NORDMANNA, 2017; VELKOV et al., 2013, 2014). Atualmente, considerando a escassez de novos antimicrobianos eficientes, as polimixinas acabaram por se tornar uma das opções contra organismos multirresistentes, principalmente *Enterobacteriales* resistentes aos carbapenêmicos (MOHAPATRA; DWIBEDY; PADHY, 2021; POIREL; JAYOL; NORDMANNA, 2017).

Os relatos de bactérias apresentando resistência às polimixinas são crescentes, principalmente em *K. pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Salmonella* spp. e *Shigella* spp., todavia, algumas bactérias Gram-negativas apresentam resistência intrínseca às polimixinas, incluindo *Proteus* spp., *Providencia* spp., *Morganella morganii* e *Serratia marcescens* (POIREL; JAYOL; NORDMANNA, 2017; ZAVASCKI et al., 2007).

Os mecanismos de resistência às polimixinas em Gram-negativas podem ser mediados por mutações nos cromossomos, que geram modificações no lipídeo A, que é o centro imunorreativo da molécula de lipopolissacarídeo (LPS) e a região que atrai a polimixina, reduzindo sua carga negativa e interrompendo ou reduzindo a interação inicial entre o medicamento e o LPS bacteriano (DORTET et al., 2016; ZAVASCKI et al., 2007). Além desses mecanismos cromossômicos, também há descritos mecanismos plasmidiais (POIREL; JAYOL; NORDMANNA, 2017).

Em 2016, na China, foi relatado o primeiro mecanismo responsável pela resistência às polimixinas mediado por plasmídeos, codificado pelo gene *mcr-1* (*mobile colistin resistance*) (LIU et al., 2016). Este gene foi encontrado em isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* recuperados de amostras de carne crua, animais e isolados clínicos entre 2011 e 2014. O gene *mcr-1* codifica a proteína fosfoetanolamina transferase que promove a adição de fosfoetanolamina ao lipídeo A, gerando um LPS mais catiônico e resultando na redução da afinidade do LPS às polimixinas. No geral, a expressão do *mcr-1* em *E. coli* aumenta de 4 a 8 vezes nas concentrações inibitórias mínimas (CIMs) às polimixinas (POIREL; JAYOL; NORDMANNA, 2017). Após o estudo inicial, vários relatórios indicaram que o gene *mcr-1* se disseminou silenciosamente em todo o mundo desde 1980 (LING et al., 2020; POIREL; JAYOL; NORDMANNA, 2017; SHEN et al., 2016; SKOV; MONNET, 2016). Desde então, este gene foi relatado em vários gêneros de *Enterobacteriales*, como *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Cronobacter*, *Salmonella*, *Shigella* e *Kluyvera* isolados do ambiente, vegetais, alimentos à base de carne, animais e seres humanos (POIREL; JAYOL; NORDMANNA, 2017).

A descoberta desse gene de resistência gerou grande preocupação na comunidade científica, devido a possibilidade de transferência horizontal deste gene e pelos achados entre diversas espécies bacterianas, tanto no ambiente hospitalar, na comunidade e no meio ambiente. Ainda foi evidenciado que alguns plasmídeos contendo o gene *mcr-1* podem carrear outros GRA clinicamente importantes. Uma grande preocupação foi a descrição deste gene em plasmídeos carreando juntamente os genes *bla_{NDM}*, *bla_{OXA}*, *bla_{KPC}* e *bla_{VIM}* em enterobactérias multirresistentes (DU et al., 2016; GIAMARELLOU, 2016; POIREL et al., 2016; POIREL; JAYOL; NORDMANNA, 2017; YAO et al., 2016).

Após a detecção do primeiro gene *mcr*, foram descritos mais nove diferentes grupos de genes *mcr* (2-10) (LING et al., 2020). Os genes *mcr-1*, *mcr-2* e *mcr-6* foram inicialmente encontrados em *Moraxella* spp. (ABUOUN et al., 2017; XAVIER et al., 2016). O gene *mcr-3* foi descrito inicialmente em *Aeromonas* spp. (YIN et al., 2017), *mcr-4* na *Shewanella* spp. (CARATTOLI et al., 2017), *mcr-5* e *mcr-9* em *Salmonella enterica* (BOROWIAK et al., 2017; CARROLL et al., 2019), *mcr-7* e *mcr-8* em *K. pneumoniae* (WANG et al., 2018b; YANG et al., 2018). Em 2020, teve a descrição da *mcr-10* em isolado clínico de *Enterobacter roggkampii* (WANG et al., 2020). Até o momento, estes genes foram encontrados alojados em plasmídeos conjugativos (LING et al., 2020). Isso faz com que esses genes sejam mais susceptíveis a trocas de material genético, favorecendo a disseminação da resistência no meio.

No Brasil, o gene *mcr-1* foi detectado pela primeira vez em amostras clínicas de *E. coli* produtora de ESBL do tipo CTX-M resistente à colistina, no ano de 2016, no Rio Grande do Norte (FERNANDES et al., 2016b). Nos últimos anos, em diferentes regiões do Brasil têm aumentado os relatos de identificação do gene *mcr-1* em amostras clínicas de diferentes espécies de enterobactérias, como *E. coli*, *K. pneumoniae* e *Salmonella enterica* (CONCEIÇÃO-NETO et al., 2017a; LORENZONI et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2018; PERDIGÃO NETO et al., 2019; ROCHA et al., 2017).

Apesar de já terem sido relatados variantes do gene *mcr*, a grande maioria dos relatos estão relacionados ao *mcr-1*, e a maior prevalência deste gene é em animais, seguidos de isolados clínicos e ambientais (MENDES OLIVEIRA; PAIVA; LIMA, 2019; RAU et al., 2018). Já foi descrita a co-ocorrência dos genes *mcr-1* e *bla_{KPC-2}* em isolados clínicos de *E. coli* no Rio de Janeiro (CONCEIÇÃO-NETO et al., 2017a), no Rio Grande do Sul (DALMOLIN et al., 2017b), e em São Paulo (BARTOLLETI et al., 2016). Estas evidências além de mostrarem uma estreita relação entre a resistência aos carbapenêmicos e as polimixinas, reforçam a necessidade de vigilância epidemiológica contínua destes genes de resistência.

A descoberta de variantes de genes *mcr* gerou uma preocupação na comunidade científica, pois se teve conhecimento de que essa resistência estava associada a genes mobilizáveis, presentes em plasmídeos conjugativos e que isso favoreceria a transmissão de resistência a polimixina, especialmente dentro do ambiente hospitalar. Além disso, um fato considerado preocupante são os relatos da disseminação dessa resistência fora do ambiente hospitalar, com a presença de *Enterobacterales* carreando simultaneamente genes de resistência aos carbapenêmicos e polimixinas no meio ambiente (FERNANDES et al., 2017; HEMBACH et al., 2017a). A disseminação ambiental da resistência aos antimicrobianos, principalmente, em ETE é uma preocupação a saúde pública e ganha cada vez mais atenção a comunidade científica.

3.4 RESISTÊNCIA BACTERIANA NOS EFLUENTES

A resistência aos antimicrobianos é um problema crescente e preocupante em todo o mundo, não apenas em hospitais e na prática clínica, mas também no meio ambiente. A presença de BRA no meio ambiente, pode ter implicações significativas para a saúde pública, uma vez que essas bactérias podem disseminar sua resistência e serem transferidas para seres humanos através do contato direto ou indireto com o meio ambiente contaminado (RODRÍGUEZ-MOLINA et al., 2019). Apesar de BRA serem tradicionalmente vistos como um problema clínico, nas últimas décadas, os ecossistemas naturais foram reconhecidos como importantes reservatórios de BRA e GRA (NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011). Tem sido cada vez mais frequentes registros de bactérias resistentes fora do ambiente hospitalar, em ambiente natural (WOODFORD et al., 2014).

O problema da disseminação da resistência bacteriana por via ambiental é tão importante que em 2021, a OMS criou o “*Tricycle protocol*” que consiste no desenvolvimento de um protocolo padrão para vigilância integrada multissetorial. O modelo tem como alvo o monitoramento de um indicador: cepas *Escherichia coli* produtoras de ESBL, nos setores humano, animal e ambiental. Este protocolo inclui metodologias padrão nos setores humano, da cadeia alimentar e ambiental, a serem implementadas em contextos de recursos limitados, para facilitar o estabelecimento da vigilância integrada multissetorial de resistência antimicrobiana (WHO, 2021).

Atualmente, as BRA e os genes de resistência a eles são vistos como agentes emergentes de contaminação ambiental. (CASTELO; MAZZEI; ROMÃO, 2021; SANDERSON et al., 2016), que ainda não estão incluídos em normas e/ou legislações, e por isso não estão incluídos

em monitoramentos de rotina, mas que podem servir como ferramenta de monitoramento e vigilância, a fim de gerar informações para os estudos epidemiológicos dessas resistências, contribuir para avaliação de risco e para o planejamento de ações preventivas aos impactos desses efluentes no ambiente e na saúde pública (HALDEN, 2010). Os GRAs apresentam algumas propriedades exclusivas, em comparação com outros contaminantes de preocupação emergente tradicionais. Uma característica é que eles são biológicos e capazes de ser transferidos, por meio de processos genéticos, entre vários tipos de organismos e podem permanecer no ambiente por um longo período e alcançar longas distâncias da fonte (CONLEY et al., 2017; PETROVIC et al., 2008). Outra característica importante é que há várias fontes desses genes, que vão do uso clínico de antimicrobianos ao tratamento de águas residuais e à agricultura e agropecuária (SANDERSON et al., 2016). O crescente reconhecimento da necessidade de conter o surgimento da resistência antimicrobiana resultou em um interesse acadêmico e político substancial na disseminação de fatores de resistência aos antimicrobianos no ambiente. (SANDERSON et al., 2016). Entretanto, ainda faltam esforços para monitoramento em grande escala dos níveis de genes de resistência nos efluentes, compreendendo diferentes tecnologias de tratamento e localizações geográficas e seus efeitos nas águas receptoras (CACACE et al., 2019).

No Brasil, a partir da análise da preocupante situação epidemiológica da resistência aos antimicrobianos bem como também a de outros países que enfrentam o mesmo problema, em 2018 foi elaborado o Plano de Ação Nacional para Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos do Brasil (PAN-BR) em conjunto com a OMS, a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) e a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), que apresenta planos de ação para executar cinco principais objetivos estratégicos que tem como convergência assegurar a manutenção da capacidade de tratamento e prevenção de doenças infecciosas com medicamentos eficazes e de qualidade assegurada através do uso responsável e disponível a todos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). A implementação efetiva do PAN-BR requer ações integradas e coordenadas entre diferentes setores e áreas, incluindo saúde, agricultura, meio ambiente, educação e pesquisa.

Estudos anteriores relataram a presença de membros da ordem *Enterobacterales* resistentes a antimicrobianos de uso exclusivamente hospitalar, como os carbapenêmicos, em rios, efluentes e sistemas de esgoto hospitalares em todo o mundo, destacando assim a inter-relação entre a infecção humana e sistemas aquáticos (ABRANTES, 2022; ANDRADE et al., 2020; COHEN et al., 2020; MAKOWSKA et al., 2020; MILLS; LEE, 2019). Pode-se afirmar que a origem primária destas bactérias resistentes são humanos, ambientes clínicos e

comunitários, e assim são disseminadas para o meio ambiente (SUZUKI et al., 2020a). BRAs podem atingir corpos aquáticos como resultado de contaminação orgânica de várias fontes, incluindo efluentes hospitalares e estações de tratamento de águas residuais, e a presença desses patógenos representa um problema quanto a reutilização desses efluentes para irrigação agrícola, por exemplo (ASFAW, 2018; CAHILL et al., 2019; PRAVEENKUMARREDDY et al., 2020). Um dos principais motivos do aumento dessas bactérias multirresistentes dentro e fora do ambiente hospitalar é uso cada vez mais indiscriminado de antimicrobianos (COHEN et al., 2020).

Cada vez mais, estudos demonstram que as ETEs representam reservatórios importantes para a disseminação da resistência a antimicrobianos (BAQUERO; MARTÍNEZ; CANTÓN, 2008; FERREIRA DA SILVA et al., 2007; KÜMMERER, 2009; NOVO et al., 2013). Os resíduos de antimicrobianos de diferentes fontes são frequentemente despejados nos sistemas de esgoto municipal (MOKRACKA; KOCZURA; KAZNOWSKI, 2012). Apenas uma fração dos antimicrobianos consumidos são metabolizados no corpo humano e uma grande parte do composto original e/ou seus metabólitos (podendo ser entre 20 a 90%) são excretados pela urina e fezes (JELIĆ et al., 2012). A maioria dos antimicrobianos é estável e seus resíduos presentes nos efluentes, podem passar pelos tratamentos de esgoto convencionais, chegando aos corpos hídricos receptores, havendo consequências significativas ao meio ambiente e também à saúde humana (MONTAGNER; VIDAL; ACAYABA, 2017). BRA contêm genes de resistência, eventualmente inseridos em plataformas genéticas móveis e a presença de resíduos de antimicrobianos nos efluentes que vão para as ETEs, é um fator selecionador que intensifica o fenômeno da pressão seletiva. O aumento de bactérias resistentes nos efluentes ocorre através dos mecanismos de uma seleção clonal de organismos que toleram doses de antimicrobianos subletais, e apresentam maiores condições de aptidão diante da pressão seletiva, e assim favorecendo a sobrevivência das bactérias resistentes, que se tornam predominantes na população presente (MICHAEL et al., 2013).

Desta maneira, a poluição por antimicrobianos, mesmo que em concentrações subinibitórias, gera uma pressão seletiva, promovendo a transferência horizontal, levando a um aumento gradual na prevalência da resistência antimicrobiana entre as populações bacterianas presentes nos efluentes (AUGUET et al., 2017b; KÜMMERER, 2009; MARTINEZ, 2009; NOVO et al., 2013; PRUDEN, 2014). A resistência adquirida neste ambiente pode persistir por um longo período de tempo, mesmo que a pressão seletiva imposta pelo uso de antimicrobianos seja reduzida (MOKRACKA; KOCZURA; KAZNOWSKI, 2012). Assim, é constatado que o tratamento de efluentes, independentemente de sua eficiência ou condições operacionais, são

considerados reservatórios importantes para GRA, situados em elementos genéticos móveis, além de também conter BRA nos efluentes finais, por vezes em percentuais mais elevados do que na entrada bruta, representando locais relevantes para a aquisição e a transferência de genes de resistência, contribuindo para a disseminação da resistência aos antimicrobianos para os sistemas aquáticos que recebem estes efluentes (MOKRACKA; KOCZURA; KAZNOWSKI, 2012; RIZZO et al., 2013b; RODRIGUEZ-MOZAZ et al., 2015).

Os efluentes hospitalares têm sido identificados como importantes contribuintes para o despejo de antibióticos e resíduos farmacêuticos no meio ambiente. Isso ocorre devido à natureza dos hospitais como instalações de cuidados de saúde intensivos, onde uma variedade de produtos farmacêuticos, incluindo antibióticos, é amplamente utilizada para o tratamento de doenças infecciosas e outras condições médicas. Uma vez que os antibióticos são despejados nos esgotos, mesmo que tratados, podem ser carregados para as águas superficiais ou subterrâneas. O estudo de AYDIN et al., 2019 apresentou a ocorrência de antibióticos em 16 diferentes efluentes hospitalares e concluiu que a contribuição total de antibióticos das ETEs hospitalares foi determinada como 13% no verão e 28% no inverno.

Sabe-se também que não somente os efluentes hospitalares contribuem para a presença dos fármacos nos efluentes. Os efluentes urbanos domésticos também podem apresentar resíduos de antimicrobianos em sua composição através de dejetos de pacientes que fazem o tratamento com antimicrobianos em casa, assim esses efluentes são transportados por sistemas de coleta de esgoto para as ETEs municipais (ALMAKKI et al., 2019). Além disso, também pode ocorrer o descarte inadequado destes medicamentos vencidos, e também o descarte de sobras de antimicrobianos, que ocorre devido ao uso inadequado destes medicamentos, indo diretamente para nos sistemas de coleta de esgoto (AYUKEKBONG; NTEMGWA; ATABE, 2017). É importante citar também que, um dos setores de maior uso de antimicrobianos está fora da área clínica, que é na agropecuária, sendo uma das principais fontes de antimicrobianos para o meio (WHO, 2018b).

Uma das forças motriz que contribuem para a disseminação de resistência a antimicrobianos pelas ETEs é a concentração de bactérias resistentes nos efluentes brutos. Portanto, quanto maior a carga desses microrganismos resistentes no efluente bruto, mais intenso pode ser a carga de resistência aos antimicrobianos no efluente lançado no ambiente (NOVO; MANAIA, 2010). Assim, os efluentes hospitalares têm sido considerados uma matriz de risco, devido a possibilidade da presença em altas concentrações de resíduos farmacêuticos e microrganismos, potencialmente prejudiciais à saúde humana e ambiental (CARRARO et al., 2016).

É conhecido que os métodos convencionais de tratamento utilizados nos sistemas de saneamento básico não são eficientes para remover os contaminantes emergentes como BRA e GRA dos efluentes, as ETEs apresentam condições favoráveis para a proliferação de bactérias resistentes, e conseqüentemente para a transferência horizontal de genes de resistência a bactérias sensíveis aos antimicrobianos, e apresentam alta poder de disseminação de resistência para as bactérias sensíveis presentes (PETRIE; BARDEN; KASPRZYK-HORDERN, 2015; RIZZO et al., 2013a). A temática da presença da resistência bacteriana em efluentes tem sido cada vez mais estudada no Brasil, onde é permitido o lançamento de esgoto hospitalar não tratado na rede coletora de municípios com estação de tratamento de águas residuais urbanas. Além disso, não existem parâmetros legais que limitem as concentrações de antimicrobianos e microrganismos resistentes em esgotos hospitalares e urbanos.

Desde a década de 1970, estudos já relatavam a presença de bactérias multirresistentes em diversos ambientes como rios e áreas costeiras, esgoto doméstico e hospitalar, sedimentos, águas superficiais, lagos, oceanos contaminados por esgotos e na água para consumo, demonstrando suas implicações para a saúde pública (KELCH; LEE, 1978; MEZRIOUI; BALEUX, 1994; WALTER; VENNES, 1985). Hoje, tem sido cada vez mais descrito na literatura científica em diversas partes no mundo os registros de BRAs encontradas fora do ambiente hospitalar, principalmente em efluentes urbanos e hospitalares e nos corpos hídricos receptores desses efluentes (AUGUET et al., 2017b; HALLER et al., 2018; KORZENIEWSKA; HARNISZ, 2013; RODRÍGUEZ-MOLINA et al., 2021; ZHAO; ZONG, 2016).

GRAs de grande importância clínica, como genes que codificam produção de carbapenemases como *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{IMP}, entre outros, são amplamente relatados em efluentes de ETEs municipais, em esgotos hospitalares brutos e tratados, e em ambientes receptores de efluentes como os rios, lagos e praias públicas, em diferentes partes do mundo (AL SALAH et al., 2020; CACACE et al., 2019; CAVE, 2019; DEVARAJAN et al., 2016; HALLER et al., 2018; PARVEZ; KHAN, 2018). Trabalhos envolvendo a ocorrência de enterobactérias resistentes em águas residuais das ETEs também têm sido realizados no Brasil. ZAGUI et al., 2020, avaliaram o perfil de resistência a antimicrobianos e a produção de enzimas β -lactamases em bacilos Gram-negativos isoladas de esgoto hospitalar e em estações de esgoto urbano no município de Ribeirão Preto, São Paulo. No trabalho o fenótipo multirresistente foi observado em 33,3% dos isolados de esgoto hospitalar e genes codificadores de β -lactamases foram detectados em 35,6% dos isolados.

O estudo de CONTE et al., 2017, teve como objetivo caracterizar ESBL e *Enterobacteriaceae* resistentes a quinolonas de efluente hospitalar do hospital universitário da Universidade Federal do Paraná. Este efluente sanitário era constituído por esgoto doméstico e industrial, infiltrado de água da chuva em diferentes locais dentro de uma Estação de Tratamento de Águas Residuais (ETAR), incluindo amostras do esgoto de entrada, tanque de aeração e esgoto de saída. Também foram analisadas amostras das águas do rio Iguaçu, em Curitiba, a montante e a jusante, do ponto onde é descarregado o efluente da ETAR. Dentre os achados deste trabalho, isolados produtores de ESBL foram identificados na água bruta e na água tratada da estação, eles incluíam: *E. coli*, *K. pneumoniae* e *Klebsiella oxytoca*. A resistência às cefalosporinas foi observada em 34,4% das *E. coli* e 27,3% das *K. pneumoniae* e a resistência aos carbapenêmicos foi encontrada em 5,4% de *K. pneumoniae*. Foram encontrados também genes determinantes de resistência que codificam carbapenemases, principalmente em amostras de efluentes hospitalares e nas amostras do rio.

DROPA et al., 2016, investigaram genes que codificam ESBL em cinco ETEs, no município de São Paulo. Os resultados do trabalho mostraram a presença de cepas *E. coli*, *K. pneumoniae* e *Enterobacter cloacae* que continham genes codificadores de ESBL nos efluentes das estações de coleta, demonstrando a disseminação mediada por plasmídeos de genes que codificam enzimas de resistência, sugerindo que as ETEs são pontos críticos para a transferência de genes de ESBL.

CHAGAS et al., 2011, investigaram a presença de BRA em efluentes de uma ETE hospitalar no Rio de Janeiro. Dos isolados identificados, 94% pertenciam à família *Enterobacteraceae*. A maioria das cepas era sensível ao imipenem e ao meropenem; e resistente à cefalotina, à cefotaxima e ao sulfametoxazol-trimetoprim. O fenótipo de ESBL foi caracterizado em 43% dos isolados. Os produtores de ESBL mais comuns foram: *K. pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* e *E. coli*. Microrganismos patogênicos e altas taxas de resistência ainda puderam ser observados nos efluentes clorados. Foi observado que, apesar do tratamento, o esgoto hospitalar pode ser considerado um veículo ambiental de disseminação de bactérias multirresistentes. Além destes trabalhos, outros estudos também relataram a presença de genes que codificam β -lactamases no Rio Grande do Sul (GUSATTI et al., 2009), Paraná (PALERMO et al., 2016), Roraima (BRANDÃO et al., 2017), Bahia (BARTLEY et al., 2019), São Paulo (PICÃO et al., 2013a) e no Rio de Janeiro (FRÓES et al., 2016; MONTEZZI et al., 2015; PASCHOAL et al., 2017).

Cada vez mais estudos tem demonstrado que ETEs recebem efluentes hospitalares, são pontos importantes para o desenvolvimento de resistência a antimicrobianos em comunidades

bacterianas patogênicas, e para a disseminação dessa resistência para o meio ambiente, podendo gerar graves problemas para a saúde pública. Como foi visto nos trabalhos mencionados, as bactérias resistentes da ordem *Enterobacterales* são frequentemente isoladas de efluentes de ETEs por todo o mundo.

Desde a primeira identificação do gene *mcr-1*, na China por LIU *et al.* (2016) a presença desse gene, e outras variantes dos tipos de *mcr* (*mcr-2* a *mcr-9*), já foi descrita em isolados de *Enterobacterales* em humanos, animais e ambiente em seis dos sete continentes (exceto na Antártida) (ANYANWU; JAJA; NWOBI, 2020b; WANG *et al.*, 2018a). Mesmo considerando que foi pouco investigado em fontes ambientais, a ocorrência do gene *mcr-1* já foi relatada em efluentes de ETEs em ambientes circunvizinhos em países por toda a Europa (OVEJERO *et al.*, 2017). A presença desse gene nesse ambiente é devido principalmente a sua capacidade de resistir aos processos de tratamento, além de ser persistente no ambiente (CACACE *et al.*, 2019; HEMBACH *et al.*, 2017b).

Recentemente foram identificados genes que conferem resistência a polimixinas da família *mcr* em efluentes de ETEs municipais, em seus rios receptores, e principalmente de esgotos hospitalares, em diferentes partes do mundo: Espanha (LEKUNBERRI; BALCÁZAR; BORREGO, 2017; OVEJERO *et al.*, 2017), Alemanha (CACACE *et al.*, 2019; HEMBACH *et al.*, 2017b; KNEIS; BERENDONK; HESS, 2019), Suíça (ZURFUH *et al.*, 2016), Itália (CASELLI *et al.*, 2018), Portugal (CACACE *et al.*, 2019), Holanda (CACACE *et al.*, 2019), China (JIN *et al.*, 2018; LONG *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2018a; ZHAO *et al.*, 2017a, 2017b), Tailândia (RUNCHAROEN *et al.*, 2017), Bangladesh (ISLAM *et al.*, 2017), Líbano (ALHAJ SULAIMAN; KASSEM, 2020), Turquia (CACACE *et al.*, 2019) e África do Sul (ANYANWU *et al.*, 2021; IGWARAN; IWERIEBOR; OKOH, 2018).

No Brasil, estudos têm mostrado reservatórios do gene *mcr-1*, não somente em isolados clínicos, mas na agricultura, nos animais e no ambiente (FERNANDES *et al.*, 2017; KOBBS *et al.*, 2021; SELLERA *et al.*, 2016), porém há poucos estudos da presença deste gene nestas matrizes. Há relato de clones de *E. coli* portadoras do gene *mcr-1* em isolados de águas recreativas de praias urbanas públicas contaminadas do Estado de São Paulo, juntamente com gene *bla_{CTX-M-1}*, evidenciando fenótipo de multirresistência, e destacando uma nova fonte de transmissão desta resistência (FERNANDES *et al.*, 2016a, 2017).

A OMS definiu que a disseminação da infecção por bactérias portadoras de *mcr-1*, associada a genes que codificam enzimas carbapenemases de espectro estendido, representa uma grande ameaça à saúde humana (WHO, 2019b). A detecção de genes *mcr* em amostras ambientais é essencial para vigilância epidemiológica e para avaliar como os insumos

antropogênicos afetam sua disseminação para o meio, além da possibilidade de detecção prévia de um possível surto dessa resistência circulante no ambiente (LEKUNBERRI; BALCÁZAR; BORREGO, 2017). Diante dos dados cada vez mais frequentes da literatura, fica evidente que as ETEs são pontos críticos para a acumulação e disseminação de resistência bacteriana a antimicrobianos para o meio ambiente (RIZZO et al., 2013b). Assim, são fundamentais estudos da aplicação de tecnologias de tratamentos eficazes nas ETEs para eliminação destes contaminantes biológicos dos efluentes, interromper o ciclo da disseminação da resistência bacteriana e melhorar as condições de saúde humana e ambiental.

3.5 PROCESSOS DE DESINFECÇÃO DE EFLUENTES

A desinfecção de esgotos é um processo essencial para garantir segurança da saúde pública humana e ambiental. Esta etapa é realizada durante o tratamento terciário de efluentes. De maneira geral, a maioria das estações construídas alcança apenas o nível secundário de tratamento. O nível terciário é utilizado quando o esgoto doméstico é lançado em corpos hídricos receptores para os quais a legislação exige um efluente de qualidade elevada, ou em casos que será feita sua reutilização. Embora o tratamento terciário ainda não seja muito difundido na prática no Brasil, sua aplicabilidade é muito discutida pela comunidade científica (VON SPERLING, 2005).

O tratamento terciário é constituído de unidade de tratamento físico-químico, que tem como finalidade a remoção complementar de matéria orgânica, compostos não biodegradáveis, sólidos inorgânicos dissolvidos, nutrientes como nitrogênio e fósforo, de poluentes específicos dos esgotos tratados (não biodegradáveis ou tóxicos) (REIS, 2014). Nesta etapa de tratamento, também é realizada a remoção de organismos patogênicos, chamada de desinfecção. A desinfecção é a destruição seletiva de organismos causadores de doenças como bactérias, protozoários, vírus e algas presentes no efluente, sem que haja a eliminação de todos os organismos presentes, de acordo com os padrões de qualidade estabelecidos para as diferentes situações (VON SPERLING, 2005). A desinfecção do ambiente pode ser realizada por meio da ação de alguns principais mecanismos como a danificação da parede celular, alteração da permeabilidade da célula, alteração da natureza coloidal do citosol, inativação de atividades enzimáticas, interferência na biossíntese e no crescimento celular, bloqueando a síntese de proteínas, ácidos nucleicos e coenzimas, e assim, modificando o metabolismo da célula (PACHECO JORDÃO; PESSOA, 2017).

Os processos de desinfecção de esgotos em ETEs representam a abordagem mais segura para controlar agentes transmissores de doenças infecciosas, especialmente quando há potencial de contato humano. Sua inserção na estação de tratamento pode se dar pela construção de uma etapa exclusiva para desinfecção, tratamento terciário por processos artificiais, ou por intermédio da adaptação de etapas existentes para realizar a desinfecção por métodos naturais (PACHECO JORDÃO; PESSOA, 2017). A desinfecção natural ou artificial utiliza isoladamente, ou de forma combinada, agentes físicos e químicos para inativar os organismos-alvo. Como processos naturais utiliza-se a infiltração no solo e as lagoas de estabilização, como a lagoa de maturação e a lagoa de polimento. Entre os processos artificiais físicos mais comumente utilizados na desinfecção do efluente são a filtração em membranas e a radiação ultravioleta (UV), e os processos químicos são a ozonização e a cloração (HO; VAN ECHELPOEL; GOETHALS, 2017). Porém, esses processos possuem desvantagens, como por exemplo, a ozonização que é um recurso caro e pode produzir brometos cancerígenos e a cloração que produz a formação de subprodutos tóxicos, como os trihalometanos, o que motiva a pesquisa de alternativas de tratamento mais seguras para as estações de tratamento (AL-ABRI et al., 2019; RUBIO et al., 2013).

De acordo com a OMS para o meio ambiente, os métodos convencionais de tratamento de efluentes são ineficientes para a desinfecção de agentes microbianos resistentes a antimicrobianos nos recursos hídricos. Há evidências científicas que bactérias multirresistentes são encontradas em águas residuais, podendo representar focos para a disseminação da resistência microbiana (WHO, 2018a). Devido a isso, é necessária a implementação de tecnologia de desinfecção para melhorar a qualidade dos efluentes tratados e interromper o ciclo de disseminação da resistência bacteriana. Um tratamento alternativo para desinfecção eficiente dos efluentes são os Processos Oxidativos Avançados (POAs) (SHARMA et al., 2019; UMAR; RODDICK; FAN, 2019).

3.6 PROCESSOS OXIDATIVOS AVANÇADOS

Os tratamentos utilizando POAs foram propostos pela primeira vez na década de 1980 para o tratamento de água potável. Mais tarde, foram amplamente aplicados para o tratamento de diferentes tipos de águas residuais, pois constituem métodos de tratamento alternativos para a degradação de poluentes orgânicos recalcitrantes e certos poluentes inorgânicos dos efluentes (DENG; ZHAO, 2015). Esses processos têm como objetivo principal a mineralização da grande maioria dos contaminantes orgânicos, formando dióxido de carbono (CO₂), água (H₂O) e íons

inorgânicos ou substâncias menos tóxicas (PANDIS et al., 2022). Embora os POAs sejam eficazes na remoção de uma ampla variedade de poluentes, é importante destacar que esses processos nem sempre resultam na mineralização completa dos contaminantes orgânicos, pois nem todos os compostos orgânicos são decompostos até esse estágio final (MA et al., 2021). Isso ressalta a importância de avaliar os produtos intermediários gerados durante os processos oxidativos para entender seu impacto no meio ambiente e na saúde humana. Além disso, é crucial considerar a otimização das condições de reação para maximizar a degradação e minimizar a formação de produtos intermediários indesejados (CAPODAGLIO, 2020).

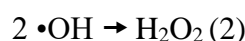
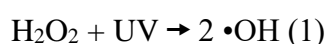
A oxidação dos contaminantes através da geração de espécies químicas com alto poder oxidante, sendo o principal o radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$), com potencial de oxidação igual a 2,8 eV, que podem remover uma ampla gama de contaminantes de preocupação emergente e microrganismos (FERRO et al., 2017; MENDES SAGGIORO et al., 2011). Os POAs têm sido considerados métodos de desinfecção alternativos ou complementares aos tratamentos convencionais de águas residuais mais utilizados, pois são capazes de inativar microrganismos, pela degradação da estrutura química das paredes celulares, que não são eliminados durante os tratamentos convencionais (GIANNAKIS et al., 2015; RADOVIĆ VUČIĆ et al., 2021; YEOH et al., 2022).

Os radicais hidroxila são potentes agentes oxidantes, pois são não seletivos, ou seja, degradam substratos de qualquer natureza. Há vários tipos de POAs baseados na formação de radicais hidroxila por meio de diversas reações químicas, fotoquímicas ou eletroquímicas. Como os radicais hidroxila têm vida útil muito curta, eles são formados apenas *in situ* durante a aplicação por meio de diferentes métodos, incluindo uma combinação de irradiação UV com agentes oxidantes e catalisadores (STANGE et al., 2019; WANG; ZHUAN, 2020).

A irradiação ultravioleta é um tratamento bem estabelecido para desinfecção, sem a geração de subprodutos, devido à absorção de UV por moléculas orgânicas, como o DNA (STANGE et al., 2019). As faixas UV mais conhecidas são UVC (comprimento de onda entre 100 e 280 nm), UVB (280 e 320 nm) e UVA (320 e 400 nm). A irradiação UVC é considerada a mais eficiente na desinfecção de efluentes (CHATZISYMEON et al., 2011; IGOUD et al., 2014), porém os raios UVA e UVB são presentes e abundantes na luz solar, sendo mais econômica a sua utilização. Em comparação com processos envolvendo geração de radicais hidroxila, a fotólise com radiação UVA tem geralmente uma eficiência mais baixa, além disso, os microrganismos apresentam maior capacidade de regeneração após a ação da radiação UVA (GIANNAKIS et al., 2014). No entanto, a atuação de forma conjunta com outros compostos oxidantes, como H_2O_2 e catalisadores, como ferro (Fe), que são fotoativados e podem degradar

os contaminantes de forma mais eficiente devido a maior produção de radicais hidroxila (FERRO et al., 2017; HUANG et al., 2018).

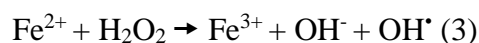
O H_2O_2 é uma espécie reativa de oxigênio de longa duração de poder oxidante 1,77 eV, portanto, relativamente estável e sem carga. O mecanismo da fotólise de H_2O_2 com UV, a faixa de comprimento de onda UV mais comumente usada é a UVC, que tem comprimentos de onda entre aproximadamente 100 e 280 nanômetros (nm), é a quebra da molécula em radicais hidroxila com um rendimento de dois $\bullet\text{OH}$ para cada molécula de H_2O_2 (Equação 1), e há a possibilidade da recombinação desses radicais, transformando-se em H_2O_2 (Equação 2), de acordo com as equações abaixo:



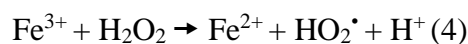
O tratamento com $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$ pode ser melhorado e acelerado através da aplicação de um catalisador, sendo o mais utilizado na remoção de micropoluentes é o ferro (Fe), realizando as reações conhecidas como Fenton e foto-Fenton.

3.6.1 Processos Fenton e foto-Fenton

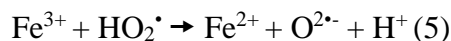
A reação de Fenton é um POA que apresenta grande visibilidade, pois tem a possibilidade de ser empregada na degradação de uma ampla variedade de contaminantes orgânicos (AHMED et al., 2020). Essa reação foi descrita em 1894 por Henry John Fenton que descobriu o potencial do H_2O_2 na oxidação do ácido tartárico na presença de íon ferroso (Fe^{2+}) (HUSSAIN; ANEGGI; GOI, 2021). Os mecanismos do processo de Fenton apresentam algumas possíveis reações para a degradação de um contaminante orgânico (LOFRANO et al., 2017). Esse processo consiste em reações que a geração de OH^\bullet é realizada através de uma reação redox, na qual o catalisador Fe^{2+} é oxidado a íon férrico (Fe^{3+}) na decomposição de H_2O_2 , que é reduzido a íons hidroxila (OH^-) e ao OH^\bullet (Equação 3) (KEHRER, 2000).



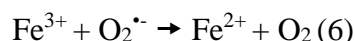
Em seguida, na sequência das reações de Fenton, os íons Fe^{3+} também podem reagir com o H_2O_2 , regenerando os íons Fe^{2+} , produção de radicais hidroperoxila ($\bullet\text{HO}_2$) e radicais livres (Equação 4):



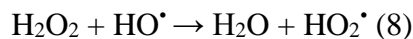
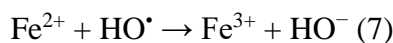
Os radicais HO_2^\bullet também podem reagir com o Fe^{3+} e contribuir na regeneração do Fe^{2+} , além de gerar o radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) (Equação 5):



O radical $\text{O}_2^{\bullet-}$ reage com o Fe^{3+} também regenera o Fe^{2+} , gerando oxigênio (O_2) (Equação 6):

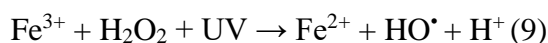


Um fator importante para o processo é a concentração de H_2O_2 utilizada nas reações de Fenton. Em geral, quanto maior a concentração de ferro e peróxido de hidrogênio, maiores as taxas de oxidação. Contudo, um excesso de íons de ferro ou H_2O_2 limita a eficiência do processo foto-Fenton, pois ao atingir concentrações muito acima do limite, esses íons favorecem a recombinação com os radicais hidroxila, não favorecendo a degradação do contaminante, conforme nas equações 7 e 8 (GIANNAKIS et al., 2016b):



Nas reações de Fenton, é importante a concentração de H_2O_2 ser monitorada, pois se o mesmo for completamente consumido a reação será interrompida (NIDHEESH; GANDHIMATHI, 2012; TOKUMURA et al., 2011).

Essas reações podem ser melhoradas através da reação chamada de foto-Fenton em que consiste na combinação de reação de Fenton com a luz ultravioleta (luz UVA, por exemplo) ou visível, que potencializa a reação devido à regeneração contínua dos íons Fe^{2+} , e isso aumenta a quantidade de radicais OH^\bullet disponíveis, aumentando a eficiência de oxidação dos contaminantes, representado na equação 9 (SERNA-GALVIS et al., 2019):



Essas reações podem ser realizadas na presença de catalisadores em solução aquosa, sendo caracterizado como sistema foto-Fenton homogêneo, ou com o catalisador suportado na fase sólida, no processo conhecido como foto-Fenton heterogêneo (MIRZAEI et al., 2017). Os processos foto-Fenton homogêneos apesar de possuírem uma cinética maior do que os heterogêneos, e serem utilizados em estações de tratamento de indústrias para remoção de

contaminantes, apresentam algumas desvantagens. As reações do processo Fenton homogêneo devem ser realizadas em pH ácido para garantir a eficiência do processo, pois em pH superior a 3,0 o Fe^{2+} é precipitado na forma de hidróxido de ferro ($\text{Fe}(\text{OH})_3$), diminuindo a eficiência do processo (NIDHEESH; GANDHIMATHI, 2012). Essa necessidade de acidificação do efluente antes do tratamento, requer uma neutralização antes do descarte, gerando assim formação de lodo de ferro e nesse processo perde-se ferro para o ambiente, dificultando sua aplicação em larga escala, e isso além de tornar esse processo mais caro (POURAN et al., 2014), ainda limita a utilização deste processo em países que apresentam rígidas legislações quanto a concentração máxima de ferro permitida nos efluentes (DEVI; SRINIVAS; ARUNAKUMARI, 2016).

Devido a essas limitações do Fenton homogêneo, a utilização do processo de Fenton heterogêneo por catalisadores de ferro imobilizado passou a ser mais estudada nos últimos anos para o tratamento de efluentes (HERRERA-IBARRA et al., 2022; SCARIA; NIDHEESH, 2023). Esses processos apresentam vantagens em relação ao Fenton homogêneo, pois impedem que o ferro se dissolva na água e a reação acontece na superfície do catalisador, aumentando assim maior área de superfície para o catalisador, aumentando sua eficiência (SOON; HAMEED, 2011). Além disso, os processos de Fenton-heterogêneo requerem concentrações de reagentes mais baixas do que os homogêneos e são considerados ecologicamente corretos, pois os catalisadores utilizados no processo podem ser reutilizados, sendo possível removê-los da solução com a utilização de ímãs (O'DOWD; PILLAI, 2020). Outra vantagem principal do processo heterogêneo é que podem ser realizados em pH neutro, que costuma ser o pH natural dos efluentes, pois devido a presença do ferro adsorvido em sua estrutura, são capazes de reduzir a precipitação de $\text{Fe}(\text{OH})_3$ (HASSAN; HAMEED, 2011).

3.6.2 Minerais naturais de ferro como catalisador

Um dos catalisadores heterogêneos mais utilizados são os minerais de óxido de ferro, em que as espécies de ferro são imobilizadas em poros ou dentro da estrutura do catalisador. Os principais minérios de ferro de origem natural são a hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$), goethita ($\alpha\text{-FeOOH}$), magnetita (Fe_3O_4) e a ilmenita (FeTiO_3) (O'DOWD; PILLAI, 2020). Esses materiais apresentam propriedades morfológicas, físico-químicas, eletrostáticas e magnéticas importantes para aplicação em processos de adsorção e catálise. Dentre esses, os catalisadores obtidos a partir da extração de materiais naturais tem apresentado muita vantagem devido ao baixo custo, possibilidade de reuso e elevada disponibilidade (HUSSAIN; ANEGGI; GOI, 2021; LAI et al., 2021). O Brasil é um dos principais produtores mundiais de minério de ferro, com uma produção estimada em 400 milhões de toneladas de minério de ferro em 2020 (PINTO

et al., 2022). Os minérios apresentam um elevado percentual de ferro composto por partículas de agregados finos ricos em hematita e goetita e a utilização desses óxidos de ferro tem sido amplamente estudada em diversos processos de tratamento de águas e efluentes, devido à sua alta atividade catalítica na remoção de poluentes orgânicos, capacidade de adsorção e a possibilidade de regeneração (MATEI et al., 2022).

Um dos óxidos de ferro que se mostrou promissor como fotocatalisador para degradação de contaminantes ambientais em reações de Fenton é a ilmenita (FeTiO_3), conhecida como titanato de ferro, que é um mineral magnético abundante na natureza e de baixo custo (PATAQUIVA-MATEUS; ZEA; RAMIREZ, 2017). A composição teórica da ilmenita é de 36,8% de Fe, 31,6% de Ti e 31,6% de O (GONÇALVES; BRAGA, 2019). No Brasil, o principal município ativo que são fonte de ilmenita é a região de Mataraca (PB). A extração da ilmenita no Brasil é feita por meio de mineração a céu aberto e é extraída em grandes quantidades e depois passa por um processo de beneficiamento para separar o titânio e outros minerais presentes. A ilmenita extraída no Brasil é usada principalmente como fonte de rutilo (TiO_2) para a produção de ligas metálicas, pigmentos, cerâmicas, vidros e outros materiais (GONÇALVES; BRAGA, 2019).

A presença de elementos redox-ativos em teores variáveis de Fe^{3+} e Fe^{2+} na estrutura da Ilmenita a torna eficiente para processos do tipo Fenton, enquanto que a presença do rutilo (TiO_2) permite um potencial na atividade fotocatalítica (BUTT; MPINGA; TICHAPONDWA, 2021).

As propriedades fotocatalíticas da ilmenita promovem a decomposição do H_2O_2 em radicais hidroxila, e com a ação da luz UV-Visível sobre o Fe^{2+} , ocorre a oxidação para Fe^{3+} , ocasionando mais decomposição do H_2O_2 . Nesse sentido, a utilização de um material natural, como um resíduo da mineração, para o processo de desinfecção apresenta vantagem, pois pode diminuir o custo do processo (GARCÍA-MUÑOZ et al., 2016). O mineral ilmenita tem se demonstrado eficiente para diversos tipos de tratamento de degradação de contaminantes como corantes (BUTT; MPINGA; TICHAPONDWA, 2021; SILVEIRA et al., 2017), antimicrobianos (GARCÍA-MUÑOZ et al., 2017a; HEIDARI et al., 2021) e para desinfecção de efluentes (GARCÍA-MUÑOZ et al., 2017c, 2022; XIA et al., 2018).

GARCÍA-MUÑOZ et al., 2022, utilizaram a ação conjunta da ilmenita bruta como fotocatalisador, e do peroximonosulfato como oxidante na presença de luz UVA para inativação de *Enterococcus faecalis* e foi altamente promovida atingindo inativação total da bactéria em 120 min em efluente simulado. RUALES-LONFAT et al., 2015, avaliaram a atividade fotocatalítica de quatro diferentes semicondutores de hidróxidos de ferro comercialmente

disponíveis: hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$), goetita ($\alpha\text{-FeOOH}$), wüstita (FeO) e magnetita (Fe_3O_4), para a inativação de bactérias em pH neutro na presença de luz solar, ausência ou presença de H_2O_2 em pH neutro. Foi demonstrado que baixas concentrações de reagentes ($0,6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Fe^{3+} e $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de H_2O_2) sob luz solar podem servir como um método de desinfecção para patógenos bacterianos transmitidos pela água entre 90 e 120 min de reação, e que a goetita e a hematita apenas na presença de luz solar, sem a presença de H_2O_2 , realizaram total inativação de *E. faecalis*, ou seja utilizando apenas oxigênio como aceptor de elétrons e não foi observado nenhuma reativação e/ou crescimento bacteriano após o tratamento com foto-Fenton em todos os (hidr)óxidos de ferro estudados.

Nesse contexto, a ideia de substituir o ferro dissolvido por catalisadores sólidos através de resíduos da mineração, para tratamento de desinfecção sem geração de resíduos tóxicos e sem reativação ou crescimento em matrizes aquosas, tem se demonstrado eficaz e são necessários mais estudos para avaliar sua eficácia em diferentes tipos de efluentes e condições ambientais. Para inativar as bactérias, os radicais livres gerados no processo foto-Fenton geram muitos danos na estrutura da célula bacteriana, e esses processos que acarretam a inativação bacteriana são complexos, e ainda estão sendo muito estudados.

3.7 INATIVAÇÃO BACTERIANA MEDIADA POR PROCESSOS OXIDATIVOS AVANÇADOS

A espécies reativas de oxigênio causam diversos danos celulares na bactéria. Esses compostos reagem com componentes celulares, como proteínas e componentes da membrana celular, como lipídeos, levando ao início de cadeias de peroxidação lipídica dentro das células e na membrana celular, levando a maior permeabilidade e inativação (ZHAO; DRLICA, 2014). O radical $\bullet\text{OH}$ pode afetar diretamente o DNA, e depois da formação do excesso desses radicais, não há mecanismo de defesa efetivo contra esse ataque (SPUHLER; ANDRÉS RENGIFO-HERRERA; PULGARIN, 2010). O radical $\bullet\text{OH}$ é um composto de vida curta e por isso, para ser efetivo precisa ser formado próximo ao seu alvo, e quando formado próximo ao DNA, ele reage com as bases nitrogenadas ou a molécula de desoxirribose, levando quebra da fita e liberação das bases (ANDRÉS JUAN et al., 2021). O aumento da concentração interna e externa dessas espécies reativas de oxigênio pode ocorrer com a ação da radiação UV, do H_2O_2 e processos Fenton e foto-Fenton.

Estruturas importantes da bactéria como DNA e proteínas apresentam uma notável absorção direta da luz UV, que é responsável por causar uma série de danos ao DNA, entre elas

a quebra de fita, oxidação de purinas e formação de dímeros de pirimidina que distorcem a estrutura da dupla hélice do DNA e interferem na replicação e transcrição do DNA, levando a mutações e danos celulares (CADET; RICHARD WAGNER, 2013; RASTOGI et al., 2010). Além do DNA, a luz UV também afeta outros componentes celulares importantes. O H_2O_2 intracelular é um subproduto normal do processo de respiração bacteriana, e sua concentração precisa ser controlada através da ação de enzimas. A luz UV afeta diretamente esses componentes, como por exemplo, a enzima superóxido dismutase que converte o radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) em H_2O_2 e oxigênio molecular (O_2) e a enzimas catalase que regula a concentração de H_2O_2 durante o processo de respiração. A luz UV inibe a ação destas enzimas, gerando o aumento das concentrações intracelulares de espécies reativas de oxigênio de longa duração como o H_2O_2 e $\text{O}_2^{\cdot-}$ (GIANNAKIS et al., 2017).

Outras enzimas importantes também são afetadas como a desidratase do ácido di-hidroxi que é uma das moléculas contendo o complexo ferro-enxofre (Fe/S) que demonstra comportamento fotossensível e pode ser inativada pela irradiação, e sua modificação pode desencadear um estresse indireto adicional. A ribonucleotídeo redutase é uma enzima-chave no processo de replicação do DNA que apresenta forte absorção de UV e também é afetada pela irradiação (GIANNAKIS et al., 2017). Além disso, fotossensibilizadores presentes dentro das células absorvem luz UV, e quando excitados atacam diretamente biomoléculas ou reagir com o oxigênio circundante, gerando espécies reativas de oxigênio como radicais superóxido, radical hidroxila, peróxido de hidrogênio (LAM et al., 2020; SPUHLER; ANDRÉS RENGIFO-HERRERA; PULGARIN, 2010). A luz UV também causa danos indiretos em componentes importantes da célula bacteriana através da indução da produção de diferentes espécies reativas de oxigênio, liberação de ferro interno e subsequente reações de Fenton interno e foto-Fenton (LEE et al., 2011).

O H_2O_2 é uma espécie reativa de oxigênio estável, não carregada e quando adicionado em maior quantidade em um ambiente na ausência de luz, o H_2O_2 penetra na célula bacteriana e é difundido através de porinas de membrana, facilitando seu transporte para dentro da célula (FASNACHT; POLACEK, 2021; SPUHLER; ANDRÉS RENGIFO-HERRERA; PULGARIN, 2010). No entanto, as bactérias possuem enzimas protetoras, a catalase e a superóxido dismutase, e em condições normais esse H_2O_2 sofre ação dessas enzimas, que é catalisado em água e oxigênio para manter o equilíbrio entre sua geração intracelular e a difusão potencial de fontes externas pela eficiência de remoção pelas enzimas (FENG et al., 2020; IMLAY, 2008). Porém se sua concentração for maior que a capacidade antioxidante da célula e com a presença de irradiação UV, a ação destas enzimas é reduzida, tornando a célula sensível ao estresse de

oxidantes e pode apresentar efeitos prejudiciais nas macromoléculas essenciais (GARCÍA-MUÑOZ et al., 2022). Na presença de luz UV, o acúmulo de H_2O_2 intracelular leva ao aumento da formação de radicais hidroxila, que aumentam o estresse oxidativo na bactéria. O H_2O_2 também pode danificar aglomerados de Fe/S, que contribui para liberação de Fe que reagem com o H_2O_2 e inicia as reações de Fenton intracelular e mais radicais hidroxila são gerados (ALVEAR-DAZA et al., 2021; GIANNAKIS et al., 2016b). Além disso, esses danos são cumulativos e refletem-se principalmente após longos períodos de exposição à irradiação UV ou sob altas intensidades de irradiação (GIANNAKIS et al., 2017).

A adição de íons Fe^{2+} e Fe^{3+} desencadeia processos Fenton e foto-Fenton que favorecem a formação de $\bullet\text{OH}$ na célula bacteriana. Além desses processos, a presença dos íons Fe^{2+} ou Fe^{3+} em excesso pode interferir nos processos metabólicos da bactéria, levando à inibição de enzimas vitais ou à interrupção de vias metabólicas essenciais, que pode resultar na incapacidade da bactéria de produzir energia ou sintetizar componentes celulares, levando à sua inativação (SUN; LU; GAO, 2011).

Os processos Fenton e foto-Fenton em pH neutro apresentam alguns mecanismos sugeridos para levar a inativação bacteriana (O'DOWD; PILLAI, 2020). O Fe^{2+} quando adicionado devido a uma densidade de carga menor, difunde-se livremente nas células, reage com o H_2O_2 e gera grande produção de $\bullet\text{OH}$ que atua na oxidação efetiva de estruturas da célula e resultando na inativação da bactéria (GIANNAKIS et al., 2017). A oxidação de Fe^{2+} gera a formação de radicais hidroxila Fe^{3+} tanto dentro quanto fora da célula bacteriana. Dentro da célula, o Fe^{3+} formado pode se ligar a proteínas e à estrutura do DNA e na presença de luz UV é reduzido ocorrendo a regeneração do Fe^{2+} e promovendo geração de mais $\bullet\text{OH}$ que intensifica a oxidação dos componentes celulares (GARCÍA-FERNÁNDEZ et al., 2012).

Os complexos Fe^{3+} -hidroxi são fotoativos e absorvem luz UV levando a regeneração de Fe^{2+} e a formação adicional de $\bullet\text{OH}$ em massa, possibilitando reações de foto-Fenton em pH neutro (GIANNAKIS et al., 2017). O Fe^{3+} adicionado no meio em suspensão, apresenta baixa capacidade de difusão para dentro da célula bacteriana, porém, este pode ser adsorvido em proteínas de ligação específica, que gerenciam seu transporte para dentro da célula por meio de sideróforos (SPUHLER; ANDRÉS RENGIFO-HERRERA; PULGARIN, 2010). Estas moléculas são proteínas que possuem alta afinidade pelo íon férrico e atuam como agentes quelantes, se ligando no Fe^{3+} externo, aumentando sua solubilidade normalmente baixa em pH neutro, formando complexos estáveis, que são reconhecidos pelos receptores específicos na superfície das células bacterianas, permitindo que o ferro seja transportado para dentro da célula (RUALES-LONFAT et al., 2016). Uma vez dentro da célula, o Fe^{3+} é liberado e facilitando sua

redução a Fe^{2+} na presença do H_2O_2 e a produção de radical hidroxila. Além disso, o Fe^{3+} também pode se ligar a outras proteínas da membrana bacteriana e seus grupos carboxílicos terminais, e essa deposição leva a formação de complexos estáveis, e a luz UV age nas ligações desses complexos levando à oxidação direta da membrana e regeneração de Fe^{2+} e $\bullet\text{OH}$ próximos a membrana (SPUHLER; ANDRÉS RENGIFO-HERRERA; PULGARIN, 2010). O processo interno do foto-Fenton tem sido considerado importante quando comparado ao dano externo e é a principal força motriz da inativação nas bactérias e outros microrganismos (FENG et al., 2020; GIANNAKIS et al., 2016a).

Apesar da importância do processo interno, também ocorre o processo externo. Uma das ações do efeito bactericida dos radicais livres gerados nos processos Fenton e foto-Fenton é a perda de integridade da membrana celular (GIANNAKIS et al., 2016b). As membranas bacterianas apresentam lipopolissacarídeo em sua superfície, e o Fe^{3+} é capaz de se ligar nelas e através da transferência de carga ligante-metal entre o ferro e a superfície a ele ligada, ocorre sua redução para Fe^{2+} , e conseqüente oxidação da membrana, danificando a superfície externa bacteriana (GIANNAKIS et al., 2017).

Em resumo, o processo Fenton e foto-Fenton pode causar danos à membrana celular e aos componentes celulares das bactérias, o que pode levar à sua inativação ou morte. No entanto, os danos específicos podem variar dependendo das características da bactéria e das condições do processo por exemplo a *Klebsiella pneumoniae* é conhecida por apresentar resistência a processos oxidativos, pois possui uma cápsula polissacarídica, que é um dos seus principais fatores de virulência e pode proteger da ação de agentes oxidantes (HUANG et al., 2022). Por isso são importantes estudos de remoção de *K. pneumoniae* para avaliar seu potencial de resistência e de inativação dos processos oxidativos.

4. METODOLOGIA

4.1 LOCAIS DE ESTUDO

Para a coleta de efluentes foram selecionadas três estações de tratamento de esgoto (ETEs) localizadas no município do Rio de Janeiro. A ETE1 é uma estação municipal que atende 30 bairros da cidade do Rio de Janeiro, que apresenta um sistema de tratamento secundário com lodo ativado com vazão média de 2,5 m³/s (220 L/s). A ETE2 é um sistema de tratamento biológico de nível secundário com o processo de lodo ativado, variante aeração prolongada com vazão média de 512 m³/dia (5,92 L/s). E a ETE3 é uma estação exclusivamente hospitalar que apresenta um sistema de tratamento biológico, com o processo de Reatores de Biofilme em Leito Móvel (sigla MBBR, do inglês de “*Moving Bed Biofilm Reactor*”), seguido de desinfecção com hipoclorito de sódio (NaClO), com vazão média de 65 m³/dia (0,75 L/s) (ABRANTES, 2022).

4.2 COLETA, PROCESSAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

Foi realizada uma campanha de coleta nas três ETEs, em dois pontos distintos, antes do início do tratamento (efluentes brutos) e após o tratamento (efluentes tratados). Nas ETEs 2 e 3, a amostragem foi composta, sendo realizada uma coleta de 100 ml a cada 2h, começando às 8h e terminando às 16h, totalizando 500 ml de amostra. Na ETE 3 a amostragem foi simples, sendo realizada às 11h. As coletas foram realizadas em setembro e outubro de 2021.

As amostras foram armazenadas em frascos de vidro e transportadas em caixas térmicas para o Laboratório de Microrganismos de Referência/Setor de Bactérias e Arqueas (LMR/SBA) do Departamento de Microbiologia do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS/Fiocruz, os métodos analíticos empregados (Tabela 1) para caracterização das amostras seguiram os procedimentos preconizados de acordo com as especificações do *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* – 23^o Edição (APHA, 2017).

Tabela 1. Metodologias das análises físico-químicas das amostras de esgoto.

Parâmetro	Método
Temperatura	
Potencial hidrogeniônico (pH)	Sonda multiparamétrica
Potencial de oxirredução (Eh)	
Turbidez	Nefelométrico
Sólidos Suspensos Totais (SST)	Gravimétrico
Demanda Química de Oxigênio (DQO)	Oxidação em refluxo fechado
Fósforo Total	Ácido Ascórbico pela Oxidação em Meio Ácido
Nitrogênio Total	
Carbono Orgânico Total (COT)	Equipamento TOC-L da Shimadzu

Fonte: Própria autora, 2023.

4.3 ANÁLISE DE COLIFORMES TOTAIS E *Escherichia coli*

Para verificar a presença de coliformes totais e *Escherichia coli* nas amostras de efluentes bruto e tratado foi utilizado a técnica do Substrato Cromogênico Enzimático (kit Colilert®). Foram realizadas diluições seriadas do efluente nas concentrações 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8} , de cada diluição foram retiradas duas alíquotas de 100 ml e homogeneizadas com uma ampola do substrato Colilert®. O homogeneizado da amostra com o reagente foi introduzido nas cartelas Quanti-Tray™ contendo 97 cavidades cada, que foram seladas e incubadas a 37°C em 24 horas. Após a incubação, observa-se a coloração das cavidades nas cartelas, o aparecimento da coloração amarela indica positivo para o teste de coliformes totais e *E. coli* foi identificada pelo brilho azul quando iluminado por lâmpada de luz UV (254 nm) (MARQUEZI et al., 2010).

O resultado quantitativo de Coliformes Totais e *E. coli* foi obtido através da contagem de coloração nas cavidades das cartelas de incubação, esses números foram analisados de acordo com a tabela de conversão de valores padronizados de concentração fornecida pela IDEXX (IDEXX, 2017), no qual os valores são calculados através de uma estatística aplicada para determinar o NMP (Número Mais Provável)/100ml. Este método permite enumerar diretamente coliformes totais e *E. coli* simultaneamente, sendo sua faixa de detecção entre 1 microrganismo/100ml até 2×10^3 por 100 ml de amostra. O protocolo do teste é adaptado pelo *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2017).

4.4 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA

Os meios de cultura utilizados para isolamento foram preparados em laboratório, conforme as orientações do fabricante. No laboratório, 50 ml das amostras foram concentradas em sistema de filtração em membranas de celulose estéreis com poro de 0,22 μm . As membranas saturadas foram inoculadas, em duplicata, em caldo *brain heart infusion* (BHI) contendo três combinações de antimicrobianos (Tabela 2) e incubadas a 37 °C por 24 a 48 h. As concentrações dos antimicrobianos foram selecionadas conforme pontos de corte estabelecidos pelo EUCAST, 2021.

Tabela 2. Conjuntos de meios de cultura acrescidos de antimicrobianos.

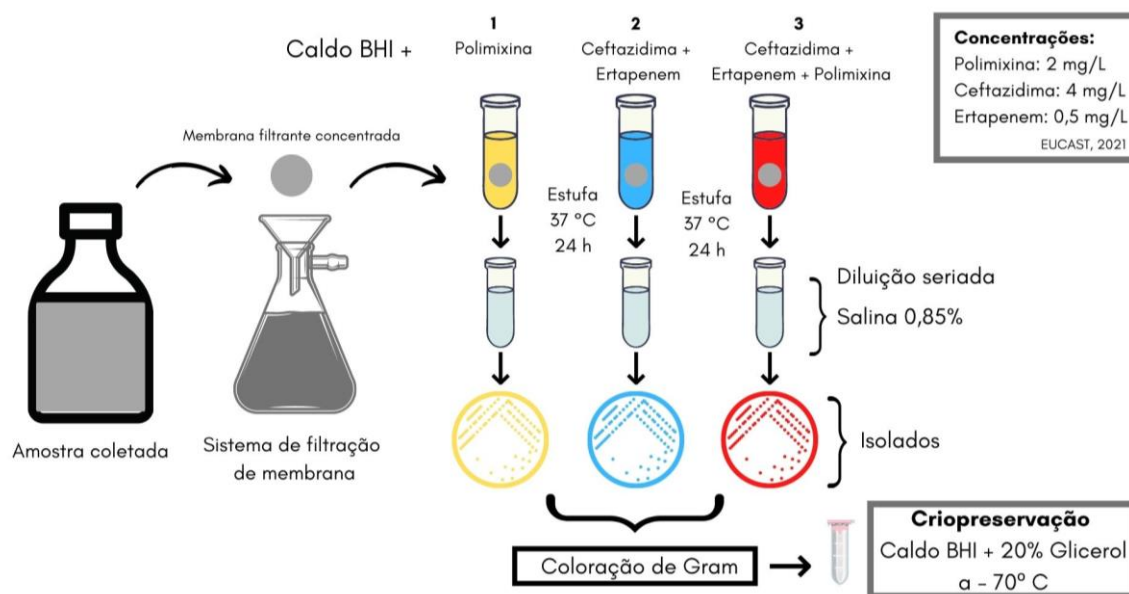
Conjunto	Conjunto de antimicrobianos
A	Polimixina (2 mg.L ⁻¹)
B	Ceftazidima (4 mg.L ⁻¹) + ertapenem (0,5 mg.L ⁻¹)
C	Ceftazidima (4 mg.L ⁻¹) + ertapenem (0,5 mg.L ⁻¹) + polimixina (2 mg.L ⁻¹)

Fonte: Própria autora, 2023.

Após o período de incubação, os caldos com crescimento foram diluídos em solução salina (NaCl) 0,85%, na concentração 10⁻¹, depois semeados em ágar EMB e incubadas na estufa a 37° ± 2°C por 24h para crescimento bacteriano, e posterior isolamento das colônias. Em seguida as características morfo-tintoriais foram analisadas pela coloração de Gram (DUQUE, 2012; WHITMAN *et al.*, 2015).

As bactérias isoladas foram repicadas e preservadas em caldo BHI acrescido de 20% de glicerol e estocadas a -80 °C, até os testes fenotípicos e genotípicos. Os isolados foram depositados na Coleção de Culturas de Vigilância em Saúde Única (CCVSU) do INCQS-Fiocruz. O esquema de isolamento é demonstrado na Figura 1.

Figura 1. Esquema do processamento das amostras, isolamento e preservação das bactérias.



Fonte: Própria autora, 2023.

Posteriormente, os isolados obtidos foram submetidos à identificação pela técnica de Espectrometria de massa *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight* (MALDI-TOF) (Bruker Daltonics), através da análise do perfil proteico total da colônia (EKSTRÖM et al., 1999). Para realização do MALDI-TOF, uma colônia de bactérias é colocada em uma matriz (lâmina especial com ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico) que sofre a incidência de um feixe de laser até haver uma ionização. Com a pulverização, de acordo com a carga molecular e o tamanho das proteínas, se estabelece um espectrograma de massa e a identificação das espécies bacterianas é confirmada através da lista de picos proteicos gerada, que é comparada diretamente com a lista de picos dos espectros de referência integrada ao sistema do MALDI-TOF (FREIWALD; SAUER, 2009). Este método foi realizado em parceria com o Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica (LIMM) na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

4.5 AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

4.5.1 Teste de disco-difusão

O perfil de sensibilidade aos antimicrobianos foi determinado através do teste de difusão em ágar. Para o teste, as colônias foram semeadas em ágar nutriente. A partir desse meio, uma alçada de colônias foi transferida para uma solução salina e a suspensão foi comparada, através do equipamento Densichek (bioMérieux), com o padrão de turvação 0,5 da escala de

McFarland, que equivale a cerca de $1,5 \times 10^8$ UFC (unidades formadoras de colônia)/ml. Em seguida, foi realizada a semeadura em ágar *Müller-Hinton* e adicionados discos (OXOID™) impregnados com os antimicrobianos: amicacina (30 µg), aztreonam (30 µg), cefepime (30 µg), ceftazidima (10 µg), ciprofloxacina (5 µg), ertapenem (10 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg), piperacilina/tazobactam (36 µg), tetraciclina (30 µg), trimetoprim/sulfametoxazol (1,25/23,75 µg). As placas foram incubadas em estufa a $35^\circ \pm 2^\circ\text{C}$ por 24h. A leitura dos resultados e suas interpretações foram realizadas de acordo com os critérios do EUCAST (2022) para todos os antimicrobianos, exceto para tetraciclina, pois neste documento não tem padronização para este antimicrobiano, que foi de acordo com os critérios do CLSI, 2022. Como controles do teste foram utilizadas amostras *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *E. coli* ATCC 35218.

Os isolados que foram sensíveis a todos os antimicrobianos foram classificados como sensíveis, os que apresentaram resistência a no máximo um antimicrobiano foram classificados como Não-MDR (*multidrug-resistant*), os que apresentaram resistência a pelo menos um antimicrobiano de três classes distintas como MDR, os que apresentaram resistência a pelo menos um antimicrobiano em todas as classes, exceto ≤ 2 como XDR (*extensively drug-resistant*) e os que apresentaram resistência a todos os antimicrobianos testados como PDR (*pandrug-resistant*). Essa classificação foi adaptada de MAGIORAKOS et al., 2012.

4.5.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos β -lactâmicos

A determinação da concentração mínima inibitória (CIM) foi realizada através do teste epsilométrico, *E-test* (AB Biodisk), para os antimicrobianos ceftazidima e meropenem. Para o teste, a preparação das amostras e a semeadura em ágar *Müller-Hinton* foram efetuadas da mesma maneira do método de difusão em ágar, mencionado anteriormente no item 5.5.1. Entretanto, ao invés dos discos de difusão, foram empregadas no meio, tiras de *E-test*® que possuem concentrações distintas de cada antimicrobiano, possibilitando a determinação da CIM para cada antimicrobiano. Como controle negativo do teste, foram utilizadas as amostras *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *E. coli* ATCC 35218, e como controle positivo a cepa *K. pneumoniae* ATCC BAA1705. A leitura e interpretação dos resultados foi feita de acordo com os critérios do EUCAST (2022).

4.5.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) da polimixina

Para a determinação da concentração inibitória mínima da polimixina B foi utilizada a metodologia da diluição em microplacas (padrão-ouro) através do teste comercial Policimbac®

(PROBAC). Policimbac é um teste de microdiluição que consiste em um painel com doze poços por amostra. Os poços de número um ao número dez possuem caldo *Müller-Hinton* cátion ajustado desidratado com concentrações decrescentes de polimixina B e os poços onze e doze são destinados, respectivamente, para o controle positivo (apenas solução bacteriana) e negativo do teste. Isolados bacterianos e a cepa controle (*Escherichia coli* ATCC 25922), foram semeadas em ágar *Müller-Hinton* e incubadas de 18 a 24 h (DALMOLIN et al., 2020).

No dia da execução do teste foram separados três tubos de vidro estéreis para cada isolado. No tubo 1 foi preparada uma suspensão bacteriana em cloreto de sódio (NaCl) 0,85% na escala 0,5 McFarland (10^8 UFC mL⁻¹). No tubo 2 foi feita uma diluição de 1:100 a partir do tubo 1, resultando uma suspensão de 10^6 UFC mL⁻¹. Por último, no tubo 3 foi feita uma diluição de 1:10 a partir do tubo 2, resultando uma suspensão de 10^5 UFC mL⁻¹. A partir da suspensão bacteriana do tubo 3, foi pipetado 100 µL nos poços de número 11 à 1 do painel do teste Policimbac® que então foram incubados por 24 horas em estufa a $35^\circ \pm 2^\circ\text{C}$ (DALMOLIN et al., 2020).

Após o tempo de incubação, uma gota de solução reveladora foi adicionada em todos os poços de cada painel que então foram incubados por mais 20 min a $35^\circ \pm 2^\circ\text{C}$. As concentrações com crescimento bacteriano ficaram com coloração avermelhada (DALMOLIN et al., 2020). O valor da CIM de cada isolado foi determinada como o primeiro poço no qual não houve crescimento bacteriano visível, sendo considerados sensíveis os isolados que apresentaram $\text{CIM} \leq 2 \mu\text{g mL}^{-1}$ e resistentes os isolados com $\text{CIM} > 2 \mu\text{g mL}^{-1}$, de acordo com ponto de corte da polimixina B do EUCAST (2021).

4.6 DETECÇÃO DA ATIVIDADE DE CARBAPENEMASES

Para a detecção da atividade de carbapenemases foi utilizado o kit Carbapenembac® (PROBAC). O teste foi realizado a partir de repiques no meio de cultivo ágar *Müller-Hinton* com culturas incubadas por 24h. A preparação do inóculo foi feita a partir de uma suspensão equivalente a turvação de 10 na escala de McFarland num tubo com solução seletiva que compõe o Kit Carbapenembac®. Inoculou-se 150 µL da suspensão numa fita, que possuem carbapenêmicos em sua composição em concentração adequada para que as enzimas (carbapenemases) provoquem a hidrólise destes compostos. A fita com o inóculo foi incubada entre $35^\circ \pm 2^\circ\text{C}$ por 1h dentro de uma placa de petri tampada. Retirou-se a placa com as fitas da estufa e após a adição de 200µL da Solução de Iodo Especial que confere uma cor roxa à fita, a placa foi tampada e armazenada em temperatura ambiente (MARTINO et al., 2015).

A confirmação de cepa carbapenemase positiva foi feita em 1h, onde nas bordas das fitas aparece inicialmente uma cor amarela esbranquiçada, o que indica hidrólise dos carbapenêmicos presentes na fita. A hidrólise será evidenciada até sumir quase totalmente a cor roxa, ficando apenas a amarela. Esse tempo pode variar de 15 a 60 min após a adição da solução de Iodo Especial. As fitas embebidas com cepas negativas permanecem de cor roxa podendo apresentar leve cor branca nas bordas, dessa forma, a cada 10 testes com as cepas selecionadas, foi realizado o controle negativo com a cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 e como controle positivo a cepa *K. pneumoniae* ATCC BAA1705 (KPC+) (MARTINO et al., 2015).

4.7 DETECÇÃO DE DETERMINANTES GENÉTICOS DE RESISTÊNCIA

A extração do DNA genômico foi realizada utilizando o *Purelink Genomic DNA Mini Kit* (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. A qualidade e a quantidade de DNA foram medidas no espectrofotômetro NanoDrop 2000C (NanoDrop Technologies, Willmington, DE), e todas as amostras foram diluídas para atingirem a concentração final de 10 ng/ μ L. Todas as amostras de DNA foram armazenadas a -20 °C.

4.7.1 Genes que codificam carbapenemases

A detecção dos genes de resistência *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}* e *bla_{GES}* foi realizada pela HRM-qPCR (MONTEIRO et al., 2012a). O volume final da mistura da reação foi de 10 μ L nas seguintes condições: 0,2-0,4 μ M de cada primer (Tabela 3), 1X *high-resolution melt* (HRM) PCR Master Mix MeltDoctor™ (Applied BioSystems), 20 ng de DNA alvo e água ultrapura (*Nuclease-Free Water* – Ambion) completando o volume. A reação foi realizada em equipamento QuantStudio 7 PCR System (ThermoFisher Scientific, Cleveland, OH, EUA) nas condições de termociclagem: 95 °C por 10 min; 35 ciclos de 95 °C por 20 s, 55 °C por 45s e 72 °C por 30 s; e a etapa de *melt curve* (de 65 °C gradualmente aumentando 0,025 °C/s a 95°C, com aquisição de dados de fluorescência a cada 1s) (MONTEIRO et al., 2012b).

A detecção do gene *bla_{BKC}* foi realizada por PCR convencional previamente descrita por NICOLETTI et al., 2015. O volume final da mistura da reação foi de 25 μ L nas seguintes condições: 0,2 μ M de cada primer (Tabela 3), 1X GotTaq G2 Mastermix (Promega), 20 ng de DNA alvo e água ultrapura (*Nuclease-Free Water* – Ambion) completando o volume. A reação foi realizada em termociclador nas condições: 95 °C por 5 min; 30 ciclos de 95 °C por 1 min., 56 °C por 30s e 72 °C por 1 min. e alongamento final a 72 °C por 10 min. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, por 1 h a 60 V no tampão Tris-

Acetato-EDTA (TAE) 1X e revelado com GelRed (BIOTIUM). Foi utilizado o 100 bp DNA ladder (Invitrogen) como padrão de tamanho molecular. Após a eletroforese, a imagem do gel foi visualizada pelo fotodocumentador L-Pix Touch Transilluminator (Loccus).

Foi utilizada como controle negativo a cepa de referência *E. coli* (ATCC 25922) e como controles positivos as cepas *K. pneumoniae* INCQS628 (*bla_{KPC}*), *K. pneumoniae* CCBH 24217 (*bla_{NDM}*), *K. pneumoniae* CCBH 24264 (*bla_{OXA-48}*), *P. aeruginosa* CCBH 20008 (*bla_{VIM}*), *P. aeruginosa* CCBH 24208 (*bla_{IMP}*), *P. aeruginosa* CCVSU 4479 (*bla_{GES}*), *E. coli* BL21+pET-26BKC-1 (*bla_{BKC}*) e água livre de nucleases como branco da reação.

Tabela 3. Iniciadores específicos para detecção dos genes codificadores de carbapenemases.

Gene alvo	Sequência do iniciador (5'-3')	Tamanho do fragmento (pb)	Referências
<i>bla_{NDM}</i>	F: TTGGCCTTGCTGTCCTTG	82	MONTEIRO et al., 2012
	R: ACACCAGTGACAATATCACCG		
<i>bla_{KPC}</i>	F: TCGCTAAACTCGAACAGG	785	
	R: TTA CTGCCCCGTTGACGCCCAATCC		
<i>bla_{IMP}</i>	F: GAGTGGCTTAATTCTCRATC	120	
	R: AACTAYCCAATAYRTAAC		
<i>bla_{VIM}</i>	F: GTTTGGTTCGCATATCGCAAC	382	
	R: AATGCGCAGCACCAGGATAG		
<i>bla_{GES}</i>	F: CTATTACTGGCAGGGATCG	594	
	R: CCTCTCAATGGTGTGGGT		
<i>bla_{OXA-48}</i>	F: TGTTTTTGGTGGCATCGAT	177	
	R: GTAAMRATGCTTGGTTCGC		
<i>bla_{BKC}</i>	F: ACATAATCTCGCAACGGGCG	941	NICOLETTI et al., 2015
	R: TCGCCGGTCTTGTTCATCAC		

Fonte: Própria autora, 2023.

4.7.2 Genes codificadores fosfoetanolamina transferase

A detecção dos genes *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* e *mcr-5* foi realizada pela PCR convencional (REBELO et al., 2018). O volume final da mistura da reação foi de 25 µL nas seguintes condições: 0,2 µM de cada primer (Tabela 4), 1X GoTaq G2 Mastermix (Promega), 20 ng de DNA alvo e água ultrapura (*Nuclease-Free Water* – Ambion) completando o volume. Foi utilizada como controle negativo a cepa de referência *E. coli* (ATCC 25922) e como controles positivos as cepas *E. coli* CCBH 20180 (*mcr-1*), *Acinetobacter baumannii* CCVSU 7523 (*mcr-3*), *E. coli* CCBH 25606 (*mcr-5*) e água livre de nucleases como branco da reação.

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, por 1 h a 60 V no tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X e revelado com GelRed (BIOTIUM). Foi utilizado o 100 bp DNA *ladder* (Invitrogen) como padrão de peso molecular. Após a eletroforese, a imagem do gel foi visualizada pelo fotodocumentador L-Pix Touch Transilluminator (Loccus).

Tabela 4. Iniciadores específicos para detecção dos genes codificadores de fosfoetanolaminas transferases

Gene alvo	Sequência do iniciador (5'-3')	Tamanho do fragmento (pb)	Referência
<i>mcr-1</i>	F: AGTCCGTTTGTCTTGTGGC	320	REBELO et al., 2018
	R: AGATCCTTGGTCTCGGCTTG		
<i>mcr-2</i>	F: CAAGTGTGTTGGTCGCAGTT	715	
	R: TCTAGCCCCGACAAGCATAACC		
<i>mcr-3</i>	F: AAATAAAAATTGTTCCGCTTATG	929	
	R: AATGGAGATCCCCGTTTTT		
<i>mcr-4</i>	F: TCACTTTCATCACTGCGTTG	1116	
	R: TTGGTCCATGACTACCAATG		
<i>mcr-5</i>	F: ATGCGGTTGTCTGCATTTATC	1644	
	R: TCATTGTGGTTGTCCTTTTCTG		

Fonte: Própria autora, 2023.

4.8 ANÁLISE DA RELAÇÃO CLONAL DE *Klebsiella pneumoniae*

Do total de 21 cepas identificadas como *Klebsiella pneumoniae*, foram selecionadas 18 cepas *Klebsiella pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos (KPRC) (cepas *K. pneumoniae* resistentes a pelo menos um dos carbapenêmicos testados neste estudo) com perfis de resistência MDR e XDR para análise de relação clonal através da técnica de *Multilocus Sequence Type* (MLST). Foram realizadas amplificações por PCR de fragmentos internos de sete genes *housekeeping* (*gapA*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *rpoB* e *tonB*) de acordo com DIANCOURT et al., 2005, e sequenciados em duplicata com terminadores fluorescentes (BigDye; Applied Biosystems, Foster City, CA) no aparelho SeqStudio Genetic Analyzer (Thermofisher) (CUZON et al., 2010). O *Sequencing Analysis Software* v7.0 (Thermofisher) foi utilizado para avaliar a qualidade das leituras geradas. Os nucleotídeos ambíguos foram removidos com base no índice de qualidade e as sequências com *score* inferior a 30 foram removidas. A montagem das sequências de alta qualidade foi realizada no *software* BioEdit Sequence Alignment Editor, v7.2.5. As sequências foram depositadas no banco de dados

Klebsiella Sequence Typing pelo Pasteur Institute MLST Database (<http://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/>) para determinar os números alélicos e o *Sequence Typing* (ST). Para determinação dos Complexos Clonais (CC) foi definido o critério com base em dois ST diferentes compartilhando pelo menos quatro alelos idênticos.

A partir da definição dos STs foi realizada a construção de uma árvore *Minimal Spanning Tree* (MST) pelo *Pasteur Institute MLST Database* para avaliar a relação entre os STs encontrados neste estudo, com base nos dados das fontes de isolamento de todos os isolados depositados no Brasil, incluindo os isolados que foram depositados deste estudo.

4.9 REMOÇÃO DE *Klebsiella pneumoniae* E GENE *bla_{KPC}*

4.9.1 Materiais e reagentes

Foi utilizada água ultrapura (Milli Q Plus, Millipore) para a preparação da solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂ 30% ACS, ISO Merck) para as reações. O catalisador foi adquirido de forma natural, sendo um produto residual dos processos de uma indústria de mineração, cedido pelo *Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas* (CIEMAT), Plataforma Solar de Almería, Espanha.

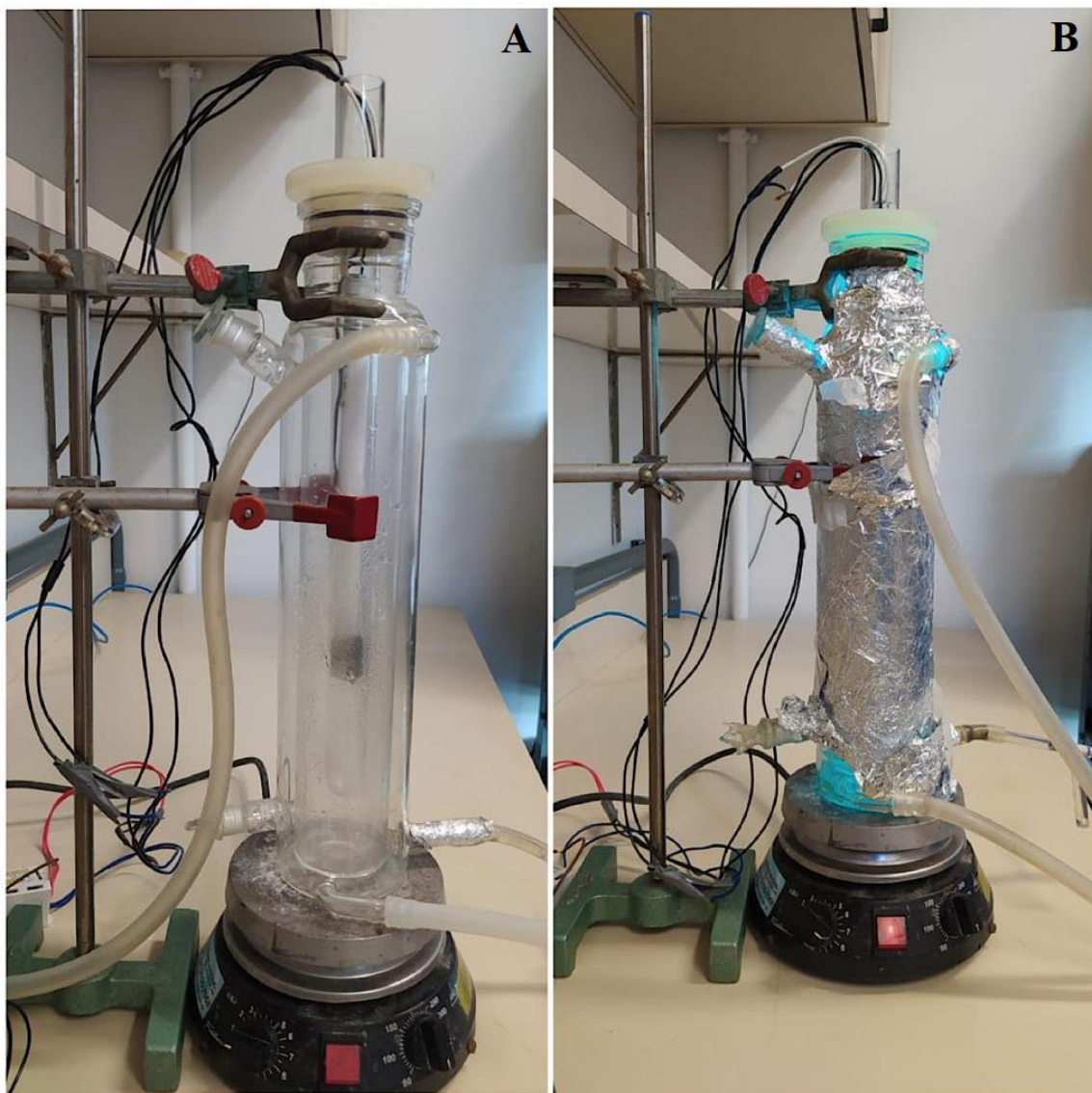
Para a inoculação da bactéria foram utilizadas a solução salina 0,85% feita com cloreto de sódio e autoclavada a 121 °C por 15 min, e o efluente sintético cuja formulação foi: cloreto de sódio (1,4 mg.L⁻¹), extrato de carne (34,7 mg.L⁻¹), fosfato monobásico de potássio (5,6 mg.L⁻¹), peptona de caseína (34,7 mg.L⁻¹) e ureia (1,4 mg.L⁻¹). Para as determinações analíticas de peróxido de hidrogênio foi utilizado metavanadato de amônio (NH₄VO₃P.A., Dinâmica).

4.9.2 Caracterização do resíduo da mineração e reator

Como o resíduo foi obtido de forma natural, ou seja, sem necessidade de tratamento, ele não foi sintetizado ou passou por algum processo de tratamento. A caracterização do catalisador realizada por REIS, 2022, revelou elevado percentual de ferro (69,97%) pela análise elementar EDX e a predominância da espécie Fe⁺² pela análise XPS. O sistema reacional utilizado para os experimentos foi formado por um reator de vidro cilíndrico fechado (total volume = 500 mL) com uma área iluminada de 179 cm² (Figura 2). Uma lâmpada foi colocada na linha central dentro de um bulbo de quartzo para evitar o contato com a amostra, agitadores magnéticos foram posicionados na parte inferior do reator. A lâmpada utilizada foi de 6W (21 cm de comprimento e 2,6 cm de diâmetro), emitindo radiação na UVA (Black Light – Philips F6T5/BL faixa de 350 a 400 nm com pico em 356 nm e 6.80 mW cm⁻²). Para desinfecção do

reator, uma solução de 500 ml de peróxido de hidrogênio 30% (340 mg.L^{-1}) (ZHANG et al., 2016) foi colocada no reator na presença da irradiação UVA e sob agitação magnética por uma hora. Após esse período, o reator foi limpo com água Mili-Q para retirada do residual de H_2O_2 , e colocado por 20 min exposto em luz UV na cabine de segurança biológica. A Figura 2 mostra em A o reator com a lâmpada UVA desligada e em B o reator com a lâmpada UVA acesa, com papel alumínio de proteção em volta.

Figura 2. (A) Reator de bancada com a lâmpada de radiação UVA desligada. (B) Reator com a luz UVA ligada com papel alumínio de proteção.



Fonte: Própria autora, 2023.

4.9.3 Preparo da cultura bacteriana para inoculação na matriz

Foi utilizada solução salina 0,85% nos experimentos de otimização dos sistemas de desinfecção, a fim de preservar a integridade da célula bacteriana. A cepa bacteriana selecionada *Klebsiella pneumoniae* CCVSU 7173 foi cultivada em caldo BHI e incubada a 37°C por 24 horas. Um mL do caldo com crescimento foram centrifugados a 14.000 rpm por 10 min. O *pellet* bacteriano foi ressuscitado em 1 mL de solução salina 0,85%, e aproximadamente 300 µL da suspensão bacteriana foram inoculadas em 5 mL de salina, e a suspensão foi comparada, através do equipamento Densichek (bioMérieux), com o padrão de turvação 0,5 da escala de McFarland, que equivale a cerca de $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹. Cinco mL da suspensão foram inoculadas em 500 mL de salina 0,85%, com a finalidade de atingir uma densidade final de 10^4 - 10^6 UFC mL⁻¹.

4.9.4 Otimização dos processos oxidativos

Alguns fatores influenciam na eficiência dos processos que envolvem as reações de Fenton e foto-Fenton, dentre eles podemos citar a faixa de pH. O pH ideal para desinfecção depende de outros fatores como da natureza do catalisador, do oxidante utilizado, e da concentração bacteriana (GARCÍA-MUÑOZ et al., 2016). Alguns estudos demonstram uma boa desinfecção em pH ácido (AHMED et al., 2021a; CLARIZIA et al., 2017), porém esta faixa de pH apresenta uma desvantagem pois é necessário neutralizar o efluente antes de despejar nos corpos hídricos receptores, porém estudos também demonstram melhores desempenhos em processos de desinfecção bacteriana em pH neutro (GARCÍA-MUÑOZ et al., 2022; O'DOWD; PILLAI, 2020), que é o pH natural dos efluentes em geral, sem a realização de um processo adicional para o despejo do efluente. Devido a isso, todos os ensaios de degradação bacteriana foram realizados em pH neutro (próximo a 7).

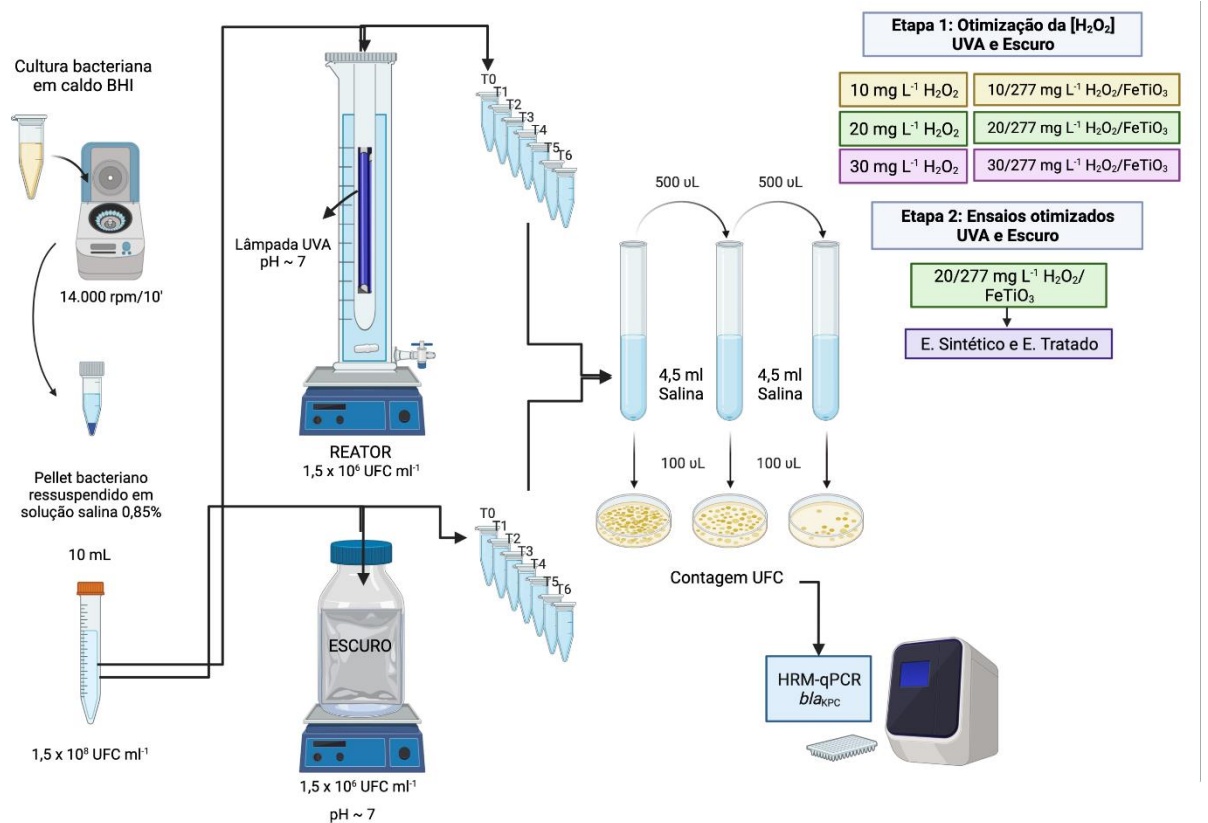
A concentração de peróxido de hidrogênio utilizada também é outro fator que influencia na eficiência dos processos de Fenton, e como concentrações muito baixas podem não ser suficientes e seu excesso pode prejudicar a desinfecção (AGUILAR et al., 2018), para avaliar a concentração ideal de degradação da *K. pneumoniae* XDR e do gene *bla*_{KPC}, a fim de otimizar o processo, foram testadas três diferentes concentrações de H₂O₂ (10, 20 e 30 mg.L⁻¹) já testadas anteriormente em outros estudos (FERRO et al., 2017; GIANNAKIS et al., 2016b), e mantendo a concentração do catalisador de 277 mg.L⁻¹, que já foi otimizada anteriormente como uma concentração ideal deste mesmo catalisador na degradação simultânea dos antimicrobianos ciprofloxacino, sulfametoxazol e tetraciclina (REIS, 2022). Doses do catalisador acima de 1 g L⁻¹ no sistema apresentam problemas de turbidez e não permite a exposição adequada à radiação

(GARCÍA-MUÑOZ et al., 2022). Outro fator importante para a aplicação do processo Fenton é a composição da matriz aquosa, pois uma matriz com muitos sais e matéria orgânica presentes podem afetar o desempenho dos sistemas de fotocatalise, por isso é importante realização de experimentos em matrizes aquosas diferentes (AGUILAR et al., 2018).

Os experimentos para otimização das concentrações de peróxido de hidrogênio em solução salina 0,85% foram realizados nas combinações de ensaios: na ausência do catalisador e H₂O₂ (fotólise, apenas na presença da luz UVA); catalisador (277 mg.L⁻¹) no escuro, para verificar a adsorção; H₂O₂ no escuro (nas concentrações 10, 20 e 30 mg.L⁻¹); peróxido de hidrogênio e catalisador no escuro (H₂O₂/catalisador: 10/277 mg.L⁻¹, 20/277 mg.L⁻¹, 30/277 mg.L⁻¹). Os experimentos com luz UVA foram realizados com o catalisador (catalisador/UV 277 mg.L⁻¹); H₂O₂/UV (nas concentrações 10, 20 e 30 mg.L⁻¹); H₂O₂/catalisador/UV (10/277 mg.L⁻¹, 20/277 mg.L⁻¹, 30/277 mg.L⁻¹). As matrizes aquosas testadas foram agitadas magneticamente durante o ensaio, a temperatura foi constante em torno de 25 °C e em pH neutro (aproximadamente 7). Para cada ensaio, as amostras foram retiradas em duas alíquotas de 1 mL variando o tempo de exposição de 0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 min. Para possível contagem de UFC em placa, foi realizada diluição seriada dessas alíquotas, sendo transferidas 500 µL para outro tubo estéril contendo 4,5 ml de solução salina 0,85%, obtendo a diluição 10⁻¹, e foi realizada da mesma maneira para a diluição 10⁻². Para quantificação das UFC mL⁻¹ foi realizada a técnica “*Spread Plate*”. De cada diluição foram transferidos 100 µL para uma placa contendo ágar BHI e espalhadas com uma alça de Drigalski estéril, até que o meio a absorvesse completamente. As placas de Petri foram invertidas e incubadas a 37 °C por 24 horas, e em seguida realizada a contagem de colônias nas placas através de um equipamento contador de colônias e quantificação em UFC mL⁻¹.

Esquema geral dos experimentos de remoção da *K. pneumoniae* CCVSU 7173 e o gene *bla*_{KPC} são representados na Figura 3.

Figura 3. Esquema geral dos experimentos de remoção da *K. pneumoniae* CCVSU 7173 e o gene *bla_{KPC}*.



Fonte: Própria autora, 2023.

4.9.5 Avaliação dos processos oxidativos otimizados em efluente sintético e tratado

Após otimização dos ensaios em solução salina 0,85%, foram realizados os ensaios no escuro e UVA/catalisador/H₂O₂ (277 mg.L⁻¹/20 mg.L⁻¹) em efluente sintético e efluente tratado, conforme foi descrito no item anterior. O efluente tratado sintético foi formulado para manter uma DQO média de 50 mg.L⁻¹, equivalente a do efluente tratado coletado ETE1, onde foi recuperada a cepa CCVSU 7173 utilizada nos experimentos, para manter a reprodutibilidade. A fim de realizar a descontaminação o efluente sintético foi filtrado em membrana 0,22 µm e o efluente tratado foi autoclavado a 121 °C por 15 min.

As análises físico-químicas temperatura, pH, demanda química de oxigênio (DQO), amônia (NH₃), amônio (NH₄⁺) e fosfato (PO₄³⁻) dos efluentes sintético e tratado foram realizadas por análise colorimétrica através do kit de reagentes HANNA e medidas em espectrofotômetro.

4.9.6 Detecção do gene *bla_{KPC}* no isolado após o tratamento

Após a contagem das colônias, o DNA dos isolados foi extraído, conforme descrito no item 4.7, e a detecção da presença do gene *bla_{KPC}* foi realizada por qPCR conforme descrito no item 4.7.1.

4.9.7 Análise do consumo de peróxido de hidrogênio

Ao longo das reações, 5 ml de amostras foram coletadas para realização do monitoramento das concentrações de peróxido de hidrogênio, ferro ferroso e ferro total que foram medidas por métodos colorimétricos. O monitoramento do peróxido de hidrogênio foi baseado no uso da solução de metavanadato de amônio, que forma um complexo laranja estável com o H₂O₂ detectado por medições de absorvância em 458 nm em um espectrofotômetro (PerkinElmer, EUA) e foi linearmente correlacionada com a concentração de H₂O₂ na faixa de 5–110 mg.L⁻¹ (NOGUEIRA; OLIVEIRA; PATERLINI, 2005).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DAS AMOSTRAS

As amostras dos efluentes bruto e tratado coletados foram caracterizados por meio de parâmetros físico-químicos e microbiológicos (Tabela 5).

Tabela 5. Parâmetros físico-químicos e microbiológicos dos efluentes bruto e tratado analisados.

Parâmetros	ETE1		ETE2		ETE3	
	Efluentes		Efluentes		Efluentes	
	Bruto	Tratado	Bruto	Tratado	Bruto	Tratado
Temperatura (°C)	22,5	21,1	23,2	22,5	23,8	23,1
pH	7,4	6,2	6,9	7,3	7,8	7,2
Potencial de oxirredução (Eh) (mV)	-27,1	38,1	-5,6	-30,5	-55,3	-57
Turbidez (NTU)	19,2	1,9	79,7	3,4	109	15
Sólidos Suspensos Totais (mg.L ⁻¹)	52	8,1	218	27,4	284,5	245
Demanda Química de Oxigênio (mg.L ⁻¹)	125,4	47	281,8	19	550,9	84
Carbono Total (mg.L ⁻¹)	37,9	25,2	85,2	7,7	242,3	122,6
Nitrogênio Total (mg.L ⁻¹)	20,3	7,2	23,3	4,0	134,4	86,6
Fósforo Total (mg.L ⁻¹)	2,2	0,9	5,3	0,6	9,1	9
Coliformes totais (NMP.100ml ⁻¹)	9,6.10 ⁶	6,09.10 ⁵	1,01.10 ⁷	1,08.10 ¹	1,01.10 ⁶	6,05.10 ¹
<i>Escherichia coli</i> (NMP.100ml ⁻¹)	3,2.10 ⁶	5,1.10 ⁴	9,1.10 ⁶	4,1	9,1.10 ⁵	5,31.10 ¹

Fonte: Própria autora, 2023.

A temperatura variou de 21°C a 23°C em todos os pontos de coleta. O pH dos efluentes coletados variaram entre 6,2 e 7,8. O potencial de oxirredução (Eh) apresentou caráter redutor em todos os efluentes, exceto para o efluente tratado da ETE1, que apresentou caráter oxidante, que pode ser devido a presença de poluentes que contêm produtos químicos oxidantes no sistema de esgotos municipal ou pelo excesso de oxigênio dissolvido na etapa de aeração do lodo ativado. A turbidez foi reduzida em mais de 80% em todos os efluentes tratados, sendo a maior redução na ETE2 (96%), provavelmente associada ao processo de aeração prolongada desta ETE. Os sólidos suspensos totais foram reduzidos em mais de 80% nos efluentes tratados

para as ETEs 1 e 2, porém para a ETE3, a redução foi de apenas 13%. O efluente tratado da ETE2 apresentou os maiores percentuais de redução para os parâmetros demanda química de oxigênio (93,2%), carbono total (91%), nitrogênio total (83%) e fósforo total (89%). De acordo com a resolução CONAMA nº 430/2011 (CONAMA 430/11, 2011), que estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes em corpos d'água superficiais no Brasil, incluindo o despejo de esgoto tratado, os parâmetros listados temperatura e pH de todos os efluentes tratados estão dentro dos limites preconizados pela lei.

Em relação aos parâmetros microbiológicos, a ETE1 obteve a redução de 1 log de coliformes totais e de 2 logs para *E. coli* nos efluentes tratados. A ETE2 apresentou a redução de 6 logs para coliformes totais e *E. coli*. Enquanto isso, a ETE3 alcançou uma redução de 4 logs de coliformes totais e *E. coli* nos efluentes tratados. Segundo VON SPERLING, 2017, a redução de coliformes totais e *E. coli* no tratamento de esgotos pode variar de acordo com o tipo de tratamento aplicado, sendo recomendável uma média de 2 a 6 logs de redução nos efluentes tratados para garantir a segurança biológica do corpo hídrico receptor. Desta maneira, o tratamento da ETE1 não alcançou o nível de redução de coliformes totais recomendado.

O estudo de AJONINA et al., 2015, observou uma concentração de coliformes totais de $7,8.10^5$ nos efluentes brutos e de $3,6.10^3$ nos efluentes tratados, e de *E. coli* de $3,5.10^5$ nos efluentes brutos e de $2,5.10^3$ nos efluentes tratados de uma ETE municipal de tratamento secundário na Alemanha, em ambos representando uma redução de 2 logs, equivalente a redução observada na ETE1 do presente estudo. No estudo de CHAGAS et al., 2011, foram encontradas altas concentrações média de coliformes totais de $7,4 \times 10^5$ nos efluentes brutos e de $0,3 \times 10^5$ nos efluentes tratados e de coliformes fecais uma concentração média de $0,8 \times 10^5$ nos efluentes brutos e de $0,07 \times 10^5$ nos efluentes tratados de uma ETE hospitalar com desinfecção do efluente final por cloração, podendo observar uma menor redução de coliformes em relação a ETE hospitalar do presente estudo. O estudo de HALLER et al., 2018, encontrou altas concentrações de *E. coli* onde a concentração média foi de $3,5 \times 10^6$ NMP 100ml⁻¹ em efluentes brutos de uma ETE hospitalar, equivalente a concentração encontrada no presente estudo.

Ao avaliar a eficiência dos tratamentos em relação aos parâmetros analisados neste estudo, foi observado que a ETE2 apresentou maior eficiência em relação ao tratamento das ETEs 1 e 3. Apesar disso, é importante destacar a diferença de tamanho e vazão entre as ETEs, enquanto a primeira trata cerca de 220 L/s a segunda trata 6 L/s e a terceira 1 L/s. A ETE1 utiliza o processo de lodos ativados, com câmaras seletoras iniciais, com digestão anaeróbia e desidratação mecânica do lodo por meio de centrífugas. A ETE2 apresenta um sistema de

tratamento biológico de nível secundário com o processo de lodo ativado, variante de ação prolongada, que é uma tecnologia de tratamento de efluentes que utiliza um reator biológico, no qual se promove a aeração prolongada do efluente com a finalidade de alcançar altas concentrações de microrganismos suspensos no reator (TCHOBANOGLIOUS; BURTON; DAVID STENSEL, 2014). Esse processo é realizado com o objetivo de aumentar a eficiência de remoção de matéria orgânica e de nutrientes presentes no efluente, além da capacidade de adaptação a diferentes tipos de efluentes (CHEN et al., 2020).

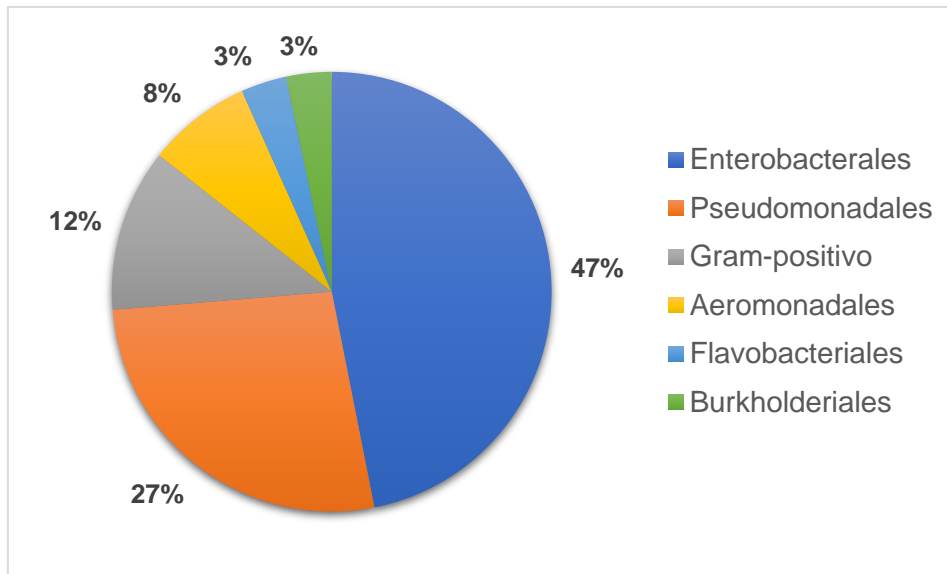
Em seguida, a ETE3 apresentou o segundo maior nível de eficiência em relação aos parâmetros avaliados, esta ETE possui um sistema de tratamento biológico secundário com o processo MBBR, seguido de desinfecção terciária com hipoclorito de sódio.

O processo MBBR é um método de tratamento de águas residuais que utiliza biomédeas, que são pequenas mídias de suporte, para criar biofilmes onde microrganismos se fixam. Esses biofilmes, desenvolvidos nas biomédeas em suspensão na água, degradam eficazmente poluentes presentes nas águas residuais (MADAN; MADAN; HUSSAIN, 2022). O MBBR aumenta a capacidade de tratamento devido à grande área superficial das biomédeas, resultando em uma maior concentração de microrganismos e uma eficiente remoção de contaminantes. Esse método é usado em estações de tratamento para remover matéria orgânica, nitrogênio e fósforo das águas residuais (MAHTO; DAS, 2022). A utilização em conjunta dos tratamentos de efluentes com MBBR e hipoclorito de sódio é um processo utilizado nos últimos anos, principalmente em efluentes hospitalares (MORAES, 2017). O MBBR remove a maior parte da matéria orgânica e outros poluentes da água residual, enquanto o hipoclorito de sódio é adicionado no final do processo para desinfetar o efluente tratado e eliminar microrganismos patogênicos (HU et al., 2013).

5.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *Enterobacterales*

Foram isoladas 184 cepas das seis amostras de efluentes brutos e tratados coletadas das três ETEs. Essas cepas foram identificadas e classificados entre as Gram-negativas nas seguintes ordens: 53% (98/184) *Enterobacterales*, 30% (56/184) *Pseudomonadales*, 9% (16/184) *Aeromonadales*, 4% (7/184) *Flavobacterales* e 4% (7/184) *Burkholderiales* (Figura 4).

Figura 4. Total de isolados identificados classificados pelas ordens bacterianas.

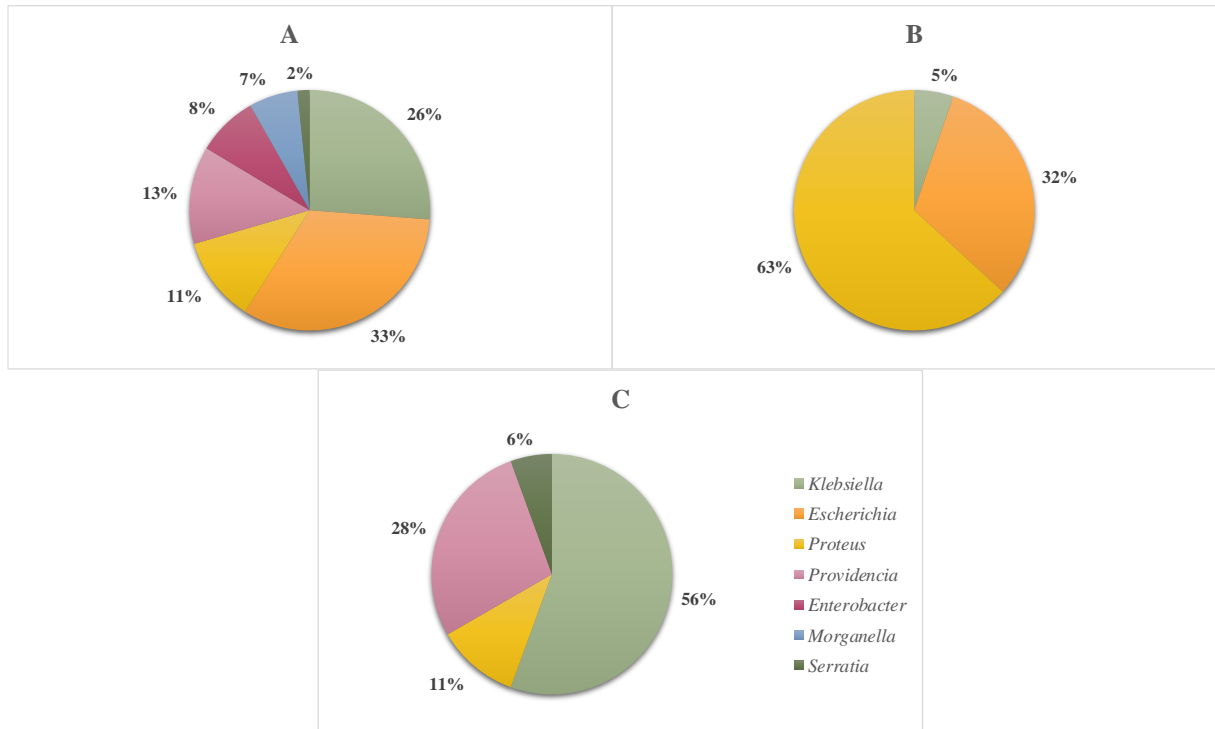


Fonte: Própria autora, 2023.

Das 98 cepas da ordem *Enterobacterales*, dos efluentes brutos e tratados, um total de 62,2% (61/98) foi isolado da ETE1, 19,4% (19/98) da ETE2 e 18,4% (18/98) da ETE3. Do total de cepas da ordem *Enterobacterales*, foram identificados sete gêneros diferentes: *Klebsiella* (27,5%; 27/98), *Escherichia* (26,5%; 26/98), *Proteus* (21,5%; 21/98), *Providencia* (13,3%; 13/98), *Enterobacter* (5,1%; 5/98), *Morganella* (4,1%; 4/98) e *Serratia* (2%; 2/98). Dentre as *Enterobacterales*, 46% (45/98) foram obtidas de efluentes tratados (ET).

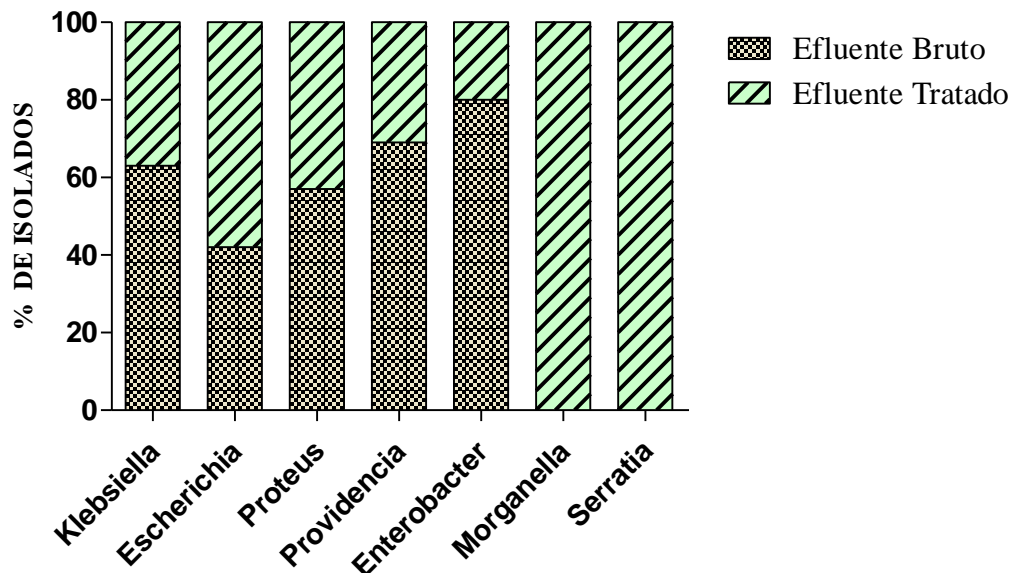
Do total de cepas isoladas da ETE1, os gêneros mais frequentes foram *Escherichia* (32,8%; 20/61), seguida de *Klebsiella* (26,2%; 16/61) (Figura 5(A)), e do total de cepas da ETE2, os mais frequentes foram *Proteus* (63,2%; 12/19) e *Escherichia* (31,6%; 6/19) (Figura 5(B)), e da ETE3, os mais frequentes foram *Klebsiella* (55,6%; 10/18) e *Providencia* (27,8%; 5/18) (Figura 5(C)). Todas as cepas dos gêneros *Morganella* e *Serratia* foram isoladas de efluentes tratados, e 58% (15/26) do total de cepas isoladas do gênero *Escherichia*, 43% (9/21) *Proteus*, 37% (10/27) *Klebsiella*, 31% (4/13) *Providencia*, e 20% (1/5) *Enterobacter* foram também isoladas dos efluentes tratados (Figura 6).

Figura 5. Distribuição dos gêneros bacteriano isolados na ETE1 (A), ETE2 (B) e ETE3(C).



Fonte: Própria autora, 2023.

Figura 6. Distribuição dos gêneros bacterianos isolados nos pontos de coleta.



Fonte: Própria autora, 2023.

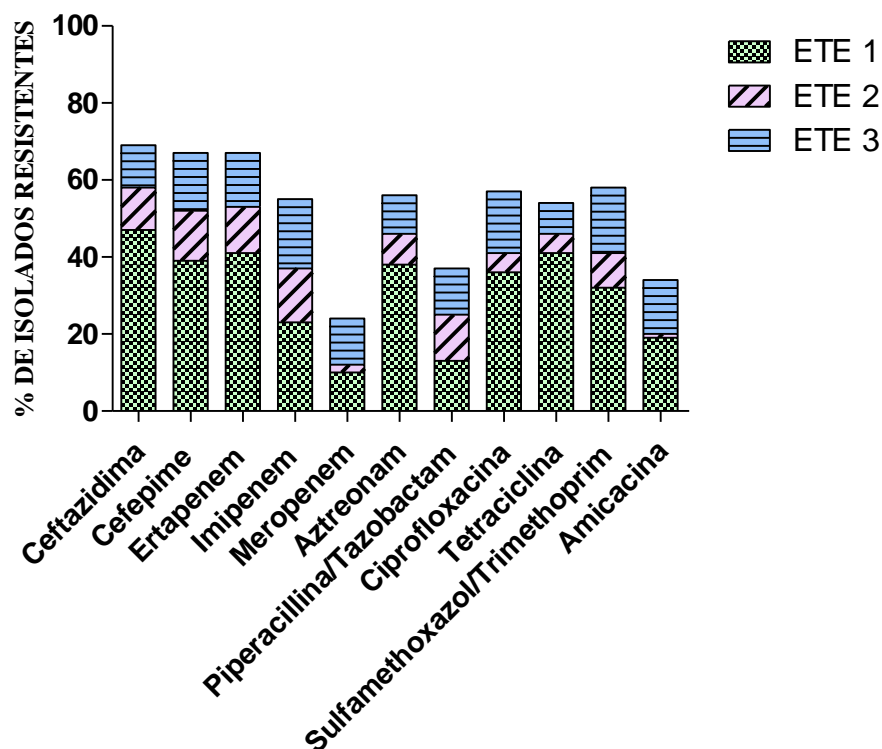
As espécies mais frequentes neste estudo foram *K. pneumoniae* e *E. coli*. Esta prevalência também foi observada em outros estudos com efluentes domésticos e hospitalares

brutos (ALVES COELHO et al., 2021; SAKKAS et al., 2019; SUZUKI et al., 2020a) e tratados (HASSEN et al., 2020; TEBAN-MAN et al., 2021). A maior prevalência de isolados dessas espécies possivelmente está associada ao fato de fazerem parte da microbiota intestinal humana, sendo também espécies clinicamente importantes por serem oportunistas. Assim, são frequentes em infecções no ambiente hospitalar, e conseqüentemente nos efluentes hospitalares (MILLS; LEE, 2019). Bactérias de outros gêneros encontrados neste estudo também já haviam sido isoladas de efluentes anteriormente tais como cepas *Proteus* multirresistentes isolados de efluente hospitalar bruto coletado em três hospitais na Nigéria (AJAYI-ODOKO et al., 2023), e em *Providencia* em esgoto bruto e lodo ativado de uma ETE municipal no Brasil (PAIVA et al., 2017), *Enterobacter* nos efluentes brutos, lodo reciclado e nos efluentes tratados de uma ETE municipal na Colômbia (ARISTIZÁBAL-HOYOS et al., 2019), *Morganella* em águas residuais brutas e tratadas de uma ETE municipal na Eslováquia (LÉPESOVÁ et al., 2019) e *Serratia* em efluentes brutos e tratados de uma ETE municipal nos Estados Unidos (SUTHERLAND et al., 2010). As bactérias destes gêneros são frequentemente encontradas em esgotos hospitalares e domésticos devido à sua alta capacidade de se adaptarem a diferentes ambientes e fontes de nutrientes, são capazes de tolerar uma ampla gama de condições, como pH variável, presença de compostos tóxicos e altas concentrações de matéria orgânica, além de algumas espécies apresentarem a capacidade de aderir superfícies e formarem biofilme que facilitam sua sobrevivência e persistência em sistemas de tratamento de esgotos (ARAÚJO et al., 2021; ZHANG et al., 2020), isso principalmente na ETE3, que é uma estação que possui tratamento MBBR, com crescimento aderido.

5.3 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA

Todas as *Enterobacterales* foram submetidas ao teste de suscetibilidade antimicrobiana. Em relação a resistência aos β -lactâmicos, quase 70% das cepas foram resistentes a ceftazidima (68/98) e ao cefepime (66/98), enquanto 57,1% (56/98) dos isolados foram resistentes ao ertapenem, 54,1% (53/98) ao imipenem, 23,5% (23/98) ao meropenem e 53,1 (52/98) ao aztreonam (Figura 7). De todas as *Enterobacterales*, 21,4% (21/98) foram resistentes aos três carbapenêmicos testados. Em relação às resistências intrínsecas, as espécies encontradas no presente estudo *Proteus mirabilis*, *Proteus penneri*, *Proteus vulgaris*, *Providencia rettigeri* e *Providencia stuartii* (n=30) possuem resistência intrínseca a tetraciclina (EUCAST, 2022).

Figura 7. Resistência antimicrobiana de *Enterobacterales* em função dos efluentes bruto e tratado das ETEs 1, 2 e 3.



Fonte: Própria autora, 2023.

Os antimicrobianos que apresentaram maior número de isolados resistentes foram ceftazidima e cefepime, que são cefalosporinas de 3ª e 4ª geração, respectivamente, antimicrobianos amplamente utilizados na área clínica (ROBERTS; WEBB; LIPMAN, 2007), sendo as espécies *E. coli* e *K. pneumoniae* que apresentaram maior número de cepas resistentes a esses antimicrobianos. Outros estudos também encontraram percentuais semelhantes, acima de 60%, em *Enterobacterales* de resistência às cefalosporinas em efluentes hospitalares na China (LE et al., 2016) e na Singapura (HALLER et al., 2018). No Brasil, PICÃO et al., 2013, observaram resistência a ceftazidima em 79% dos isolados de efluentes hospitalares. Por outro lado, ZAGUI et al., 2020, encontraram baixa resistência a ceftazidima em isolados de efluentes hospitalares (27%).

Dentre os carbapenêmicos, houve mais cepas resistentes ao ertapenem (57,1%; 56/98), sendo resistência mais encontrada em *K. pneumoniae*. Neste estudo, o ertapenem foi utilizado na etapa de isolamento das bactérias, com a finalidade de filtrar o crescimento das bactérias que sejam mais resistentes a este antibiótico, devido a isso, foi o carbapenêmico que apresentou maior número de isolados resistentes. Outros estudos realizados em efluentes também

encontram mais da metade dos seus isolados resistentes ao ertapenem, sendo o estudo de ADEKANMBI et al., 2020 que isolou 100% de bactérias Gram-negativas resistentes ao ertapenem isoladas de águas residuais hospitalares na Nigéria, porém apenas 7,5% resistentes a ceftazidima, e o estudo de HALLER et al., 2018 isolou cepas Gram-negativas de efluentes hospitalares de Singapura e 82% foram resistentes ao ertapenem e a ceftazidima e 78% resistentes ao meropenem. No Brasil, ZAGUI et al., 2020, isolou bactérias Gram-negativas em efluentes hospitalares, e destas, 16% das bactérias resistentes ao ertapenem, 13% e 11% ao imipenem e ao meropenem, respectivamente, sendo percentuais menores aos encontrados neste estudo.

O meropenem foi o antimicrobiano que apresentou menor quantidade de isolados resistentes (23,5%; 23/98), provavelmente por ser um antibiótico considerado de último recurso. A espécie que apresentou maior quantidade de isolados resistentes ao meropenem foi a *K. pneumoniae*. Estudos realizados em efluentes urbanos também relataram taxas mais baixas para resistência a este antibiótico (aproximadamente 22%) (NIKKHAHI et al., 2021; PICÃO et al., 2013a). É importante notar que todos os isolados de *E. coli* foram sensíveis ao meropenem ou ao imipenem, e 57,7% (15/26) apresentaram resistência ao ertapenem.

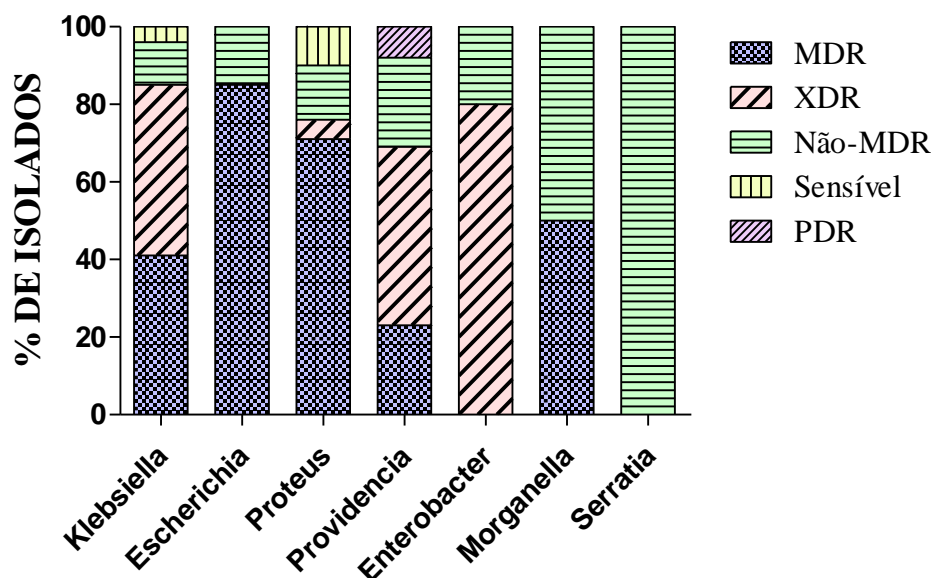
A maioria dos isolados resistentes aos antimicrobianos neste estudo foi recuperada da ETE1, e entre os isolados desta ETE, apresentou predominância em relação as três ETEs, de resistência a ceftazidima e amicacina. A ETE1 por se tratar de uma ETE municipal, recebe efluentes mistos, ou seja, efluentes domésticos, industriais e hospitalares de unidades que não apresentam sistema de tratamento próprio. Apesar disso, entre as cepas da ETE3, apresentaram predominância em relação aos isolados das outras ETEs, resistência ao imipenem e ao meropenem, provavelmente devido ao uso destes medicamentos considerados para infecções graves causadas por bactérias produtoras de β -lactamases no ambiente clínico. O estudo de PRAVEENKUMARREDDY et al., 2020 observou que efluentes domésticos apresentaram em menor ordem de resistência aos antimicrobianos em relação as ETEs hospitalares. E no presente estudo, apesar de apresentar a maioria dos isolados resistentes na ETE1, a ETE3 apresentou a maioria dos seus isolados resistentes aos carbapenêmicos.

Todos os isolados de *Enterobacterales* (n= 98) foram submetidos ao teste fenotípico de resistência à polimixina B. Das 61 cepas que não apresentam resistência intrínseca a polimixina B, três cepas apresentaram resistência à polimixina B. A cepa CCVSU 7107 *Escherichia coli* apresentou um CIM de 8 mg.L⁻¹, e as cepas CCVSU 7135 e 7136, ambas *Enterobacter cloacae*, apresentaram um CIM acima de 64 mg.L⁻¹. As três cepas foram isoladas nos efluentes brutos da ETE1. Já foi relatada anteriormente resistência a polimixinas em isolados de amostras

clínicas no Brasil apresentando CIM acima de 4 mg.L⁻¹ em *E. coli* (CONCEIÇÃO-NETO et al., 2017b), em *K. pneumoniae* (BARTOLLETTI et al., 2016) e em *E. cloacae* (RIBEIRO et al., 2013). As espécies que possuem resistência intrínseca a polimixina B (n=37) apresentaram CIM acima de 64 mg.L⁻¹. De acordo com o (CLSI, 2022), entre os isolados obtidos temos *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Proteus penneri*, *Proteus vulgaris*, *Providencia stuartii*, *Providencia rettgeri* e *Serratia marcescens*.

Todas as *Enterobacterales* (n= 98) foram classificadas de acordo com a classificação do perfil de resistência bacteriana adaptado de Magiorakos (2012), e destas, 54,1% (53/98) foram classificados como MDR, sendo 27 isolados dos efluentes tratados; 23,5% (23/98) com o perfil XDR, sendo três recuperados dos ET; 18,4% (18/98) como perfil não-MDR, sendo 13 obtidos dos ET; 3,1% (3/98) como perfil suscetível e uma cepa com o perfil PDR recuperada dos efluentes tratados da ETE1. Entre os isolados classificados como MDR, 41,5% (22/53) são do gênero *Escherichia*, seguido de 28,3% (15/53) do gênero *Proteus*. Entre o perfil XDR, 52,2% (12/23) são do gênero *Klebsiella*, seguido de 26,1% (6/23) do gênero *Providencia*. A maioria dos isolados dos gêneros *Klebsiella*, *Providencia* e *Enterobacter* apresentaram o perfil XDR (44,4% - 12/27; 45,1% - 6/13 e 80% - 4/5, respectivamente) e a maioria dos isolados dos gêneros *Escherichia* e *Proteus* apresentaram o perfil MDR (85% - 22/26, 71% - 15/21, respectivamente) (Figura 8). A única cepa a apresentar o perfil PDR foi de *Providencia rettgeri* isolada dos efluentes tratados da ETE1.

Figura 8. Percentual do perfil de resistência de cada gênero bacteriano. MDR: *multidrug-resistant*, XDR: *extensively drug-resistant* e PDR: *pandrug-resistant*.



Fonte: Própria autora, 2023.

É importante observar que das cepas que apresentaram o perfil MDR, 51% (27/53) foram isoladas de efluentes tratados das ETE 1 e 2, e das cepas que apresentaram o perfil XDR, três cepas foram isoladas de efluentes tratados das ETES 1 e 2. Os gêneros que a maioria dos isolados apresentaram o perfil MDR foram *Escherichia*, *Proteus* e *Klebsiella*, e o perfil XDR foram *Klebsiella* e *Providencia*. Em outros estudos, *Escherichia* (KUMAR et al., 2020; MUKHERJEE et al., 2021) e *Klebsiella* (TEBAN-MAN et al., 2021) são os gêneros que mais aparecem com perfis de resistência MDR em efluentes hospitalares. Estudos realizados em efluentes no Brasil também encontraram altos percentuais mais de 60% de isolados apresentando o perfil MDR (MACHADO et al., 2020; ZAGUI et al., 2021). O estudo de KVESIĆ et al., 2022, isolou quatro cepas (uma *E. coli* e três *K. pneumoniae*) com perfil XDR em efluentes tratados de um emissário submarino na Croácia. Um outro estudo isolou 26 bactérias Gram-negativas XDR de um sistema de captação clínico/urbano na Alemanha (MÜLLER et al., 2018) e outro estudo que isolou uma cepa *E. coli* XDR em efluente bruto de uma ETE municipal na Coréia do Sul (SHIN et al., 2021).

Vale ressaltar que no presente estudo foram isoladas três cepas XDR nos efluentes tratados, duas são da ETE1 sendo uma delas a cepa CCVSU 7173 *K. pneumoniae*. Essa mesma espécie com o mesmo perfil de resistência foi isolada dos efluentes brutos da mesma ETE, indicando uma possível persistência desta espécie em efluentes tratados. Na ETE1, 12 cepas

isoladas dos EB e 20 dos ET apresentaram o perfil MDR, levantando a hipótese de que essas cepas podem estar adquirindo resistência ao longo do tratamento desta ETE, e um dos principais motivos para isso pode ser a presença de resíduos de antimicrobianos nesses efluentes, que selecionam e promovem o crescimento de bactérias resistentes, favorecendo sua sobrevivência durante o processo de tratamento, além da possibilidade de transferência horizontal de genes de resistência entre as bactérias durante o tratamento, e também demonstra que o processo de tratamento secundário desta ETE não é eficaz para remoção destes microrganismos patogênicos (MICHAEL et al., 2013).

Para determinar a concentração inibitória mínima, foram selecionadas 28 cepas com os perfis MDR, XDR e PDR, e destas, 71,4% (20/28) foram resistentes a ceftazidima, que apresentaram CIM entre 4 e 256 mg.L⁻¹ (EUCAST, 2022) e 28,6% (8/28) foram resistentes ao meropenem, com valor de CIM entre 8 e 32 mg.L⁻¹ (EUCAST, 2022), esses dados estão de acordo aos resultados do teste disco-difusão. O estudo de KORZENIEWSKA; HARNISZ (2013) encontrou CIM de ceftazidima similar aos reportados no presente estudo em *Enterobacterales* isoladas de efluentes hospitalares e o estudo de SUZUKI et al. (2020) para o meropenem.

5.4 DETECÇÃO DE DETERMINANTES DE RESISTÊNCIA ÀS POLIMIXINAS

Apenas as cepas que apresentaram resistência fenotípica à polimixina B prosseguiram para a detecção dos genes *mcr1-5*, incluindo neste grupo as cepas que apresentam resistência intrínseca. Entre os genes pesquisados, foi detectado apenas o gene *mcr-1* na cepa *Escherichia coli* CCVSU 7107. Esta cepa não apresentou resistência a nenhum dos β-lactâmicos testados, inclusive aos carbapenêmicos, não apresentou atividade carbapenemase e apresentou resistência apenas aos antimicrobianos sulfametoxazol/trimetoprima, tetraciclina e ciprofloxacina. As cepas CCVSU 7135 e 7136, apesar de apresentarem resistência fenotípica a polimixina B, não apresentaram nenhum dos genes *mcr* pesquisados.

De acordo com estudos anteriores, além do mecanismo plasmidial mediado por genes *mcr*, o complexo *E. cloacae* pode adquirir resistência a polimixina do sistema de dois componentes *phoPQ*, *pmrAB* que promove a modificação do lipídio A (MOHAPATRA; DWIBEDY; PADHY, 2021), e também pela presença do gene *ecr* que codifica proteína transmembrana que atua no sistema PhoPQ, ativando o operon *pbgP* e aumentando a modificação do LPS bacteriano, além dos mecanismos do uso de bomba de efluxo e superexpressão da proteína da membrana externa OprH (MMATLI; MBELLE; SEKYERE,

2022). As cepas que têm resistência intrínseca apresentaram um CIM maior que 64 mg.L^{-1} e foram investigados os genes *mcr* nessas espécies, porém nenhum gene foi detectado, sugerindo que o mecanismo de resistência nesses isolados é cromossomal. A maioria das bactérias naturalmente resistentes as polimixinas já possuem o LPS modificado com L-Ara4N, o que pode explicar sua resistência intrínseca (OLAITAN; MORAND; ROLAIN, 2014).

A resistência a polimixina conferida pelo gene *mcr-1* foi relatada pela primeira vez em isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* em amostras de origem animal (porcos de fazendas, carne de porco e frango de varejo) e amostras clínicas de humanos na China (LIU et al., 2016). O estudo de POIREL et al. (2016) isolou de uma amostra clínica na Suíça uma cepa de *Escherichia coli* carreando o gene *mcr-1*, porém diferente deste estudo, co-carreando o gene *bla_{VIM}*, apresentando um CIM menor de $4 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ e resistência fenotípica aos carbapenêmicos. Com a identificação de outro gene, *floR*, que confere resistência ao antibiótico florfenicol, e a identificação recorrente de cepas *E. coli* produtoras de VIM-1 em amostras de animais, foi sugerido para esta resistência uma origem animal devido ao grande uso desses antimicrobianos e colistina na medicina veterinária. Um estudo realizado na China detectou em uma cepa *E. coli* MDR isolada de carne de frango carreando o gene *mcr-1* sendo co-carreado com o gene *bla_{NDM}*, em diferentes plasmídeos conjugativos (YAO et al., 2016).

No Brasil o gene *mcr-1* foi detectado apenas em amostras clínicas, sendo descrito pela primeira vez em uma cepa da espécie *E. coli* isolada de amostra clínica, localizada no plasmídeo IncX4 (FERNANDES et al., 2016b). No estudo de CONCEIÇÃO-NETO et al. (2017) isolaram seis cepas da espécie *E. coli* de duas amostras clínicas de hospitais no Rio de Janeiro, carreando o gene *mcr-1*, e dessas três com a co-existência do gene *bla_{KPC}*, com CIM de 4 a $8 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ e resistentes aos carbapenêmicos ertapenem, meropenem e imipenem. O estudo de LORENZONI et al. (2018) isolou uma *E. coli* carreando o gene *mcr-1* isolada de hemocultura de um hospital universitário, apresentando CIM de $64 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ e suscetíveis aos carbapenêmicos ertapenem, imipenem e meropenem, perfil semelhante ao encontrado no presente estudo.

O gene *mcr-1* também já foi detectado anteriormente em efluentes de ETE, como no estudo realizado no Japão de HAYASHI et al. (2019) que isolou sete cepas da espécie *E. coli* carreadoras do gene *mcr-1* de efluentes brutos de três diferentes ETEs. Essas cepas apresentaram CIMs de 4 a 16 mg.L^{-1} , carreados com genes de virulência em plasmídeos IncX4 e Inc12. Essas cepas foram negativas para atividade e genes ESBL e foram sensíveis ao imipenem e ao meropenem, resultados semelhantes ao do presente estudo. Outro estudo realizado na China isolou uma cepa *K. pneumoniae* carreando gene *mcr-1* de efluentes bruto de uma estação de tratamento hospitalar, apresentando também um CIM de $8 \text{ } \mu\text{g m L}^{-1}$ e também

suscetível para cefalosporinas e ao imipenem e ertapenem (ZHAO et al., 2017). Outros estudos realizados em outros países como na Espanha (LEKUNBERRI; BALCÁZAR; BORREGO, 2017) e Bangladesh (ISLAM et al., 2017) também obtiveram isolados carregando o gene *mcr-1* em efluentes de ETEs.

No Brasil, são poucos os relatos sobre a detecção de gene *mcr-1* em matrizes ambientais, como o estudo de FERNANDES et al. (2017) que isolou de águas recreacionais de praias públicas de São Paulo três cepas *E. coli* MDR carregando o gene *mcr-1* e genes ESBL. Estes genes estavam localizados no plasmídeo IncX4, apresentando CIM de $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e suscetibilidade ao imipenem e ao meropenem, equivalente a cepa *E. coli* do presente estudo. Outro estudo isolou uma cepa da espécie *E. coli* gene *mcr-1* co-carregando genes ESBL com o mesmo CIM e suscetibilidade do estudo anterior, em um manguezal poluído no nordeste (SACRAMENTO et al., 2018). O estudo de RAMALHO et al. (2022), realizou um estudo da avaliação da ocorrência de diversidade de genes de resistência em amostras totais de águas de estações de tratamento de água potável e em sistemas de esgoto de um centro urbano no sul do Brasil, e observou que todas as amostras de esgotos apresentaram genes que codificam ESBL, carbapenemases, e genes *mcr-1*, demonstrando que esses mananciais são importantes reservatórios de genes de resistência. Genes *mcr* também já foram relatados a partir de uma abordagem metagenômica em amostras de bacia hidrográfica (*mcr-3* e *mcr-4*) e em água potável coletada de torneira e no rio Guandu (*mcr-9*) no Rio de Janeiro (BIANCO et al., 2022). É importante ressaltar que até o momento da publicação deste estudo, este é o primeiro relato da detecção do gene *mcr-1* em cepas isoladas de efluentes no Brasil.

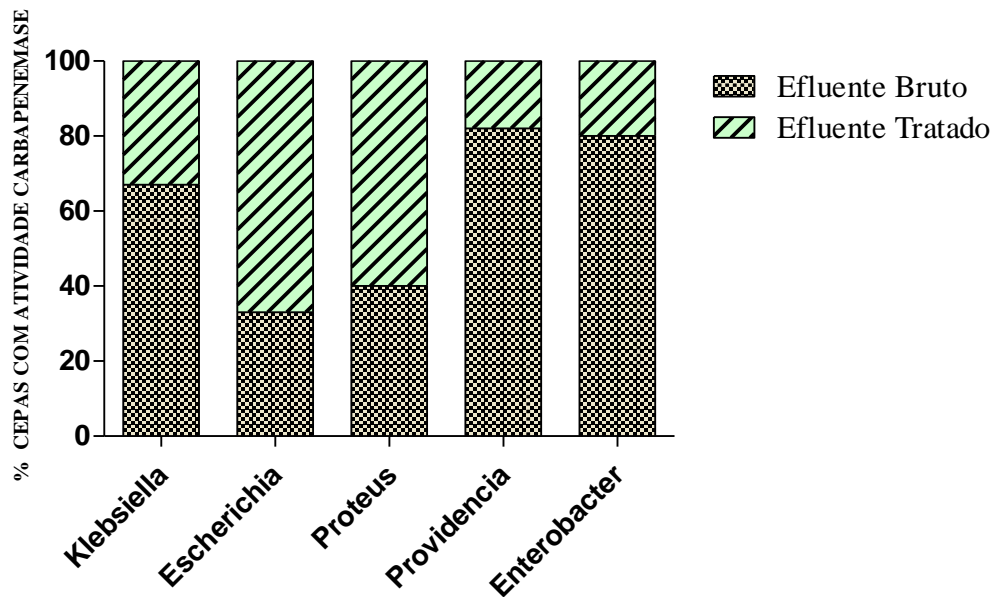
Visto as conclusões destes trabalhos, podemos observar que o gene *mcr-1* tem sido recorrentemente relatado em cepas da espécie *E. coli*, apresentando os mesmos perfis deste estudo, e em diferentes matrizes, tais como efluentes, em amostras humanas, de animais e de alimentos. Estes resultados reforçam a ideia de que a resistência as polimixinas deve ser estudada por meio da abordagem *One Health*.

5.5 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE DE CARBAPENEMASES

Todas as *Enterobacterales* foram submetidas ao teste fenotípico da atividade de carbapenemases. Do total de isolados analisados, 52,1% (51/98) foram positivas, e destas, 39,2% (20/51) foram recuperadas de efluentes tratados, nas quais 80% (16/20) são da ETE1 e 20% (4/20) da ETE2. Em relação aos gêneros bacterianos, *Morganella* e *Serratia* não apresentaram atividade de carbapenemases e 67% (8/12) das cepas são do gênero *Escherichia*,

60% (3/5) das cepas de *Proteus*, 33,3% (6/18) das cepas de *Klebsiella*, 20% (1/5) das cepas de *Enterobacter* e 18% (2/11) das cepas de *Providencia* que apresentam atividade de carbapenemases foram isoladas dos efluentes tratados (Figura 9).

Figura 9. Percentual de isolados com atividade de carbapenemases nos efluentes bruto e tratado das ETEs 1, 2 e 3.



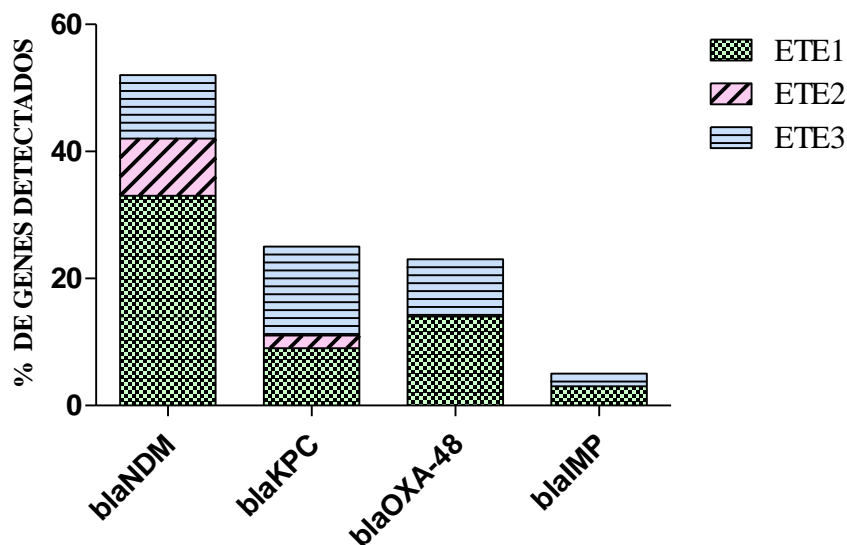
Fonte: Própria autora, 2023.

Entre os carbapenêmicos, dos isolados que apresentaram atividade carbapenemase, 74,5% (38/51) foram resistentes ao ertapenem, 62,7% (32/51) ao imipenem e 43,1% (22/51) ao meropenem. Alguns estudos realizaram avaliação da atividade de carbapenemases em efluentes, como o estudo de REINKE et al. (2020) realizados nos Estados Unidos, que isolou 80% de cepas Gram-negativas com atividade de carbapenemase, 100% resistentes ao ertapenem e 90% ao meropenem, em efluentes brutos e tratados de duas ETEs e o estudo de TOO et al. (2023), que recuperou 391 *Enterobacterales* com atividade carbapenemase, todas resistentes ao meropenem e em sua maioria *K. pneumoniae* e *E. coli* de efluentes brutos de uma ETE municipal. Também foi realizado um estudo na África do Sul que isolou uma cepa da espécie *K. oxytoca* produtora de carbapenemase resistente ao ertapenem em efluentes hospitalares (KING; SCHMIDT; ESSACK, 2020). SAKKAS et al. (2019), realizaram um estudo em efluentes brutos de 12 hospitais na Grécia e isolou 15 cepas da espécie *K. pneumoniae* com atividade carbapenemase e carregando genes de resistência aos carbapenêmicos.

5.6 DETECÇÃO DE GENES QUE CODIFICAM CARBAPENEMASES

Foram selecionadas 58 cepas, destas 23 são resistentes ao meropenem e 35 resistentes ao imipenem (sensíveis ao meropenem) para a detecção dos genes *bla_{NDM}*, *bla_{KPC}*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*, *bla_{GES}* e *bla_{BKC}*. Os genes *bla_{VIM}*, *bla_{GES}* e *bla_{BKC}* não foram detectados. Quase 70% (39/58) dos isolados pesquisados apresentaram pelo menos um dos outros genes pesquisados. Os genes *bla_{NDM}*, *bla_{KPC}*, *bla_{OXA-48}* e *bla_{IMP}* foram detectados em 51,7% (30/58); 24,1% (14/58); 22,4% (13/58) e 5,2% (3/58) das cepas testadas, respectivamente. O gene *bla_{NDM}* foi o único gene detectado em todos os gêneros selecionados e apresentou maior prevalência na ETE1 (32,8%; 19/58), seguido do gene *bla_{KPC}* com a maioria das cepas isoladas da ETE3 (14%; 8/58), *bla_{OXA-48}* com a maioria das cepas recuperadas da ETE1 (14%; 8/58) e *bla_{IMP}* com cepas encontradas da ETE1 (3%; 2/58). As ETEs 1 e 3 apresentaram todos os genes pesquisados, enquanto a ETE2 apresentou apenas *bla_{NDM}* e *bla_{KPC}* (Figura 10).

Figura 10. Frequência da detecção dos genes nos isolados testados nas ETEs 1, 2 e 3.



Fonte: Própria autora, 2023.

Dos isolados que não apresentaram nenhum gene de resistência pesquisado (33% - 19/58), sua resistência fenotípica pode ser devida a outros mecanismos de resistência, contra carbapenêmicos, como bombas de efluxo de antimicrobianos e permeabilidade de membrana modificada (OGURA et al., 2020). Os genes de resistência detectados neste estudo são genes que conferem resistência a antimicrobianos considerados último recurso na prática clínica (MARTÍNEZ-MARTÍNEZ; GONZÁLEZ-LÓPEZ, 2014). É importante ressaltar que ambos os

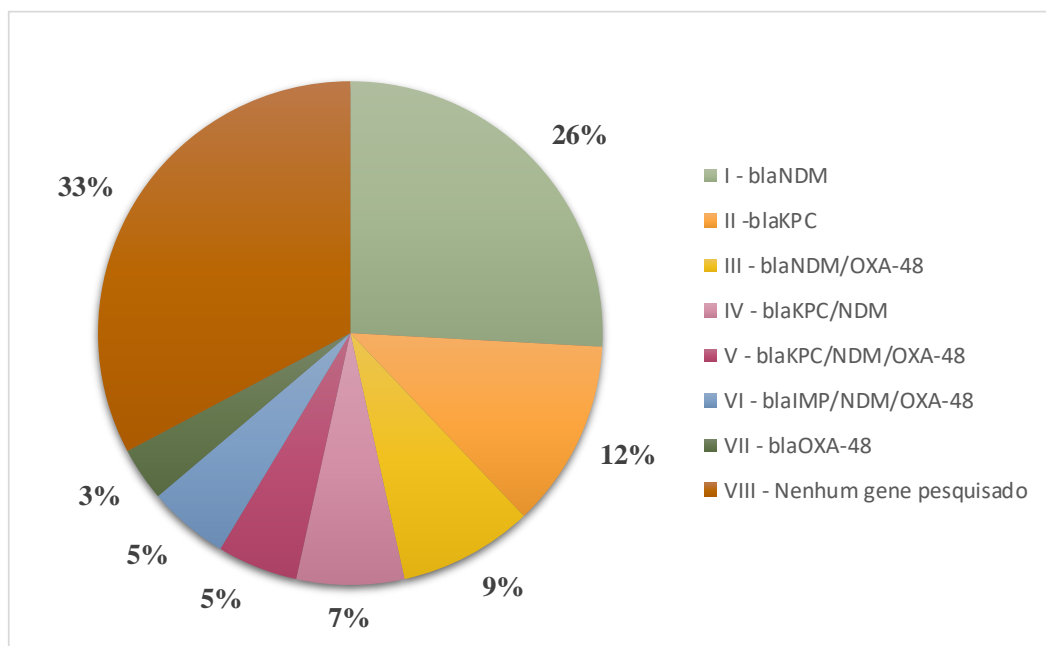
genes *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}* conferem resistência a quase todos os antimicrobianos β -lactâmicos conhecidos (TEKELI et al., 2020), e a resistência às cefalosporinas observada neste estudo pode ser atribuída à presença desses genes. Os genes mais frequentes nos efluentes deste estudo foram os que codificam as carbapenemases NDM e KPC, e os percentuais desses genes nas ETEs 1 (mista) e 3 (hospitalar) pode refletir a proporção de pacientes hospitalizados colonizados ou infectados com bactérias produtoras de carbapenemases. Em 2021, a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) emitiu um alerta epidemiológico sobre o surgimento e aumento de novas combinações de carbapenemases em *Enterobacteriales* na América Latina e no Caribe e as enzimas das famílias KPC, NDM e OXA, metalo- β -lactamase codificada por integrom de Verona (VIM) e imipenemase (IMP) foram relatadas como as mais frequentemente detectadas (OPAS, 2021).

No Brasil, os genes *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}* foram relatados os mais frequentes em isolados clínicos de *Enterobacteriales* produtoras de carbapenemases (WINK et al., 2021b) e essa disseminação já foi mencionada pela OMS como um dos desafios mais preocupantes para a saúde pública (WHO, 2019b). Em uma análise retrospectiva de 2012 a 2021 de dados provenientes de hospitais de seis estados brasileiros, o gene *bla_{KPC}* foi o gene mais frequente independente do ano, porém com maior frequência relativa em 2021. Um aumento expressivo do gene *bla_{NDM}* e *bla_{OXA-23}* também foi observado no ano de 2021 (POLLY et al., 2022). O aumento na detecção desses genes de resistência acompanhou o avanço da pandemia de COVID-19 no Brasil em 2021, provavelmente devido ao aumento do uso de antimicrobianos (FUGA et al., 2022).

Os isolados que apresentaram genes de resistência foram divididos em oito perfis genéticos. O perfil I são isolados que carregam apenas o gene *bla_{NDM}*, que representou 26% (15/58) dos isolados selecionados, dentre eles estão presentes os gêneros *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus* e *Serratia*; o perfil II são isolados que carregam apenas o gene *bla_{KPC}*, que representou 12% (7/58) dos isolados, e apenas cepas do gênero *Klebsiella* apresentou este perfil; o perfil III são isolados que carregam os genes *bla_{NDM}* e *bla_{OXA-48}* simultaneamente, que representou 9% (5/58) dos isolados, dentre eles estão os gêneros *Providencia* e *Morganella*; o perfil IV são isolados que carregam os genes *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}* simultaneamente, sendo 7% (4/58) dos isolados, e apenas cepas do gênero *Klebsiella* apresentaram este perfil; o perfil V são isolados que carregam os genes *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}* e *bla_{OXA-48}* simultaneamente, sendo 5% (3/58) dos isolados, entre eles estão presentes os gêneros *Klebsiella* e *Providencia*; o perfil VI são isolados que carregam os genes *bla_{IMP}*, *bla_{NDM}* e *bla_{OXA-48}* simultaneamente, sendo 5% (3/58) dos isolados e apenas o gênero *Providencia*

apresentou este perfil; o perfil VII são isolados que carregam apenas o gene *bla*_{OXA-48}, sendo 3% (3/58) dos isolados, apenas o gênero *Providencia* apresentou este perfil e o perfil VIII são os isolados que não foram detectados genes de resistência pesquisados, sendo 33% (19/58) dos isolados selecionados, dentre eles estão presentes os gêneros *Klebsiella*, *Proteus* e *Providencia* (Figura 11). O perfil II foi o que apresentou maior número de isolados resistentes ao ertapenem (7), e ao meropenem (6) e os perfis I e VIII foram os que mais apresentaram isolados resistentes ao imipenem (14 e 16, respectivamente). Em relação ao perfil VIII, esses isolados podem apresentar outros genes não pesquisados neste estudo, ou apresentar outro mecanismo de resistência ao imipenem, além do enzimático, como superexpressão de bomba de efluxo e perda de porinas. Todos o isolados dos perfis V e VI (3, cada) apresentaram resistência a todos os carbapenêmicos e β -lactâmicos testados.

Figura 11. Percentual dos perfis genéticos de resistência dos isolados dos efluentes bruto e tratado das ETEs 1, 2 e 3.

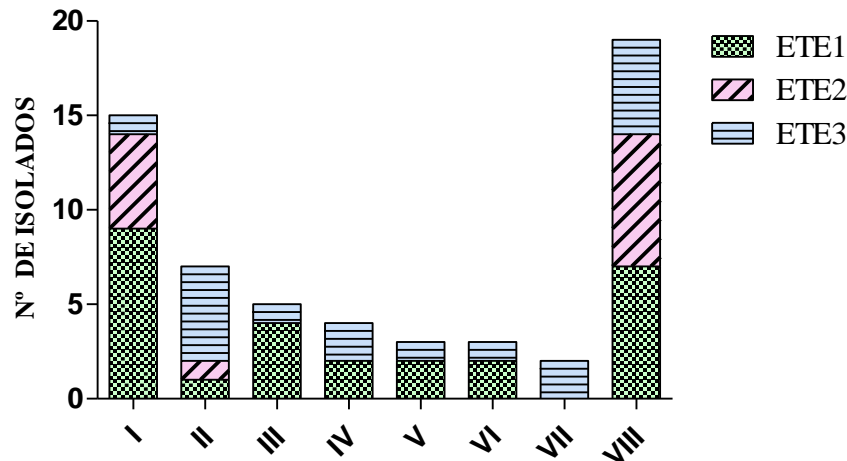


Fonte: Própria autora, 2023.

Entre os perfis, a ETE1 apresentou mais cepas do perfil I (9), a ETE2, do perfil VIII (3) e a ETE3, do perfil II e VIII (5, de cada). A ETE3, apesar de ser a ETE com menor tamanho/vazão em relação as outras ETEs, apresentou maior diversidade de perfis, sendo a única que obteve cepas de todos os perfis de resistência. A ETE1 não obteve cepas do perfil

VII e a ETE2 apresentou a menor diversidade, não obteve cepas dos perfis III, IV, V e VI, perfis que apresentavam mais de um gene simultaneamente, e nem do perfil VII (Figura 12).

Figura 12. Perfis genéticos distribuídos entre os efluentes bruto e tratados das ETEs 1, 2 e 3.



Fonte: Própria autora, 2023.

Entre o perfil genético I, as espécies que mais apresentaram este perfil foram *Enterobacter bungandensis* e *Morganella morganii* (3/15, cada), do perfil II todas as sete foram *K. pneumoniae*, do perfil III quatro foram *Providencia stuartii*, do perfil IV todas as quatro foram *K. pneumoniae*, do perfil V duas foram *K. pneumoniae*, do perfil VI foram três *Providencia stuartii*, do perfil VII as duas foram *Providencia rettgeri* e do perfil VIII dez foram *Proteus mirabilis*. A espécie que apresentou maior diversidade de perfis genéticos foi a *K. pneumoniae* (perfis I, II, IV, V e VIII). Das cepas que apresentaram os perfis com a presença de pelo menos um gene, 11 foram isoladas de efluentes tratados, e desses, oito foram isolados da ETE1. Das cepas isoladas dos efluentes tratados, duas cepas apresentaram o perfil III, *Providencia stuartii* e *Morganella morganii*, uma *K. pneumoniae* do perfil IV e uma *Providencia rettgeri* do perfil V. Ou seja, quatro cepas que apresentam perfis que carregam mais de um gene simultaneamente presentes nos efluentes tratados.

É importante destacar sobre as mesmas espécies de diferentes perfis de resistência e perfis genéticos sendo isoladas nos efluentes brutos e tratados da mesma ETE. Nos efluentes brutos da ETE1 foram recuperadas duas cepas de *Klebsiella pneumoniae* com perfil de resistência XDR e perfis genéticos IV e V, e nos efluentes tratados da mesma ETE, foram recuperadas cinco cepas da mesma espécie, uma com perfil de resistência XDR com perfil genético II e quatro com perfil de resistência MDR, com os perfis genéticos I, IV e VIII. Neste

caso, cepas da mesma espécie com o perfil XDR foram isoladas nos efluentes brutos e tratados e os efluentes tratados apresentou maior diversidade de perfis genéticos e o perfil genético IV se manteve nos efluentes tratados. Também nos efluentes brutos da ETE1, foram recuperadas quatro cepas de *Providencia stuartii* com perfil de resistência XDR com os perfis genéticos III e VI, e nos efluentes tratados foram recuperadas três cepas da mesma espécie com perfil de resistência Não-MDR com os perfis genéticos III e VIII. Nesse contexto, foi relatada mesma espécie com perfil de resistência XDR nos efluentes brutos e o perfil Não-MDR nos efluentes tratados, e apesar de duas cepas com perfil genético VIII serem isoladas dos efluentes tratados, em uma cepa com perfil de resistência Não-MDR o perfil de resistência III se manteve nos efluentes tratados.

Nos efluentes brutos da ETE2, foram isoladas duas cepas da espécie *Proteus hauseri* com perfil de resistência MDR e perfis genéticos I e VIII e nos efluentes tratados, foi recuperada uma cepa desta mesma espécie com perfil de resistência MDR e apresentando o perfil genético I. Nesta situação, os perfis de resistência e genético para esta espécie parece se manter dos efluentes brutos para os efluentes tratados. Também nos efluentes brutos da ETE2, foram recuperadas duas cepas da espécie *Proteus mirabilis* com perfil de resistência MDR e perfis genéticos VI e VIII, e nos efluentes tratados foram recuperadas cinco cepas desta mesma espécie, uma com perfil de resistência Não-MDR, três MDR e outra cepa XDR, todas com perfil genético VIII. Neste caso, pode-se observar que esta espécie apresentou o perfil MDR, com uma cepa carregando genes de resistência nos efluentes brutos e nos efluentes tratados este perfil se manteve, além também da presença do perfil XDR, porém com o perfil genético VIII com nenhum dos genes pesquisados detectados. Fica evidente que mesmos perfis de resistência de cepas de mesma espécie estão sendo isolados tanto nos efluentes brutos, quanto nos efluentes tratados das ETEs 1 e 2, sugerindo uma resistência dessas bactérias ao tratamento secundário dessas ETEs e suas possíveis contribuições para a disseminação de resistência nos corpos hídricos receptores.

O estudo de ROLBIECKI et al., 2021, também demonstrou essa persistência de bactérias resistentes ao realizar coletas de efluentes em uma ETE municipal com tratamento secundário que recebe efluentes mistos e na jusante do rio na Polônia e isolar cepas *K. pneumoniae* carregando, apenas um ou mais de um, os genes carbapenemases *bla_{KPC}*, *bla_{GES}*, *bla_{OXA-48}* e *bla_{IMP}* de efluentes brutos e de efluentes tratados, e mostrou que o gene *bla_{GES}* aumentou significativamente durante o tratamento na ETE, sendo encontrado em 6,2% nas cepas isoladas dos efluentes brutos e 15,3% nos efluentes tratados, indicando aumento de resistência na ETE, e também foi encontrado em cepas isoladas na jusante do rio, onde os

efluentes tratados são despejados, demonstrando que cepas de *K. pneumoniae* carregando um ou mais genes codificadores de carbapenemases resistem ao tratamento secundário, e esta ETE contribuiu com a disseminação bactérias resistentes nos ambientes aquáticos.

A alta prevalência de cepas de *Providencia* resistentes a carbapenêmicos (77%; 10/13) neste estudo é particularmente preocupante, pois essas bactérias já são intrinsecamente resistentes a polimixinas, tigeciclinas e tetraciclinas (CLSI, 2022), portanto, as infecções causadas por esta bactéria são difíceis de tratar e controlar. É importante destacar neste estudo, o isolamento de uma cepa *P. rettgeri* apresentando o perfil de resistência PDR na saída de uma estação municipal, carregando os genes *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}* e *bla_{OXA-48-like}*. Não foram encontradas referências na literatura sobre essa espécie com esse tipo de perfil de resistência em efluentes. A alta prevalência de isolados do gênero *Providencia* resistentes aos carbapenêmicos tem se tornado cada vez mais comum (LIU; WANG; FANG, 2020).

Alguns estudos realizados em efluentes de estações de tratamento de esgotos também encontraram os mesmos genes detectados no presente estudo. EBOMAH; OKOH, 2020 realizaram um estudo em matrizes ambientais na África do Sul. Foi observado que 58% de *Klebsiella* spp. carregavam os genes *bla_{NDM}* (42%), *bla_{KPC}* (10%) e *bla_{OXA-48}* (6%) o que foi semelhante aos resultados do presente trabalho, tanto do ponto de vista qualitativo (genes identificados) quanto quantitativo (proporção de prevalência entre os genes identificados). No artigo citado, foi observado o mesmo perfil IV da presente pesquisa, em isolados de *K. pneumoniae* e *K. oxytoca* obtidas em amostras de efluentes hospitalares, além de também ser encontrado quatro cepas co-carregando os genes *bla_{KPC}* e *bla_{OXA-48}*, perfil não encontrado na presente análise. Neste artigo também foi observado uma cepa com espécie não definida, isolada de águas de rio que apresentou o mesmo perfil V do presente estudo.

Um trabalho realizado em efluentes hospitalares de Singapura, em 2018, também revelou os genes *bla_{NDM}* e *bla_{KPC}* como os mais frequentes, com percentuais semelhantes ao observado no presente estudo (40,6% e 34,4%, respectivamente). O gene *bla_{KPC}* foi observado principalmente em isolados da espécie *K. pneumoniae*, como na pesquisa presente, e em *Enterobacter cloacae*. Já o gene *bla_{NDM}* foi observado predominantemente em isolados de *K. pneumoniae* e *Citrobacter freundii*. Os resultados deste estudo corroboram com os dados obtidos no presente estudo, quanto a coexistência dos genes *bla_{NDM}* e *bla_{KPC}* em isolados da mesma espécie (HALLER et al., 2018).

O artigo de NASRI et al., 2017, quantificou a abundância de genes em efluentes de sete diferentes hospitais na Tunísia. Foi observado uma maior predominância dos genes *bla_{NDM}* e *bla_{OXA-48}* em amostras de efluentes de águas residuais hospitalares, e o gene *bla_{KPC}* foi detectado

com menor frequência em apenas três dos sete efluentes analisados. Em contraste, no presente estudo, os genes *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}* foram os mais detectados em todos os pontos de coleta.

Alguns estudos sobre a ocorrência de genes de resistência aos carbapenêmicos presentes em cepas isoladas de efluentes de ETEs já foram realizadas no Brasil anteriormente. O estudo de CHAGAS et al., 2011, relatou pela primeira vez a detecção de *K. pneumoniae* produtora de KPC-2 abrigoando outras enzimas de resistência a β -lactâmicos isolada em efluentes hospitalares no Rio de Janeiro. Um estudo realizado em Brasília, isolou de efluentes brutos e tratados de uma ETE municipal uma cepa *K. pneumoniae* com o perfil genético IV, descrito no presente estudo (PEREIRA et al., 2022). Neste mesmo estudo, os genes *bla_{NDM}* e *bla_{KPC}* também foram os mais predominantes (53,8%) em isolados *K. pneumoniae* e em *Enterobacter cloacae* presentes em efluentes brutos e tratados, de maneira similar ao observado no presente estudo.

O estudo de PICÃO et al., 2013, obteve isolados carreando o gene *bla_{KPC}* em 19,9% das cepas isoladas de efluentes de estação de tratamento de esgotos e em efluentes hospitalares, resultados bastante semelhantes aos obtidos no presente estudo. Dentre estes isolados, os gêneros mais frequentes foram *Klebsiella* spp. (41,9%) e *Enterobacter* spp. (24,2%), que também foram identificadas nas amostras do presente estudo. Dentre essas as cepas carreadoras de *bla_{KPC}*, 37,1% foram isoladas de efluente hospitalar e 62,9% de efluentes de ETEs, porém foram encontradas apenas em efluentes brutos. Em outro estudo, ZAGUI et al., 2020 realizaram uma pesquisa em efluentes hospitalares em São Paulo e isolou 17,8% cepas carreando o gene *bla_{KPC}*, próximo do resultado obtido nesta pesquisa. Dentre estes isolados, seis eram *K. pneumoniae*, uma *Pseudomonas aeruginosa*, e uma *Serratia liquefaciens*, porém em um percentual menor que o do presente estudo.

Pode-se observar que a ETE1 que possui um sistema de tratamento secundário e apresenta maior tamanho/vazão em relação as outra ETEs estudadas, apresentou maior prevalência da presença dos genes *bla_{NDM}*, *bla_{OXA-48-like}* e *bla_{IMP}*, além de ser a ETE que mais apresentou isolados carreando pelo menos um gene de resistência nos efluentes tratados, indicando que esta ETE possivelmente possui uma contribuição para a disseminação de resistência antimicrobiana para os ecossistemas aquáticos. O que corrobora com os estudos que demonstram que o tratamento convencional secundário não resulta na remoção de bactérias resistentes dos efluentes (RIZZO et al., 2013b; TUROLLA et al., 2018b).

Além disso, também é importante destacar que, provavelmente em função do tratamento terciário utilizado na ETE3, as amostras do efluente tratado desta ETE apresentaram uma menor ocorrência de bactérias resistentes. Esta ETE também teve um bom rendimento de tratamento em relação aos parâmetros físico-químicos. Isto pode ser devido a utilização em

conjunto das biomídeas MBBR na etapa de tratamento biológico e da desinfecção com hipoclorito de sódio como tratamento terciário. A ação em conjunto desses dois tratamentos pode ser vantajosa, pois o MBBR realiza a degradação de grande parte da carga orgânica presente no efluente, facilitando a ação do hipoclorito na desinfecção dos efluentes. Outro estudo também observou que bactérias resistentes aos carbapenêmicos não foram detectadas em efluentes tratados de ETEs hospitalares, também com tratamento de efluentes por cloração (SUZUKI et al., 2020b). No entanto, é importante destacar que a dosagem de cloro deve ser cuidadosamente controlada para evitar a formação de subprodutos prejudiciais à saúde humana e ao meio ambiente (HU et al., 2013).

5.7 RELAÇÃO CLONAL DE ISOLADOS *Klebsiella pneumoniae*

Das 18 cepas *Klebsiella pneumoniae* analisadas para avaliação da relação clonal, foram identificados cinco STs: ST11, ST37, ST147, ST244 e ST281. Nove cepas (CCVSU 7028, 7031, 7047, 7048, 7051, 7055, 7058, 7060 e 7084) pertencem ao ST244 e todas foram isoladas dos efluentes brutos (EB) da ETE3. Seis cepas pertencem ao ST11 foram isoladas da ETE1, uma cepa (CCVSU 7102) isolada dos EB e cinco cepas (CCVSU 7110, 7112, 7113, 7173 e 7174) isoladas dos efluentes tratados (ET). Uma cepa (CCVSU 7127) pertence ao ST147, recuperada dos EB da ETE1. Uma cepa (CCVSU 7024) pertence ao ST281, recuperada do EB da ETE3. E uma cepa (CCVSU 6996) pertence ao ST37 foi isolada dos EB da ETE2 (Tabela 6).

Tabela 6. Caracterização das cepas da espécie *Klebsiella pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos.

CCVSU	ETE	Ponto de coleta	Fenótipo de resistência	MIC Polimixina B (mg.L ⁻¹)	Carbapenemase		Perfil de resistência	Perfil genético	ST	CC
					Atividade	Genes				
6996	2	Bruto	SXT, AK, MRP, ERT, FEP, PIT, ATM	0,5	Positivo	<i>bla_{KPC}</i>	MDR	II	37	-
7024	3	Bruto	SXT, CIP, AK, IMI, MRP, ERT, FEP, CAZ, PIT, ATM	0,5	Negativo	ND	XDR	VIII	281	-
7028	3	Bruto	SXT, CIP, AK, IMI, MRP, ERT, FEP, PIT, ATM	0,5	Positivo	<i>bla_{KPC}</i>	XDR	II	244	11
7031	3	Bruto	SXT, CIP, AK, IMI, MRP, ERT, FEP, PIT, ATM	0,5	Positivo	<i>bla_{KPC}</i>	XDR	II	244	11
7047	3	Bruto	SXT, CIP, AK, IMI, MRP, ERT, FEP, CAZ, PIT, ATM	0,5	Positivo	<i>bla_{KPC}</i>	XDR	II	244	11
7048	3	Bruto	SXT, CIP, AK, IMI, MRP, ERT, FEP, CAZ, PIT, ATM	0,5	Positivo	<i>bla_{KPC}, bla_{NDM}, bla_{OXA-48-like}</i>	XDR	IV	244	11
7051	3	Bruto	SXT, CIP, AK, IMI, MRP, ERT, FEP, CAZ, PIT, ATM	0,5	Positivo	ND	XDR	VIII	244	11
7055	3	Bruto	SXT, CIP, AK, IMI, MRP, ERT, FEP, CAZ, PIT, ATM	0,5	Positivo	<i>bla_{KPC}</i>	XDR	II	244	11
7058	3	Bruto	SXT, AK, IMI, MRP, ERT, FEP, PIT, ATM	0,5	Positivo	<i>bla_{KPC}</i>	MDR	II	244	11
7060	3	Bruto	SXT, CIP, AK, IMI, MRP, ERT, FEP, PIT, ATM	0,5	Positivo	<i>bla_{KPC}, bla_{NDM}</i>	XDR	IV	244	11
7084	3	Bruto	SXT, CIP, AK, IMI, MRP, ERT, FEP, ATM	0,5	Positivo	<i>bla_{KPC}, bla_{NDM}</i>	MDR	IV	244	11
7102	1	Bruto	TE, CIP, AK, IMI, MRP, ERT, FEP, CAZ, PIT, ATM	1	Positivo	<i>bla_{KPC}, bla_{NDM}, bla_{OXA-48-like}</i>	XDR	V	11	11
7110	1	Tratado	SXT, TE, CIP, ERT, FEP, CAZ, ATM	1	Negativo	ND	MDR	VIII	11	11
7112	1	Tratado	SXT, TE, CIP, AK, ERT, FEP, CAZ, ATM	1	Negativo	ND	MDR	VIII	11	11
7113	1	Tratado	SXT, TE, CIP, AK, ERT, FEP, CAZ, ATM	0,5	Positivo	<i>bla_{NDM}</i>	MDR	I	11	11
7173	1	Tratado	SXT, TE, CIP, IMI, ERT, FEP, PIT, ATM	1	Positivo	<i>bla_{KPC}</i>	XDR	II	11	11
7174	1	Tratado	SXT, CIP, IMI, MRP, ERT, FEP, CAZ, PIT, ATM	2	Positivo	<i>bla_{KPC}, bla_{NDM}</i>	XDR	IV	11	11
7127	1	Bruto	TE, CIP, ERT, FEP, CAZ, ATM	1	Positivo	<i>bla_{KPC}, bla_{NDM}</i>	MDR	IV	147	-

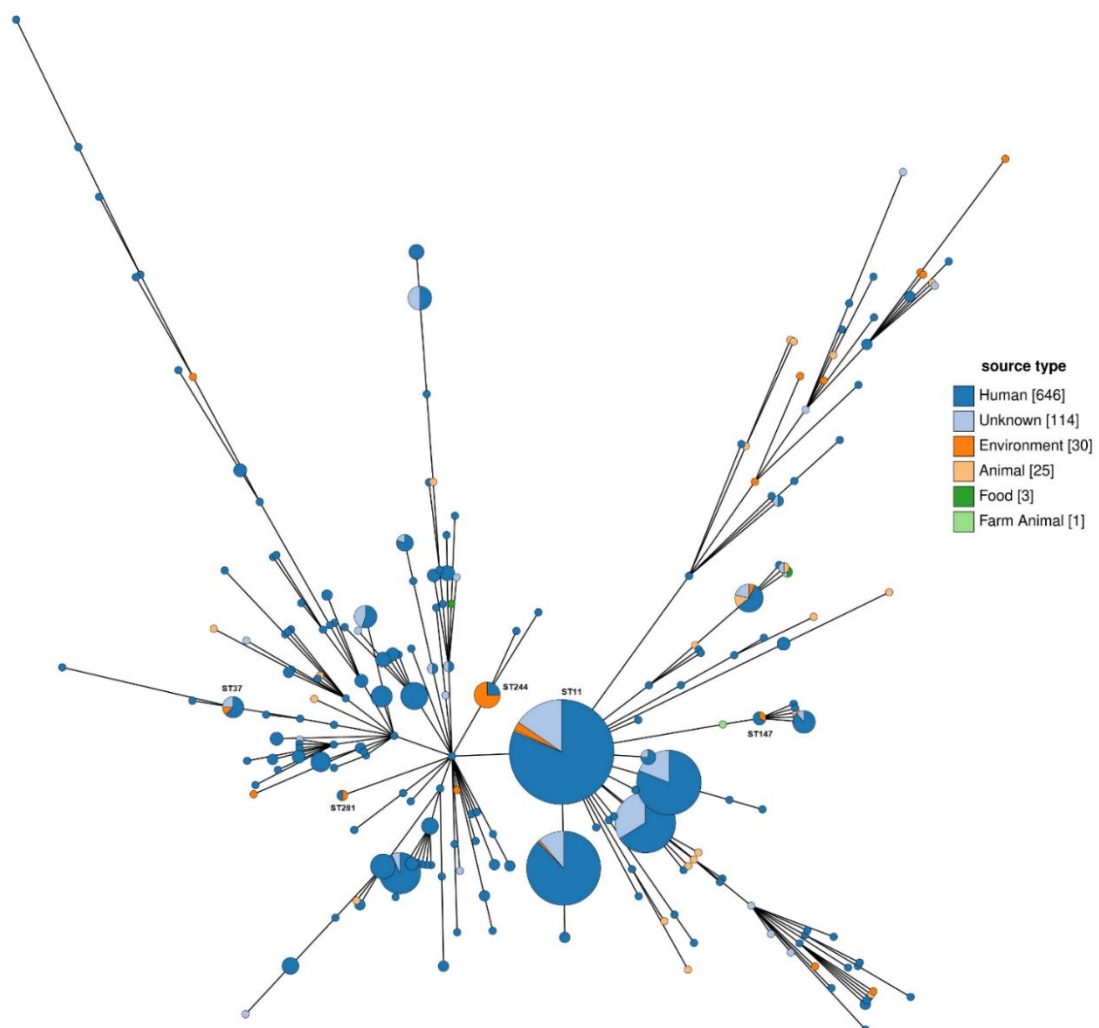
Cinza escuro representa isolados pertencentes ao ST244. Cinza claro representa isolados pertencentes ao ST11. Branco representa STs pertencentes aos STs 37, 281 e 147. AK, amicacina; ATM, aztreonam; CAZ, ceftazidima; CCVSU, Coleção de Culturas de Vigilância em Saúde Única; CIP, ciprofloxacina; CC, complexo clonal; EB, efluente bruto; ET, efluente tratado; ETE, Estação de Tratamento de Esgotos; ERT, ertapenem; FEP, cefepima; IMI, imipenem; MDR, “*multidrug-resistant*”; MRP, meropenem; ND, não detectado; PIT, piperaciclina/tazobactam; ST, “*Sequence Type*”; SXT, trimetoprima/sulfametoxazol; TE, tetraciclina; XDR, “*extensively drug-resistant*”.

Fonte: Própria autora, 2023.

Dentre as cepas selecionadas, todas são resistentes ao ertapenem, e 72,2% (13/18) foram resistentes tanto ao imipenem quanto ao meropenem. Dentre os perfis de resistência, 38,9% (7/18) apresentaram o perfil MDR e 61,1% (11/18) apresentaram o perfil XDR, e 83,3% (15/18) apresentaram atividade carbapenemase. Em relação aos perfis genéticos, sete apresentaram o perfil II (uma cepa isolada dos ET), quatro os perfis IV (uma cepa isolada dos ET) e VIII (duas isolada dos ET), uma o perfil V (isolada dos EB) e uma o perfil I (isolada dos ET).

A partir do banco de dados MLST de *K. pneumoniae* do Instituto Pasteur, foi gerada um *Minimal Spanning Tree* (MST) representada na figura 13.

Figura 13. Análise *Minimal Spanning Tree* (MST) de *Klebsiella pneumoniae* isoladas no Brasil depositadas no banco de dados MLST do Instituto Pasteur. O tamanho dos círculos representa a quantidade de isolados depositados de cada ST. Os STs encontrados neste estudo estão nomeados na Figura (ST11, ST37, ST147, ST244 e ST281). A fonte de isolamento é indicada por cores diferentes, as cepas de todos os isolados de fontes ambientais depositados no banco estão em laranja.



Fonte: Própria autora, 2023.

De acordo com todos os isolados depositados no banco de dados, até o momento deste estudo, dentre os STs encontrados neste estudo, o ST11 é o mais frequente (n=3128), seguido do ST147 (n=1899), ST37 (n=642), ST244 (n= 34) e ST281 (n=28). Todos os STs encontrados neste estudo já foram relatados na América do Norte, América do Sul, Europa (exceto ST244), Ásia (exceto ST281) e África. Os cinco STs encontrados no presente estudo já foram reportados em amostras clínicas e já haviam sido descritos no Brasil anteriormente. A análise MST (Figura 13) mostra a alocação das cepas analisadas neste estudo de acordo com seus STs. O ST11 prevalente tem sido associado a cepas clínicas e aumento da resistência a antimicrobianos, mostrando perfis MDR e XDR. A análise MST mostra ST11 como o ST central, onde outros STs relacionados são originados.

Na árvore MST, além do ST11, os outros quatro STs aqui descritos apresentam diferentes níveis de relação com o ST11. O ST com a relação mais próxima com ST11 é o ST244, compartilhando quatro alelos. Os restantes ST37, ST147 e ST281 compartilham dois alelos com ST11. Esta observação sugere fortemente que o ST244 pode ser agrupado em um complexo clonal 11 (CC11). É importante destacar que entre todas as cepas ST11 depositadas no banco de dados, apenas 3,7% (117/3128) foram isoladas de uma fonte ambiental, enquanto para ST244 a porcentagem de cepas ambientais é de 26,5% (9/34), sendo que todos os depósitos de cepas ST44 são as cepas deste estudo, mostrando que o ST11 é claramente não relacionado ao meio ambiente. Além da relação genética entre ST11 e ST244, esses dois ST compartilham outras características importantes relacionadas à resistência antimicrobiana. Metade das cepas ST11 isoladas neste estudo apresentam perfil XDR e atividades KPC, NDM e OXA-48, enquanto 77,8% (7/9) das cepas ST244 são XDR, também produtoras dessas enzimas. Devido a esse perfil de resistência entre as cepas ST11 e ST244, o CC11 sugerido abriga 66,6% das cepas XDR, o que é uma característica relevante a ser considerada quando cepas relacionadas a este CC são isoladas. Além disso, é importante ressaltar que este é o primeiro estudo relatando cepas ST244 de origem ambiental.

No presente estudo, as cepas do ST244 foram prevalentes. A cepa CCVSU 7048 XDR, apresentou perfil genético V, com três genes simultaneamente (*bla_{KPC}*, *bla_{NDM}* e *bla_{OXA-48-like}*) e dois perfil IV, CCVS7060 XDR e CCVS7084 MDR (*bla_{KPC}* e *bla_{NDM}*). Poucos estudos relataram sobre o isolamento de KPRC ST244, por exemplo, uma cepa de *K. pneumoniae* produtora de VIM isolada de análise fecal na Espanha (ÖSTERBLAD et al., 2012) e outro estudo que relatou KPRC produtora de KPC isolada em um hospital dos EUA (MATHERS et al., 2017).

Do ST281, apesar de não ter sido detectado nenhum dos genes de carbapenemases investigados e nem atividade de carbapenemases, esta cepa apresentou resistência aos três carbapenêmicos testados. Isto indica que sua resistência pode ser devida a algum outro mecanismo de resistência aos carbapenêmicos, além do enzimático. Os mecanismos mais comuns observados em isolados de *K. pneumoniae* são a perda de suas principais porinas (OmpK35 e OmpK36), diminuindo assim a permeabilidade da parede celular, e superexpressão da bomba de efluxo AcrAB (DALMOLIN et al., 2017a). Estudos já relataram KPRC ST281, por exemplo, duas cepas pertencentes ao ST281, portadoras do gene *bla_{NDM}*, isoladas em hospitais do Brasil (CAMARGO et al., 2022). Em outro estudo foi relatado um isolado ST281 de amostras clínicas com fenótipo hiper mucoviscoso no México (GARZA-RAMOS et al., 2018). Não foram encontrados estudos sobre a presença de cepas ST281 em efluentes do Brasil, nem de outras regiões do mundo.

As cepas do ST37 são relatadas na literatura como multidroga resistentes de alto risco (CHEN et al., 2021). Esses clones foram relatados em todo o mundo, como por exemplo: três cepas isoladas de instituições de longa permanência, carregando o gene *bla_{KPC-2}* inserido nos plasmídeos IncFII(K), IncFIB(K) e IncN na Itália (PICCIRILLI et al., 2021); onze cepas de amostras clínicas de pacientes pediátricos, carregando o gene *bla_{NDM-1}* na China (TIAN et al., 2018); uma cepa de uma coleção do Centro de Referência Croata para Vigilância de Resistência a Antimicrobianos isolados portadores do gene *bla_{OXA-48}* inserido no plasmídeo IncL/M na Croácia (JELIĆ et al., 2018). Recentemente no Brasil, foi descrita uma cepa isolada de hospitais públicos portadores do *bla_{KPC}* (RODRIGUES et al., 2022). Um estudo recuperou uma *K. pneumoniae* ST37 de amostras de águas residuais coletadas em pontos de descarga de duas indústrias farmacêuticas, mas diferente do presente estudo, carregando apenas genes ESBL na Nigéria (OBASI et al., 2017).

O ST147 é considerado um clone multirresistente de alto risco com surtos nosocomiais em todo o mundo e com potencial epidêmico (ARCARI; CARATTOLI, 2023; PEIRANO et al., 2020). Recentemente, existem evidências deste clone em diferentes regiões do mundo, por exemplo: quatro cepas *K. pneumoniae* ST147 isoladas em vários hospitais de cuidados intensivos de longo prazo e instalações de enfermagem especializadas com ventilação, carregando o gene *bla_{KPC}* e *bla_{NDM-1}* no plasmídeo IncF nos EUA (LAPP et al., 2021); uma cepa em amostras de urina, carregando o gene *bla_{KPC-2}* no plasmídeo IncFII(K) na Turquia (TURUMTAY et al., 2022) e, uma cepa isolada de um paciente, e carregando *bla_{KPC-2}* localizado no plasmídeo IncFIB(K)/IncFII(K), *bla_{NDM-1}* nos plasmídeos IncFIB(pQil)/IncFII(K) e *bla_{OXA-48}* no plasmídeo IncL na Romênia (MATASEJE et al., 2022)

e uma cepa isolada de uma amostra clínica de urina humana co-carreando genes *bla*_{NDM-1} e *mcr-1* no Peru (GONZALES-ESCALANTE et al., 2022). Há também um relato recente no Brasil, de uma cepa *K. pneumoniae* ST147 portadora do gene *bla*_{NDM-1} no plasmídeo IncX3, isolada de um paciente hospitalizado (CAMARGO et al., 2022b).

KPRC ST147 já foram relatadas em estações de tratamento de efluentes hospitalares, com perfil MDR, como a cepa obtida no presente estudo, portando o gene *bla*_{NDM-1} inserido no plasmídeo IncR na Alemanha (KEHL et al., 2022), carreando o gene *bla*_{OXA-48} na Romênia (TEBAN-MAN et al., 2021), carreando o gene *bla*_{NDM-9} inserido no plasmídeo IncR na Suíça (NÜESCH-INDERBINEN et al., 2018) e carreando o gene *bla*_{NDM-1} inserido nos plasmídeos IncA/C e IncX3 na Filipinas (SUZUKI et al., 2020a). Recentemente no Brasil, OLIVEIRA et al., 2023 recuperou duas cepas KPRC ST147 de EB de ETE, carreando *bla*_{KPC-2} e *bla*_{NDM-1} cada, semelhantes aos dados deste estudo. De acordo com o banco de dados, todos os genes encontrados neste estudo já foram relatados neste ST, incluindo também isolados co-portadores de pelo menos dois desses genes simultaneamente, mas todos de origem humana em diferentes países.

No presente estudo, ST11 foi o único ST que apresentou isolados tanto em EB quanto em ET da mesma ETE (ETE1). O ST11 é um importante clone multirresistente global de alto risco e de grande preocupação clínica, pois apresenta hipermucoviscosidade, acumula múltiplos genes em plasmídeos, principalmente genes *bla*_{KPC-2} (LIAO; LIU; ZHANG, 2020), e contribui significativamente para a disseminação de genes que codificam carbapenemases (CHEN et al., 2022). Essas características dificultam o tratamento e o controle das infecções por KPRC, sendo causa de infecções clínicas graves, representando um grande problema de saúde pública mundial na atualidade (ZENG et al., 2022). Cepas ST11, portadoras de genes que codificam carbapenemases, estão amplamente distribuídas pelo mundo e foram recentemente relatadas em diversos países, tais como: na China, portando o gene *bla*_{KPC-2}, inserido no plasmídeo IncFII, isolado de uma unidade de terapia intensiva do um hospital universitário (ZENG et al., 2022); na Espanha, em amostras clínicas, portando o gene *bla*_{NDM-7} inserido no plasmídeo IncX3 (MACHUCA et al., 2022) e no Egito, a partir de amostras de sangue de pacientes, co-portadora os genes *bla*_{KPC-2} e *bla*_{OXA-48} inseridos no plasmídeo IncL (YANG et al., 2022).

No Brasil, a maioria das cepas KPRC portadoras do gene *bla*_{KPC} em ambientes hospitalares pertencem ao ST11 (CONCEIÇÃO-NETO et al., 2022b), e também há relatos recentes de KPRC ST11 carregando o *bla*_{KPC-2} inserido em um plasmídeo IncX3 em um estudo realizado em uma UTI (GASPAR et al., 2022) e também outro estudo alertando para o isolamento de KPRC ST11 portador do gene *bla*_{NDM-7} inserido em um plasmídeo IncX3 de

outra UTI (CAMARGO et al., 2022b). Cepas KPRC ST11 portadoras de *bla*_{KPC-2}, presentes em plasmídeos, têm sido relatadas como cepas KPRC prevalentes no Brasil há mais de 10 anos (ANDRADE et al., 2011; CALISTRINI et al., 2022; DE CAMPOS et al., 2018; LEE et al., 2021; SEKI et al., 2011; TOLENTINO et al., 2019).

Para além do ambiente clínico, KPRC ST11 também já foi isolada de fontes ambientais, como efluentes provenientes de WWTP, em diferentes partes do mundo: isolada de efluentes tratados, carregando o gene *bla*_{KPC-2} inserido em plasmídeos IncF e IncN no Japão (SEKIZUKA et al., 2018); também isolada de efluentes tratados, carregando *bla*_{OXA-48} inserido no plasmídeo IncL/M na Áustria (LEPUSCHITZ et al., 2019); isolada a partir de efluentes hospitalares, portadores dos genes *bla*_{OXA-48} e *bla*_{KPC-2} inseridos nos plasmídeos IncFIB e IncFII na Irlanda (HOOBAN et al., 2021) e em tubos coletores de efluentes, portadores do gene *bla*_{KPC} no plasmídeo pKPC-146 no Uruguai (SALAZAR et al., 2021). No Brasil, cepas *K. pneumoniae* ST11 já foram relatadas em matrizes ambientais como lagos urbanos, portando o gene *bla*_{KPC-2} inserido no plasmídeo IncN (NASCIMENTO et al., 2017), em águas de mangue portando o gene *bla*_{KPC-2} (CALISTRINI et al., 2022) e em águas costeiras recreativas carreando o gene *bla*_{NDM} (CAMPANA et al., 2017). Recentemente, o estudo de OLIVEIRA et al. 2023 recuperou treze cepas KPRC ST11 de EB e ET na mesma ETE em Brasília, co-carreando os genes *bla*_{KPC-2} e *bla*_{NDM-1}. Este dado corrobora os achados deste estudo, evidenciando o potencial de sobrevivência deste clone quando submetido ao tratamento convencional de efluentes domésticos em ETEs.

De acordo com o banco de dados, todos os genes encontrados neste estudo já foram relatados no ST11, porém não sendo co-carreados no mesmo isolado, como foi encontrado neste estudo. Dos isolados depositados no banco de dados ST11, dez já haviam sido relatados no Brasil portando o gene *bla*_{KPC}, mas apenas de origem humana. É importante observar que no presente estudo, o ST11 foi isolado de efluentes brutos portando três genes simultaneamente, enquanto nos efluentes tratados obteve-se isolados carreando dois destes genes. O fato de terem sido recuperados mais isolados nos efluentes tratados (n=5) do que nos efluentes brutos (n=1), pode representar que as cepas KPRC estão aumentando ao longo do tratamento na estação, sugerindo a baixa eficiência do nível de tratamento secundário utilizado na ETE1, na remoção deste tipo de bactéria resistente, podendo estar contribuindo para a disseminação ambiental de cepas patogênicas que possuem a capacidade de transportar genes de carbapenemases.

Vale ressaltar que as cepas KPRC pertencentes aos STs 244 e 281 de origem ambiental são descritas pela primeira vez no presente estudo, de acordo com o banco de dados do MLST. Isso demonstra a relevância de estudos de relação clonal utilizando a técnica MLST de cepas

multirresistentes clinicamente importantes isoladas de ETEs para a vigilância ambiental. Esta análise permite avaliar o status dessas cepas circulantes no país, além de acompanhar a contribuição das ETEs na disseminação ambiental de dessas cepas, o que pode representar um grande risco à saúde pública humana e ambiental.

Embora já esteja bem documentado na literatura o alto risco dos efluentes hospitalares e urbanos na disseminação de BRA e GRA ao meio ambiente, os dados dos sistemas brasileiros ainda são limitados, com a maioria dos estudos focados apenas no ambiente hospitalar. Evidências que demonstrem a disseminação de cepas KPRC em efluentes de ETEs para ambientes aquáticos ainda são escassas no Brasil. Portanto, diante do cenário apresentado no presente estudo, é urgente que mais pesquisas sobre o tema sejam desenvolvidas, a fim de se obter uma vigilância ambiental eficiente da disseminação da resistência antimicrobiana, decorrente do lançamento de efluentes de ETEs domésticas e hospitalares que não possuam mecanismos de desinfecção eficientes.

5.8 REMOÇÃO DA *Klebsiella pneumoniae* CCVSU 7173 E GENE *bla*_{KPC} POR POAs

Neste estudo foram realizados processos oxidativos avançados com uso de um resíduo da mineração com diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio (10, 20 e 30 mg.L⁻¹), e uma concentração de resíduo de minério (277 mg.L⁻¹), no escuro e na presença da radiação UVA, para otimização em solução salina 0,85%, e na concentração ideal de H₂O₂ nos efluente sintético e efluente tratado, para a avaliação da degradação de *K. pneumoniae* e seu gene de resistência *bla*_{KPC}.

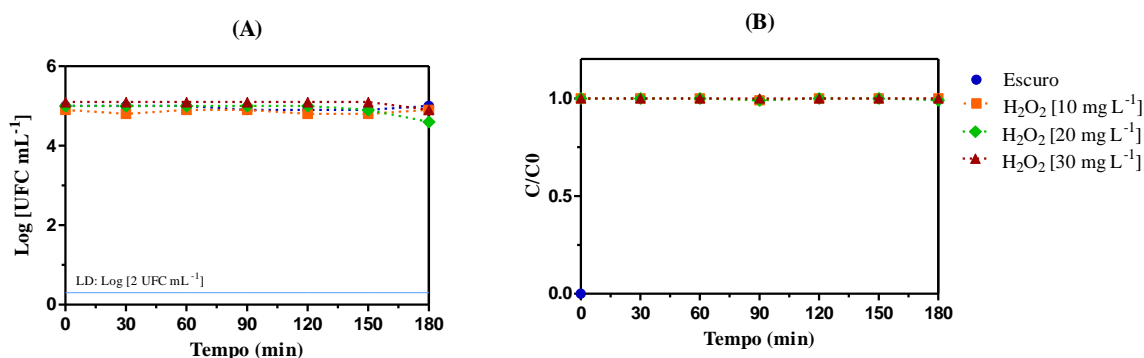
5.8.1 Ensaios de otimização da concentração de peróxido de hidrogênio

Dentre as cepas selvagens isoladas de efluentes neste estudo, a cepa CCVSU 7173 – *Klebsiella pneumoniae* foi selecionada para realização dos ensaios de inativação, pois além de ter sido recuperada em efluentes após tratamento secundário da ETE1, apresentou o perfil de resistência XDR, carreando o gene *bla*_{KPC}, é uma bactéria prioritária com base na lista publicada pela OMS (WHO, 2017a). *K. pneumoniae* é uma cepa conhecida por ser resistente aos tratamentos convencionais de efluentes (SERNA-GALVIS et al., 2019; VENIERI et al., 2017). Devido a isso, é necessário estudos para testar alternativas promissoras na degradação de BRA e genes de resistência, como os processos oxidativos avançados (GIANNAKIS et al., 2017). Além disso, de acordo com AGUILAR et al., 2018, para que se possa avaliar a eficiência de tratamentos oxidativos em condições reais, é importante a realização de estudos com cepas

selvagens, uma vez que estas se mostram mais resistentes a esses tratamentos que as cepas comerciais ATCC.

Os resultados dos experimentos em solução salina são apresentados nas Figuras 14, 15, 16 e 17, sendo as figuras (A) representam a quantificação bacteriana e em (B) o consumo de H_2O_2 ao longo dos tempos de experimento, no qual foi representado por concentração final (C) pela concentração inicial (C_0). A Figura 14 apresenta os resultados do efeito da inativação da bactéria usando somente o H_2O_2 (10, 20 e 30 mg.L^{-1}) na ausência de luz, enquanto a Figura 15 mostra os resultados na exposição à luz UVA/ H_2O_2 (10, 20 e 30 mg.L^{-1}). Na Figura 14(A), é possível observar que a quantificação bacteriana permanece constante em todos os tempos de experimento, entorno de 5 logs. Na presença do H_2O_2 , o ensaio que apresentou maior redução bacteriana foi a concentração 20 mg.L^{-1} , ocorrendo uma queda de 0,4 log em 180 min. Por outro lado, na concentração 10 mg.L^{-1} não houve redução e na concentração 30 mg.L^{-1} a redução foi de 0,2 log. Na Figura 14(B), observa-se o consumo de peróxido de apenas 1% na concentração 20 mg.L^{-1} em 90 e 180 min e nas concentrações 10 e 30 mg.L^{-1} não houve consumo de H_2O_2 .

Figura 14. (A) Quantificação de *Klebsiella pneumoniae* CCVSU 7173 sob tratamento de H_2O_2 no escuro em solução salina 0,85% ao longo dos tempos 0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 min. (B) Consumo de H_2O_2 . LD: Limite de detecção. [H_2O_2] = 10, 20 e 30 mg.L^{-1} ; radiação acumulada = 6.80 mW cm^{-2} ; pH: 7.

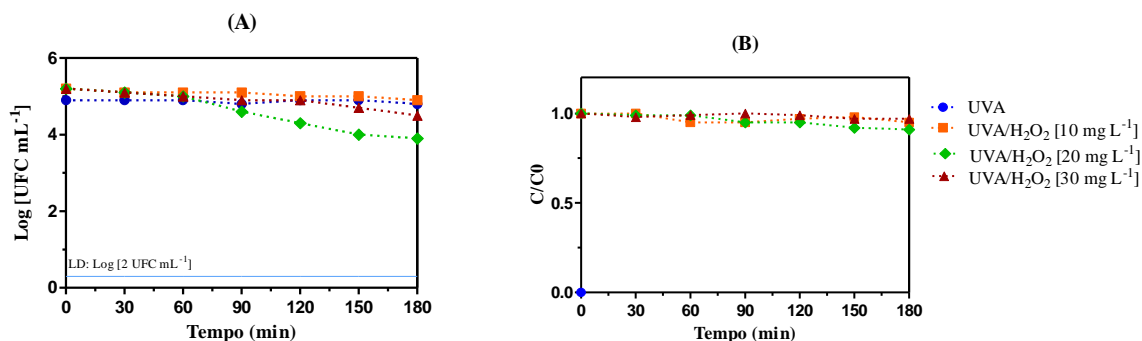


Fonte: Própria autora, 2023.

Na Figura 15(A), o ensaio controle quando exposto à radiação UVA apresentou redução de apenas 0,1 log em 180 min. Das concentrações de H_2O_2 testadas, a concentração 20 mg.L^{-1} foi a que apresentou a maior redução do ensaio, em relação ao minuto 0, de 1,3 log em 180 min, seguida das concentrações 30 e 10 mg.L^{-1} que apresentaram reduções de 0,6 log e 0,3 log, respectivamente. Na Figura 15(B), houve consumo de H_2O_2 nas três concentrações, sendo a

concentração 20 mg.L^{-1} foi a que apresentou maior consumo de 9% em 180 min, seguida de 5% e 3% nas concentrações 10 e 30 mg.L^{-1} , respectivamente.

Figura 15. (A) Quantificação de *Klebsiella pneumoniae* CCVSU 7173 sob tratamento UVA/ H_2O_2 em solução salina 0,85% ao longo dos tempos 0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 min. (B) Consumo de H_2O_2 . LD: Limite de detecção. $[\text{H}_2\text{O}_2] = 10, 20 \text{ e } 30 \text{ mg.L}^{-1}$; radiação acumulada = 6.80 mW cm^{-2} ; pH: 7.



Fonte: Própria autora, 2023.

A UVA proveniente da luz solar pode afetar as enzimas catalase e superóxido dismutase, afetando assim a regulação intracelular de H_2O_2 e de radical superóxido, que pode oxidar aglomerados de Fe/S e liberando íons ferrosos intracelulares, que na presença de H_2O_2 , podem levar à reações intracelulares de Fenton (ALVEAR-DAZA et al., 2021). Apesar disso, o efeito da fotólise e das concentrações de H_2O_2 /UVA não eliminou a *K. pneumoniae* XDR ao longo de 180 min de experimento, necessitando de um tempo de experimento maior para observar uma possível inativação desta bactéria para estas condições de experimento. Essa alta resistência pode ser devido a características estruturais particulares da *K. pneumoniae*, como a produção de polímeros extracelulares, alteração de lipídeos na membrana e agregação celular (MARCH et al., 2013), protegendo-a contra os ataques dos radicais hidroxila produzidos no processo de H_2O_2 /UVA, tornando-as mais resistentes aos tratamentos de efluentes (SERNA-GALVIS et al., 2019; VENIERI et al., 2017).

O estudo de FERRO et al., 2017, avaliou o efeito do processo UVA/ H_2O_2 (20 mg.L^{-1}) na inativação da cepa *E. coli* resistentes a antimicrobianos em um reator cilíndrico. Foi observada uma redução de 4 logs após 120 min de irradiação e inativação da bactéria em 240 min. A concentração de peróxido de hidrogênio foi monitorada, apesar da inativação da bactéria, houve um consumo de apenas 1 mg.L^{-1} de H_2O_2 . No presente estudo, a utilização de H_2O_2 (20 mg.L^{-1}) não foi o suficiente para inativar *K. pneumoniae*, mas obteve uma redução de

1,3 log e um consumo de 2 mg.L⁻¹ de H₂O₂ este baixo consumo pode ser devido a regeneração de H₂O₂, que no processo de fotocatalise, caso a concentração inicial de H₂O₂ for suficientemente alta, pode ocorrer uma regeneração contínua de H₂O₂ (FERRO et al., 2017).

O estudo de SPUHLER; ANDRÉS RENGIFO-HERRERA; PULGARIN, 2010, avaliou a fotoinativação de *E. coli* em água MiliQ (pH 5,5) em um reator circular com o ensaio: UVC/H₂O₂ (10 mg.L⁻¹), intensidade da radiação de 550 Wm², na qual foi alcançada a inativação da bactéria em 120 min de experimento, enquanto que no presente trabalho, a concentração de 10 mg.L⁻¹ H₂O₂ não houve redução da população bacteriana de *K. pneumoniae*.

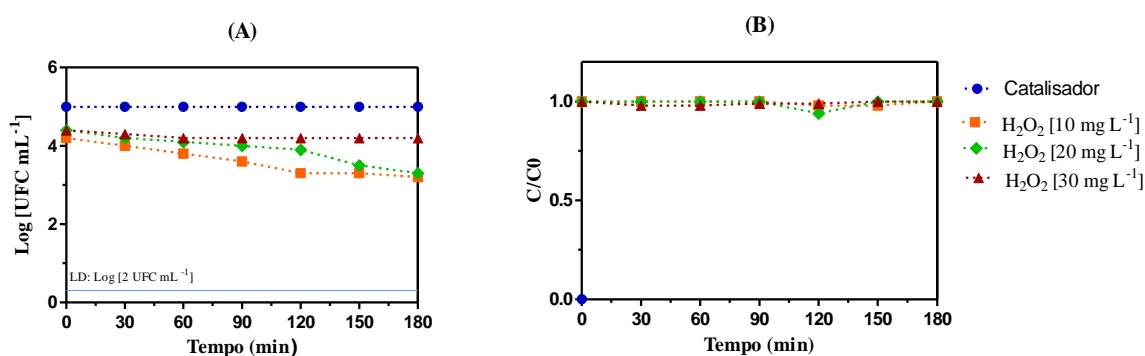
Outro estudo, realizado por ALVEAR-DAZA et al., 2021, realizou um experimento de inativação de *E. coli* e *K. pneumoniae* com H₂O₂ (10 mg.L⁻¹) exposta à irradiação solar simulada e na ausência de luz em água de poço, que contém ferro natural e avaliou sua participação na inativação em conjunto com H₂O₂. Apenas com a irradiação solar, *E. coli* e *K. pneumoniae* apresentaram uma redução de 4,5 e 6 logs, respectivamente, em 140 min. No experimento do H₂O₂ sem a irradiação de luz solar, as cepas tiveram uma redução de 3 logs em 140 min de experimento. Já no experimento luz solar/H₂O₂, a cepa *E. coli* sofreu inativação completa após 60 min de irradiação solar, enquanto a cepa *K. pneumoniae* precisou de 120 min.

A bactéria *K. pneumoniae* apresenta uma maior capacidade de resistir a estresse oxidativo que a *E. coli*, e um dos principais motivos pra isso é a presença de três diferentes enzimas catalases na *K pneumoniae*, ao invés de apenas duas frequentemente encontradas em *E. coli*, além do fato da *K. pneumoniae* apresentar uma camada polissacarídica proeminente que poderia oferecer mais proteção contra o ataque oxidativo de espécies radicais extracelulares fotoinduzidas (PACZOSA; MECSAS, 2016). A concentração de íon ferroso (Fe²⁺), que estava naturalmente presente nas águas, também foi avaliada e observou-se um ligeiro aumento de sua concentração durante os experimentos, que pode ser devido as reações de fotorredução ocorrendo em superfícies de (hidro)óxidos de ferro (reações foto-Fenton heterogêneas) e eventualmente liberando íons ferrosos adsorvido. Diferentemente do presente estudo, a concentração de 10 mg.L⁻¹ de H₂O₂ em salina na presença de UVA não obteve resultados significativos na redução de *K. pneumoniae*, mostrando que a presença de ferro natural na matriz ambiental juntamente com a luz solar pode tornar o H₂O₂ em menores concentrações mais eficientes, por isso a importância de se estudar o efeito da inativação de microrganismos na presença de óxidos de ferro nas reações que podem estar naturalmente presentes na natureza.

A Figura 16 apresenta os resultados dos experimentos com H₂O₂ (10, 20 e 30 mg.L⁻¹) e o catalisador (277 mg.L⁻¹) na ausência de luz, e a Figura 17 na presença de luz UVA. O ensaio do catalisador no escuro sem H₂O₂, demonstrou que a quantificação bacteriana permaneceu

constante em 180 min. Nos experimentos da combinação do catalisador com as diferentes concentrações de H_2O_2 testadas observou que a concentração de 20 mg.L^{-1} foi a que apresentou a maior redução com 1,1 log em 180 min, seguida das concentrações 10 e 30 mg.L^{-1} que apresentaram reduções de 1,0 log e 0,1 log, respectivamente (Figura 16A). Nota-se que houve consumo de H_2O_2 de 6% e 2% nas concentrações 20 e 10 mg.L^{-1} , respectivamente, em 120 min, e de 2% na concentração 30 mg.L^{-1} em 30 e 60 min (Figura 16B).

Figura 16. (A) Quantificação de *Klebsiella pneumoniae* CCVSU 7173 sob tratamento de H_2O_2 /catalisador no escuro em solução salina 0,85% ao longo dos tempos 0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 min. (B) Consumo de H_2O_2 . LD: Limite de detecção. $[\text{H}_2\text{O}_2] = 10, 20 \text{ e } 30 \text{ mg.L}^{-1}$; [catalisador] = 277 mg.L^{-1} ; radiação acumulada = 6.80 mW cm^{-2} ; pH: 7.



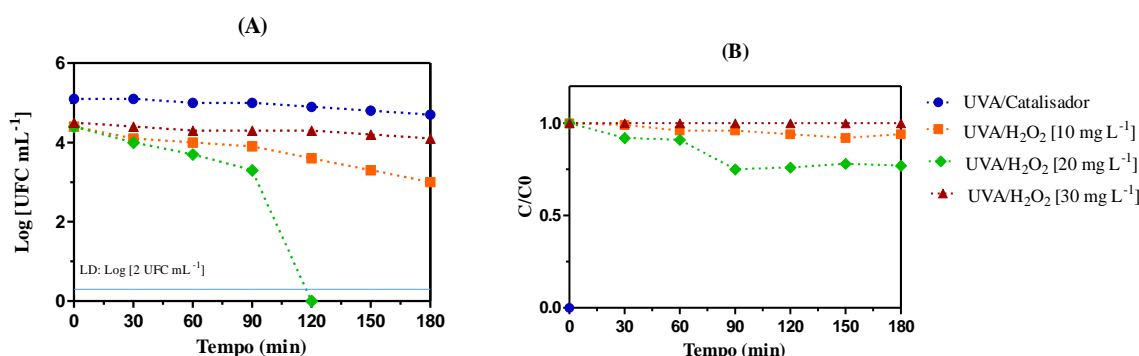
Fonte: Própria autora, 2023.

No ensaio do catalisador utilizado individualmente exposto à radiação UVA, a quantificação bacteriana teve uma redução de 0,4 log em 180 min. As reações com catalisador/ H_2O_2 /UVA com as diferentes concentrações de H_2O_2 , a concentração de 20 mg.L^{-1} em 90 min revelou uma queda do crescimento bacteriano de 1,1 log e em 120 min a bactéria foi completamente inativada, apresentando uma redução de 4,4 logs (Figura 17A). Este fato pode ser atribuído a presença do Fe^{3+} presente na superfície do catalisador, que é essencial para a atividade desinfetante, e quando exposto à radiação UVA é constantemente reduzido a Fe^{2+} , que reage com o H_2O_2 presente, levando a uma taxa de reação aumentada, e conforme a concentração de Fe^{2+} na superfície do mineral atinge um determinado nível, ocorre uma fase mais ativa que promove a geração de espécies reativas de oxigênio, como o radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$), que são altamente tóxicos para as bactérias, pois oxidam e danificam componentes celulares essenciais das bactérias como lipídios e proteínas, lesando a membrana e causando

danos a ácidos nucleicos e interferindo em processos metabólicos essenciais, levando à sua inativação (GARCÍA-MUÑOZ et al., 2016).

As concentrações 10 e 30 mg.L⁻¹ apresentaram reduções de 1,4 log e 0,3 log, respectivamente, em 180 min. É possível observar que houve consumo de H₂O₂ de 6% na concentração de 10 mg.L⁻¹ em 180 min e na concentração de 20 mg.L⁻¹ houve um consumo de 24% em 120 min, momento em que zera a quantificação bacteriana. E na concentração de 30 mg.L⁻¹ não houve consumo de H₂O₂ (Figura 17B). Pode-se observar que nos experimentos H₂O₂, UVA/H₂O₂, catalisador/H₂O₂ e UVA/catalisador/H₂O₂, o aumento da concentração do H₂O₂ de 10 mg.L⁻¹ para 20 mg.L⁻¹ há uma maior redução da população bacteriana do tempo 0 min a 180 min, e maior consumo de H₂O₂. Enquanto que o aumento da concentração de H₂O₂ para 30 mg.L⁻¹ há uma redução da população bacteriana pouco significativa ao longo do tempo.

Figura 17. (A) Quantificação de *Klebsiella pneumoniae* CCVSU 7173 sob tratamento UVA/H₂O₂/catalisador em solução salina 0,85% ao longo dos tempos 0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 min. (B) Consumo de H₂O₂. LD: Limite de detecção. [H₂O₂] = 10, 20 e 30 mg.L⁻¹; [catalisador] = 277 mg.L⁻¹; radiação acumulada = 6.80 mW cm⁻²; pH: 7.



Fonte: Própria autora, 2023.

A baixa redução da população bacteriana na menor concentração de H₂O₂ (10 mg.L⁻¹) pode ser devido a uma baixa produção de radicais hidroxila que esta concentração gerou no contato com a luz UVA (AGUILAR et al., 2018), necessitando de uma maior quantidade de radicais para ocorrer uma redução mais significativa de *K. pneumoniae* em menor tempo (SERNA-GALVIS et al., 2019). Outros trabalhos também não observaram uma redução significativa da ação do H₂O₂ (10 mg.L⁻¹) em *E. coli* no processo foto-Fenton (AGUILAR et al., 2018; GARCÍA-FERNÁNDEZ et al., 2012; SPUHLER; ANDRÉS RENGIFO-HERRERA; PULGARIN, 2010). O aumento da concentração de H₂O₂ para 20 mg.L⁻¹ melhorou

consideravelmente a redução bacteriana, pois pode induzir uma maior formação de radicais hidroxila (O'DOWD; PILLAI, 2020), confirmada pelo maior consumo de H_2O_2 ao final da reação. Porém, quando a concentração de H_2O_2 é aumentada para 30 mg.L^{-1} , foi observada uma baixa redução bacteriana, pois uma sobrecarga de H_2O_2 pode ocorrer uma recombinação, consequente eliminação de radicais hidroxila e reduzir o rendimento da desinfecção (GIANNAKIS et al., 2016b; NOSAKA; NOSAKA, 2016), podendo ser observada pelo não consumo de H_2O_2 ao final da reação. AGUILAR et al., 2018, realizou experimentos para eliminação de *K. pneumoniae* com UVC em diferentes concentrações de peróxido e observou que não foram detectadas diferenças significativas com 10 e 30 mg.L^{-1} de H_2O_2 .

O estudo de GARCÍA-MUÑOZ et al., 2022, realizou experimento de fotocatalise heterogênea em efluente sintético utilizando $0,01 \text{ g L}^{-1}$ de ilmenita individualmente exposto à radiação UVA (14 W m^{-2}) para remoção de *Enterococcus faecalis*, uma bactéria Gram-positiva. Foi alcançada uma redução de 1,7 log em 120 min da população bacteriana. É possível observar que a eficiência do processo catalisador/UVA foi melhor para *E. faecalis* do que para *K. pneumoniae*. Isso pode ser devido às diferenças estruturais destas bactérias, pois as bactérias Gram-negativas apresentam uma barreira da membrana externa e isso pode torná-las mais tolerante a desinfetantes em comparação com as bactérias Gram-positivas (CHU et al., 2019). O estudo de GARCÍA-MUÑOZ et al., 2022, também realizou o experimento Foto-Fenton heterogêneo utilizando $0,1 \text{ mM}$ de peroximonosulfato (PMS) como oxidante (UVA/PMS/ilmenita) em efluente sintético (pH 5,5). O melhor desempenho de desinfecção de *E. faecalis* ocorreu na combinação com $0,5 \text{ g L}^{-1}$ de ilmenita ocorrendo uma redução de 3 logs, seguida de 2,5 logs com $0,01 \text{ g L}^{-1}$ de ilmenita em 120 min. Quando foi realizado o experimento UVA/PMS/ilmenita ($0,1 \text{ mM}/0,01 \text{ g L}^{-1}$) em pH 7, ocorreu melhora na eficiência de redução bacteriana total de 6 logs em 120 min.

XIA et al., 2018, realizaram um experimento com reator de bancada, com persulfato de sódio (PS) ($0,5 \text{ mM}$) e ilmenita (1 g L^{-1}) na presença de luz visível através do uso de lâmpada de LED branca (3 mW cm^{-2}) para inativação de *Escherichia coli* em 30 min de experimento. O PS testado separadamente no escuro e na presença da luz visível não inativou a espécie *E. coli*, com uma redução apenas de 0,3 log. Quando a ilmenita foi testada separadamente no escuro, houve um decréscimo apenas de 0,2 log de carga bacteriana em 30 min, e na presença da luz visível, a ilmenita mostrou uma atividade fotocatalítica de 2,5 logs de redução de *E. coli*. A introdução de PS melhorou consideravelmente o desempenho catalítico da ilmenita, inativando a *E. coli* em 20 min na presença da luz visível.

GARCÍA-MUÑOZ et al., 2022 e XIA et al., 2018, observaram em seus experimentos de inativação de *E. coli* e *E. faecalis* que concentrações de ilmenita superiores a 1 g L^{-1} podem inibir a irradiação da luz e a dispersão da suspensão, prejudicando a inativação bacteriana. Concentrações de 0,5 a 1 g L^{-1} são sugeridas para ativação de oxidantes, inativação de bactérias e contaminantes e para ser recolhida e reutilizada novamente no tratamento a baixo custo. O presente trabalho utilizou uma concentração de $0,3 \text{ g L}^{-1}$ de catalisador no sistema UVA/ H_2O_2 /catalisador e observou uma eficiente inativação de *K. pneumoniae* XDR, sendo também uma concentração recomendada para desinfecção.

Devido a escassez de informação disponível sobre o sistema usando resíduo de mineração para remoção de cepas selvagens multirresistentes, não é possível comparar este estudo com outros trabalhos. Porém há outros trabalhos com experimentos de Foto-Fenton heterogêneo com outros óxidos de ferro. Por exemplo, o estudo de RUALES-LONFAT et al., 2015, avaliou a atividade fotocatalítica de diferentes catalisadores óxidos de ferro goetita ($\alpha\text{-FeOOH}$), hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$), wüstita (FeO) e magnetita (Fe_3O_4) na concentração $0,6 \text{ mg.L}^{-1}$, visando a inativação de uma cepa *E. coli* não patogênica, em pH 6,5, na ausência e presença de H_2O_2 (10 mg.L^{-1}) sob um simulador solar. No experimento utilizando água Mili-Q no escuro, os óxidos de ferro não resultaram na inativação da cepa, tanto na ausência quanto na presença de H_2O_2 , indicando que os processos heterogêneos de Fenton ((hidr)óxidos de ferro e H_2O_2) não levaram à inativação bacteriana. Na presença de luz, durante 120 min de experimento, a goetita e a hematita individualmente obtiveram a inativação total bacteriana, a wüstita obteve uma redução de 2 logs e a magnetita não apresentou significativa redução bacteriana. A adição de 10 mg.L^{-1} de H_2O_2 ao sistema dos óxidos de ferro com a presença da luz aumentou a eficiência de inativação bacteriana com redução total utilizando goetita, hematita e wüstita em 90 min de experimento, e a magnetita com 120 min. Desta maneira, o estudo sugere que a hematita e a goetita possam ser aplicadas sozinhas como semicondutores para desinfetar água de forma eficiente, a magnetita necessitou da presença de H_2O_2 para inativar a *E. coli*, equivalente ao catalisador utilizado no presente estudo necessitou da sua combinação com H_2O_2 , porém na concentração de 20 mg.L^{-1} de H_2O_2 para obter a inativação da cepa *K. pneumoniae* XDR também em 120 min.

THAKUR; ÖRMECI; VERMA, 2020, realizaram experimentos foto – Fenton em água destilada na presença de radiação UV ($10 - 24 \text{ W m}^{-2}$) para inativação de *E. coli* em um reator de bancada com aplicações de FeTiO_2 , oriundo de resíduos industriais como fonte de ferro. O resíduo foi misturado com argila para formar esferas, junto com H_2O_2 ($0,3 \text{ g L}^{-1}$) em pH 6,5.

No experimento otimizado foi observada uma redução bacteriana de 6,2 logs em 90 min de reação.

Também há outros trabalhos que realizaram testes de inativação de bactérias utilizando o mecanismo de Foto-Fenton homogêneo. Por exemplo, o estudo de CASADO et al., 2021, realizou teste de desinfecção de *E. coli* ATCC em reator cilíndrico utilizando um simulador solar em pH neutro, no sistema foto-Fenton UVA/H₂O₂/FeSO₄ (30 mg.L⁻¹/ 10 e 20 mg.L⁻¹) sob diferentes níveis de irradiação UVA entre 10 e 50 Wm⁻² em solução salina 0,9%. Em ambas as concentrações de ferro, foi observado uma inativação insignificante de *E. coli* para a irradiância mais baixa de 10 W m⁻², e um nível de inativação relativamente baixo na faixa de 15 a 20 W m⁻², que foi atribuído a uma baixa geração de radicais hidroxila em comparação com a eficiência dos processos bacterianos autorreparadores. Para a irradiação de 30 Wm⁻², a concentração de ferro 10 mg.L⁻¹ levou inativação da bactéria (decaimento de 6 logs) em 90 min, e a concentração de 20 mg.L⁻¹ reduziu o tempo de inativação para 60 min. Para a irradiação de 50 Wm⁻², a concentração de ferro 10 mg.L⁻¹ levou inativação da bactéria em 50 min, e a concentração de 20 mg.L⁻¹ reduziu o tempo de inativação para 30 min. Diferentemente do presente estudo em que numa radiação de 68 W/m² de UVA, a concentração de 30 mg.L⁻¹ de H₂O₂ não observou redução de *K. pneumoniae*.

GIANNAKIS et al., 2018, realizou testes foto-Fenton com simulação de luz solar (750 W/m²) e UVA/ H₂O₂/Fe²⁺ (10 mg.L⁻¹/1 mg.L⁻¹), com FeSO₄•7H₂O usado como fonte de ferro, em reator de bancada, em água e em pH 7, para eliminação das espécies bacterianas: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* sensíveis e resistentes (MRSA e ESBL, respectivamente) e antimicrobianos e de *Klebsiella pneumoniae* ESBL resistente. Neste estudo, foi observado que a desinfecção de *S. aureus* e *E. coli* resistentes aos antimicrobianos mostrou uma mesma tendência, semelhante à das bactérias sensíveis aos antimicrobianos, demonstrando que diferenças estruturais e de suscetibilidade não afetaram o estresse oxidativo gerado no processo. Ao comparar o efeito da luz solar no processo foto-Fenton, pode-se observar que as bactérias resistentes MRSA e *E. coli* ESBL foram inativadas por foto-Fenton solar em 90 min, enquanto com luz solar a desinfecção foi obtida somente após 240 min de experimento, demonstrando que o processo solar foto-Fenton é mais eficiente que a luz solar atuando sozinha. Para a *K. pneumoniae* ESBL, o ensaio solar não apresentou redução bacteriana em 240 min e no ensaio foto-Fenton solar houve a inativação da cepa em 120 min, mesmo tempo de inativação bacteriana deste estudo, que também não observou inativação bacteriana no ensaio com a radiação UVA agindo isoladamente. Este fato demonstra que esta cepa é mais resistente ao processo solar que as outras bactérias resistentes, que pode ser devido a estrutura celular da *K.*

pneumoniae, que apresenta uma cápsula polissacarídica externa a membrana, que evita a dessecação celular, permite a aderência a superfícies, e desta maneira, possivelmente conferindo resistência ao processo de inativação apenas por irradiação solar (MARCH et al., 2013).

O estudo de SERNA-GALVIS et al., 2019, comparou diferentes concentrações de reagentes no processo foto-Fenton e observou a maior redução de KPCR nas concentrações 5 mg.L⁻¹ de íons ferrosos e 50 mg.L⁻¹ de H₂O₂ em água destilada em um período de 60 min, ou seja, utilizando concentrações maiores que as utilizadas no presente estudo. SPUHLER; ANDRÉS RENGIFO-HERRERA; PULGARIN, 2010, também avaliaram a ação foto-Fenton dos diferentes íons de ferro dissolvidos (Fe²⁺ e Fe³⁺ - 0,6 mg.L⁻¹) e H₂O₂ (10 mg.L⁻¹) na inativação de *E. coli* (10⁶ logs ml⁻¹ de população bacteriana inicial) em água MiliQ com os sistemas: UVA/Fe²⁺/H₂O₂; UVA/Fe²⁺; UVA/Fe³⁺/H₂O₂ e UVA/Fe³⁺. Observou-se as seguintes reduções bacterianas: 6 logs em 90 min para os sistemas UVA/Fe²⁺/H₂O₂ e UVA/Fe³⁺/H₂O₂; em 120 min para UVA/Fe²⁺ e em 180 min para UVA/Fe³⁺.

De todos os experimentos, o que induziu a maior desinfecção de bactéria e maior consumo de H₂O₂, foi o UVA/catalisador/H₂O₂ (277 mg.L⁻¹/20 mg.L⁻¹), proporcionando uma completa redução da população bacteriana (4,4 logs) em 120 min. Enquanto o processo com UVA/H₂O₂ (20 mg.L⁻¹) obteve uma moderada redução de 1,3 log em 180 min de experimento. Já o processo catalisador/H₂O₂ (20 mg.L⁻¹) obteve uma redução de 1,1 log em 180 min de experimento, ou seja, o efeito desinfetante foi menos eficiente quando comparado ao processo com luz.

O ensaio UVA/catalisador/H₂O₂ foi o que apresentou maior consumo de H₂O₂ (Fig. 17B), confirmando a maior produção de radicais hidroxila promovida pela inclusão da luz UVA no sistema Fenton, e como efeito, a eliminação completa da KPRC em 120 min de tratamento. Desta maneira, é possível observar que apesar dos ensaios H₂O₂, UVA/H₂O₂ e catalisador/H₂O₂ apresentarem uma redução da população bacteriana, o ensaio Foto-Fenton apresentou melhor eficiência na eliminação de KPRC. Estes resultados corroboram com outros estudos de Foto-Fenton em água na literatura (AGUILAR et al., 2018; RUALES-LONFAT et al., 2015).

AGUILAR et al., 2018, realizaram dois experimentos foto-Fenton homogêneos: UVC/H₂O₂/Fe³⁺ (10 mg.L⁻¹/2 mg.L⁻¹ e 30 mg.L⁻¹/6 mg.L⁻¹, respectivamente) com solução de cloreto de ferro(III) hexa-hidratada em um cepa comercial *E. coli* e outra selvagem *K. pneumoniae*. O melhor resultado obtido para *K. pneumoniae* foi no experimento com as menores concentrações de H₂O₂/Fe³⁺ (10 mg.L⁻¹/2 mg.L⁻¹), em que se conseguiu um aumento da constante de velocidade cinética de 50% em relação ao experimento somente com a presença de radiação

UVC e de 44,4% em relação ao experimento UVC/ H₂O₂. Neste estudo foi observado uma melhora na taxa de inativação com a adição de Fe³⁺ no sistema para as duas cepas, equivalente ao encontrado no presente estudo com a adição do catalisador. Além disso, a cepa *K. pneumoniae* sofreu uma redução de 4 logs em 26 segundos, um tempo muito menor do que o observado no presente estudo. Este estudo demonstrou que a utilização da luz UVC é mais eficiente que a radiação UVA na degradação da bactéria. Porém apesar de ser mais eficiente, é mais oneroso de ser implementado em uma estação de tratamento municipal. Também foi observado que a inativação foi sempre maior para *E. coli*, sendo *K. pneumoniae* mais resistente aos tratamentos, principalmente devido a capsula de proteção que essas cepas apresentam. Além disso, o estudo evidencia que cepas isoladas da natureza podem ser mais resistentes aos processos de tratamento do que as cepas comerciais, por isso é importante a utilização de cepas selvagens em ensaios de tratamento, como realizado no presente estudo.

Depois da avaliação da influência das concentrações de H₂O₂ individualmente nos processos com o resíduo da mineração em solução salina 0,85%, a concentração 20 mg.L⁻¹ de H₂O₂ foi a condição mais eficaz para desinfecção de KPRC. Assim, esta condição foi escolhida para os ensaios nas matrizes complexas, como efluente sintético e efluente tratado de ETE.

5.8.2 Avaliação da eficiência dos POAs em efluentes sintético e tratado

A caracterização físico-química temperatura, pH, demanda química de oxigênio (DQO), amônia (NH₃), amônio (NH₄⁺) e fosfato (PO₄³⁻) dos efluentes sintético e tratado são apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7. Parâmetros físico-químicos dos efluentes sintético e tratado.

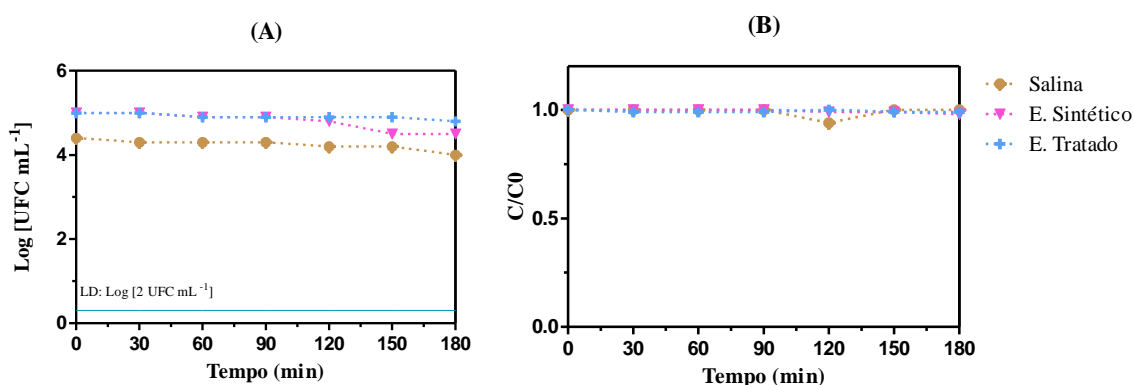
Parâmetros	Efluente Sintético	Efluente Tratado
Temperatura (°C)	21	20,9
pH	7,1	6,8
DQO (mg.L ⁻¹)	28	18
NH ₃ (mg.L ⁻¹)	0	0,4
NH ₄ ⁺ (mg.L ⁻¹)	0	0,4
PO ₄ ³⁻ (mg.L ⁻¹)	4,7	0

Fonte: Própria autora, 2023.

As Figuras 18 e 19 apresentam os resultados dos experimentos com H₂O₂ (20 mg.L⁻¹) e o catalisador (277 mg.L⁻¹) em três matrizes aquosas: solução salina 0,85%, efluente sintético e efluente tratado, sendo a Figura 18 o experimento na ausência de luz e a Figura 19 na presença da radiação UVA. Na Figura 18(A) é demonstrada uma queda de 0,4 log da população inicial

min para o efluente sintético e 0,1 log para o efluente tratado em 180 min. Na Figura 18(B) é observada um consumo de 2% e 1 % de H_2O_2 em 180 min, no efluente sintético e tratado, respectivamente.

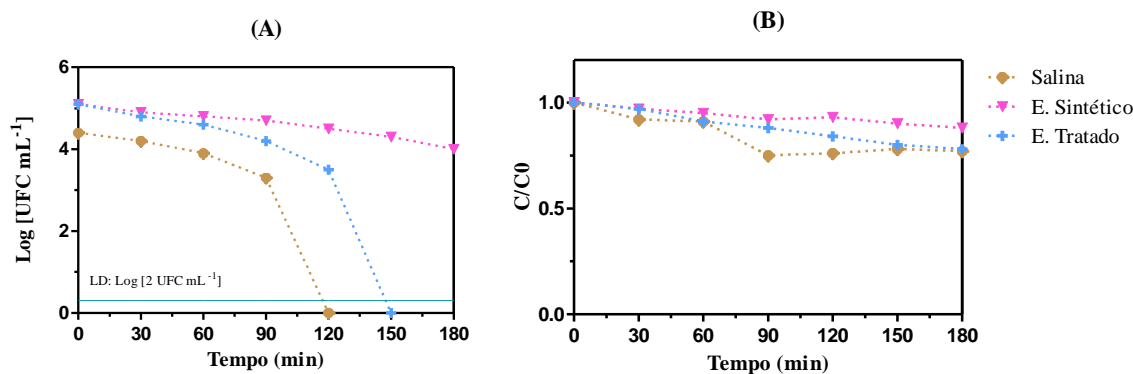
Figura 18. (A) Quantificação de *Klebsiella pneumoniae* CCVSU 7173 sob tratamento H_2O_2 /catalisador no escuro em solução salina 0,85%, efluente sintético e efluente tratado ao longo dos tempos 0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 min. (B) Consumo de H_2O_2 . LD: Limite de detecção. $[H_2O_2] = 20 \text{ mg.L}^{-1}$; $[\text{catalisador}] = 277 \text{ mg.L}^{-1}$; radiação acumulada = 6.80 mW cm^{-2} ; pH: 7.



Fonte: Própria autora, 2023.

Na Figura 19(A) há queda de 1,1 log da população inicial em 180 min da aplicação do catalisador no efluente sintético e de 5,1 logs em 150 min no efluente tratado. Na Figura 19(B) é observada no efluente sintético um consumo de 12% de H_2O_2 em 180 min, e no efluente tratado um consumo de 20% em 150 min, momento da reação em que a quantificação bacteriana é reduzida a zero. Nesta Figura, é possível observar que o processo UVA/ H_2O_2 /catalisador otimizado foi prejudicado, possivelmente pelos íons presentes no efluente sintético, como o fosfato (PO_4^{3-}), que estão ausentes no efluente tratado, e possivelmente também pela matéria orgânica, fazendo com que a eficiência da degradação de KPRC no efluente sintético fosse menor do que no efluente tratado e na solução salina.

Figura 19. (A) Quantificação de *Klebsiella pneumoniae* CCVSU 7173 sob tratamento UVA/H₂O₂/catalisador em solução salina 0,85%, efluente sintético e efluente tratado ao longo dos tempos 0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 min. (B) Consumo de H₂O₂. LD: Limite de detecção. [H₂O₂] = 20 mg.L⁻¹; [catalisador] = 277 mg.L⁻¹; radiação acumulada = 6.80 mW cm⁻²; pH: 7.



Fonte: Própria autora, 2023.

A complexidade dos efluentes tratados de ETEs reduz a eficiência do processo foto-Fenton na desinfecção de águas. Os radicais hidroxila gerados no processo não são seletivos e também podem reagir com os compostos orgânicos e ânions inorgânicos na matriz, que funcionam como sequestradores desses radicais, podendo formar espécies menos reativas e afetando a eficiência de degradação de bactérias (KIEJZA et al., 2021). Uma matriz rica em matéria orgânica pode inibir a inativação de microrganismos, pois ela se liga na superfície do catalisador e consome as espécies reativas de oxigênio geradas (XIA et al., 2018). Na reação de foto-Fenton, compostos inorgânicos presentes na água, como sulfatos, nitratos e cloretos podem reagir com ferro, ou com H₂O₂, limitando a quantidade de HO• gerada pela reação de foto-Fenton e reduzindo sua capacidade de oxidar bactérias e matéria orgânica (GIANNAKIS et al., 2016b). Em particular a presença de fosfatos pode prejudicar mais ainda a eficiência do processo, pois esses compostos sequestram o ferro de forma mais eficiente, formando um complexo insolúvel e precipitam, além de eliminar radicais hidroxila, retardando assim a velocidade da reação. Desta maneira, é esperado que os efluentes secundários não contenham, fosfatos, porém quando o efluente apresenta fosfato em sua composição, mesmo em poucos mg.L⁻¹, é necessário adicionar mais ferro na solução (GIANNAKIS et al., 2016b). No presente trabalho, o efluente sintético apresentou 4,7 mg.L⁻¹ de fosfato, enquanto o efluente tratado não apresentou presença de fosfatos em sua composição, e isso pode ser uma explicação para os processos serem mais eficientes no efluente tratado que no efluente sintético.

O estudo de SPUHLER; ANDRÉS RENGIFO-HERRERA; PULGARIN, 2010, também realizou experimentos em água contendo íons minerais (pH 7) com uma cepa *E. coli*, em que observou-se a diminuição da eficiência dos sistemas de inativação, quando comparados aos experimentos com água ultrapura. Ocorreu inativação total bacteriana (6 logs) em 180 min para o sistema UVA/Fe²⁺/H₂O₂ e 240 min para UVA/Fe³⁺/H₂O₂ e uma queda de 4 logs em 300 min para UVA/Fe²⁺ e 2 logs para UVA/Fe³⁺. Demonstrando que o íon Fe²⁺ foi mais eficiente na inativação de *E. coli*, e que os sistemas foto-Fenton são mais eficientes quando comparados com sistemas que utilizam apenas os íons de ferro, na presença de radiação em matriz complexa. No presente estudo a inativação bacteriana no sistema UVA/H₂O₂/catalisador de *K. pneumoniae* foi mais eficiente utilizando o efluente tratado, ocorrendo em menor tempo (150 min), comparado a não inativação no efluente sintético no tempo de experimento (180 min).

Após 180 min de experimentos, realizados na presença de luz UVA, foi avaliada a ação residual dos sistemas, que foi a avaliação da ação desinfetante dos sistemas 24 horas depois, na ausência da luz UVA na KPRC. O teste mostrou que após 24 horas, sem o tratamento na solução salina 0,85%, efluentes tratados e sintéticos não houve crescimento da população bacteriana. Isso demonstra que mesmo após a ausência de luz UVA, os processos foram eficientes na inativação da KPRC, não permitindo o recrescimento da população bacteriana. Esse resultado pode ser explicado pelo fato de que os radicais hidroxila gerados pelos processos testados já haviam afetado a população bacteriana durante os 180 min de tratamento com luz, tornando-as inviáveis (SERNA-GALVIS et al., 2019). Interessante notar que mesmo no experimento em que a KPRC foi reduzida a zero em 120 min (UVA/catalisador/H₂O₂ - 277 mg.L⁻¹/20 mg.L⁻¹), não houve recrescimento em 24 horas na ausência de luz UVA, indicando a eficiência deste processo em causar danos irreparáveis na bactéria, impedindo a sua recuperação. Resultados semelhantes foram observados em SPUHLER; ANDRÉS RENGIFO-HERRERA; PULGARIN, 2010, que também avaliaram recrescimento em água mineral durante 48h de crescimento no escuro pós os experimentos de irradiação e o crescimento foi observado apenas nos sistemas com ausência de H₂O₂ (UVA/Fe²⁺, UVA/Fe³⁺ e UVA), não sendo observado crescimento nesses sistemas na presença de H₂O₂, sugerindo que o H₂O₂ residual após a irradiação tem um efeito residual induzindo reações de Fenton no escuro.

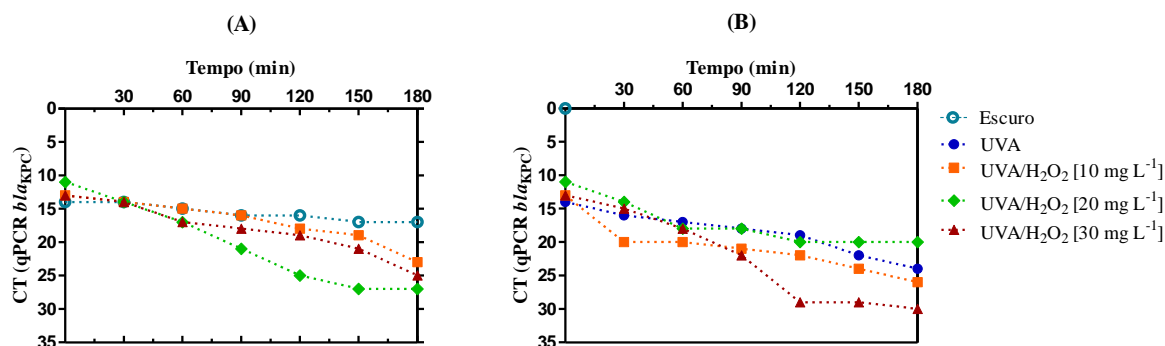
Os resultados deste estudo sugerem que sistema UVA/H₂O₂/catalisador (20 mg.L⁻¹/277 mg.L⁻¹) utilizado é ativo o suficiente para degradar KPRC em matrizes complexas, tornando as células bacterianas não viáveis.

5.8.3 Avaliação da eficiência dos POAs na remoção do gene *bla_{KPC}*

As bactérias que possuem em seu genoma GRA inseridos em plasmídeos podem transmitir horizontalmente seus genes de resistência para bactérias sensíveis e assim, disseminar a resistência antimicrobiana (KARKMAN et al., 2018). Devido a isso, durante os ensaios dos tratamentos oxidativos na bactéria *K. pneumoniae* CCVSU 7173, também foram avaliados seus efeitos no gene *bla_{KPC}*, inserido no seu genoma. Para confirmar o efeito do processo no gene, foi realizada qPCR do DNA extraído da bactéria selecionada e determinado o *Cycle Threshold* (CT). O parâmetro CT é um indicador da concentração relativa do gene alvo na reação de PCR. Seu valor é inversamente proporcional à quantidade do gene alvo na amostra (SERNA-GALVIS et al., 2019).

As Figuras 20 e 21 apresentam os resultados dos valores de CT da qPCR do gene *bla_{KPC}* do DNA extraído da bactéria submetida aos tratamentos realizados na solução salina 0,85%. Os gráficos de CT foram invertidos no eixo Y, a fim de melhor visualização compatível com a comparação inversamente proporcional do CT com o número de cópias do gene. Na Figura 20 apresentam os resultados dos experimentos utilizando apenas as três concentrações de H₂O₂, sendo a Figura 20(A) representam os experimentos na ausência de luz e a Figura 20(B) na presença da luz UVA. Na Figura 20(A) observa-se que o experimento que obteve um maior aumento de CT foi a concentração 20 mg.L⁻¹ de H₂O₂, com um CT de 27,6 em 180 min, seguido da concentração de 30 mg.L⁻¹, com um CT de 25,3. O menor valor de CT (17,3) em 180 min foi observado no experimento no escuro, com a ausência de H₂O₂. Na Figura 20(B) observa-se que a concentração de 30 mg.L⁻¹ apresentou maior CT (30,1) havendo um aumento de CT para esta concentração em relação ao experimento na ausência de luz, e seguida da concentração 10 mg.L⁻¹ com CT de 26,4, também com aumento de CT em relação ao experimento na ausência de luz. Nos experimentos de fotocatalise com a presença do H₂O₂ não foi observado ausência de CT nas três diferentes concentrações em 180 min de experimento, significando presença do gene *bla_{KPC}*, porém com possível diminuição do número de cópias do gene ao longo do processo, devido ao aumento constante do número de CT. Observa-se também um número maior de CTs nos experimentos na presença da luz UVA, exceto para a concentração 20 mg.L⁻¹ de H₂O₂, que o CT foi maior no experimento com ausência de luz.

Figura 20. Valores dos CT das qPCRs para o gene *bla_{KPC}* da *K. pneumoniae* CCVSU 7173 sob os tratamentos: (A) H₂O₂ no escuro e (B) UVA/H₂O₂ em solução salina 0,85% ao longo dos tempos 0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 min. [H₂O₂] = 10, 20 e 30 mg.L⁻¹; radiação acumulada = 6.80 mW cm⁻²; pH: 7.

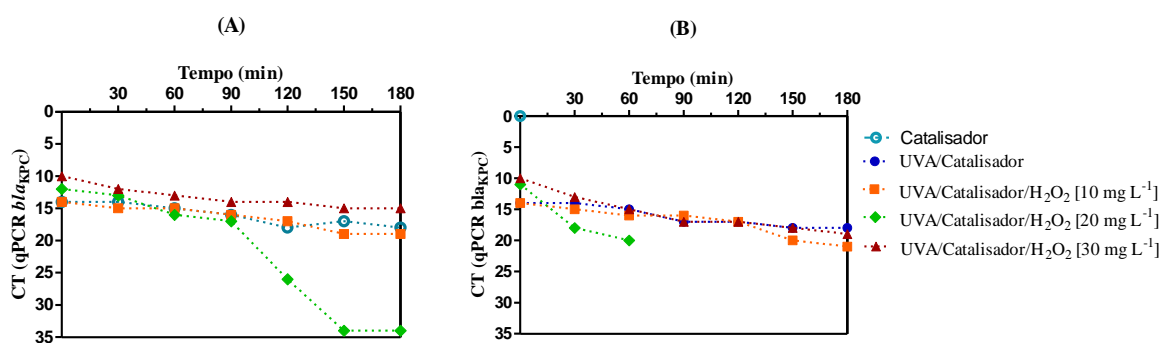


Fonte: Própria autora, 2023.

Na Figura 21 apresenta os resultados dos experimentos H₂O₂/catalisador e UVA/H₂O₂/catalisador utilizando as três concentrações de H₂O₂, sendo a Figura 21(A) representando os experimentos na ausência de luz e a Figura 21(B) na presença da luz UVA. Na Figura 21(A), observa-se que o experimento que obteve um maior aumento de CT foi o experimento na concentração 20 mg.L⁻¹ de H₂O₂, com CT de 34,2 em 180 min, seguido da concentração de 10 mg.L⁻¹, com um CT de 19,2. O menor valor de CT (15,3) em 180 min foi observado para a concentração de 30 mg.L⁻¹.

Na Figura 21(B) observa-se que no experimento na concentração de 20 mg.L⁻¹ de H₂O₂ há ausência de CT em 90 min, indicando ausência de gene na reação. Neste experimento, houve inativação bacteriana em 120 min, ou seja, 30 min antes da bactéria ser inativada, houve ausência do gene, indicando possível início do efeito de degradação da célula bacteriana. Não houve ausência de CT nos outros experimentos. Nos experimentos de H₂O₂/catalisador não foi observado ausência de CT nas três diferentes concentrações em 180 min de experimento, significando presença do gene *bla_{KPC}*, porém com possível diminuição do número de cópias do gene alvo ao longo do processo, devido ao aumento constante do número de CT. No processo UVA/H₂O₂/catalisador, houve ausência de CT em 90 min, 30 min antes da inativação da bactéria, demonstrando que esse processo foi eficaz na degradação da bactéria e uma possível degradação do gene em solução salina.

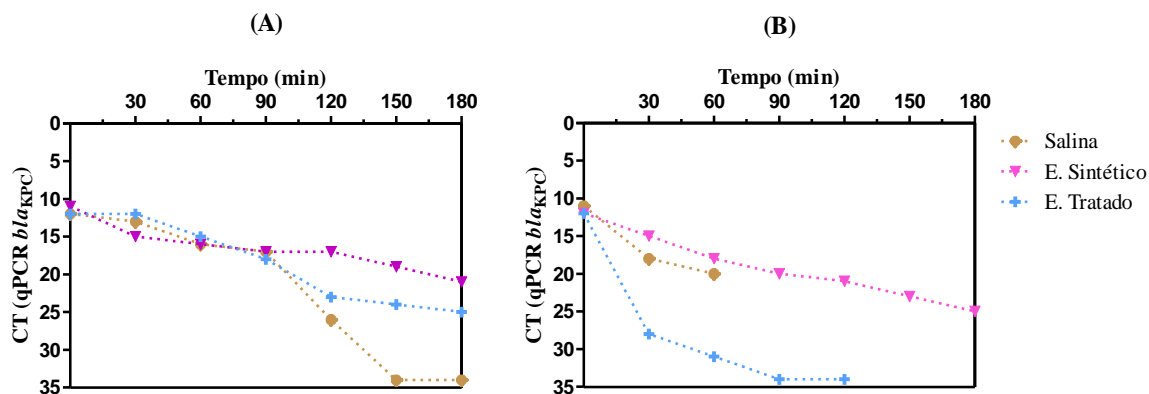
Figura 21. Valores dos CT das qPCRs para o gene *bla_{KPC}* da *K. pneumoniae* CCVSU 7173 sob os tratamentos: (A) H₂O₂/catalisador no escuro e (B) UVA/H₂O₂/catalisador em solução salina 0,85% ao longo dos tempos 0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 min. [H₂O₂] = 10, 20 e 30 mg.L⁻¹; [catalisador] = 277 mg.L⁻¹; radiação acumulada = 6.80 mW cm⁻²; pH: 7.



Fonte: Própria autora, 2023.

Na Figura 22 apresenta os resultados dos experimentos H₂O₂/catalisador (Figura 22 (A)) e UVA/H₂O₂/catalisador (Figura 22 (B)) em salina, efluentes sintético e tratado de ETE. Na Figura 22(A), observa-se que o maior CT observado foi na salina (34,3), seguido do efluente tratado (25,2) e do efluente sintético (20,9). Na Figura 22(B) observa-se que mg.Lhá ausência de CT em 150 min, e neste experimento houve inativação bacteriana neste mesmo tempo, ou seja, o gene não foi degradado antes da bactéria ser inativada, havendo possibilidade do gene ainda estar presente no efluente após a inativação bacteriana. Não foi observado ausência de gene no efluente sintético. Os resultados deste experimento evidenciam que o processo UVA/H₂O₂/catalisador apresentou melhor eficiência na remoção do gene *bla_{KPC}* em solução salina.

Figura 22. Valores dos CT das qPCRs para o gene *bla_{KPC}* da *K. pneumoniae* CCVSU 7173 sob os tratamentos: (A) H₂O₂/catalisador e (B) UVA/H₂O₂/catalisador em solução salina 0,85%, efluente sintético e efluente tratado ao longo dos tempos 0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 min. [H₂O₂] = 20 mg.L⁻¹; [catalisador] = 277 mg.L⁻¹; radiação acumulada = 6.80 mW cm⁻²; pH: 7.



Fonte: Própria autora, 2023.

O estudo de FERRO et al., 2017 quantificou o gene *bla_{TEM}* após tratamento de fotocatalise UV/H₂O₂ (20 mg.L⁻¹) nas colônias sobreviventes de *E. coli* e em toda a suspensão (DNA total). Foi observada a inativação bacteriana total em 240 min de experimento, porém o gene *bla_{TEM}* ainda estava presente no DNA total após 300 min ($2,8 \times 10^6$ cópias mL⁻¹). Além disso, nenhum efeito foi observado no DNA extraído de culturas de células ($3,8 \times 10^8$ cópias mL⁻¹ após 90 min). No presente estudo, utilizando condições experimentais análogas UV/H₂O₂ (20 mg.L⁻¹) não foi observada inativação da bactéria e nem ausência do gene.

Outro estudo realizado por GIANNAKIS et al., 2018, com objetivo de avaliar a degradação do gene *bla_{CTX-M-9}* em uma cepa *E. coli*, utilizando um sistema foto-Fenton solar homogêneo nas concentrações 1 mg.L⁻¹ de Fe²⁺ e 10 mg.L⁻¹ de H₂O₂. Os resultados sugeriram a remoção rápida (em 15 min) dos genes ESBL, enquanto a bactéria somente foi inativada após 90 min de experimento. No caso do presente estudo, o gene *bla_{KPC}* não foi inativado nesta mesma concentração de H₂O₂ e precisando de mais tempo para inativação e concentração de 20 mg.L⁻¹.

O estudo de SERNA-GALVIS et al., 2019, avaliou o impacto no gene *bla_{KPC}*, presente em uma cepa *K. pneumoniae*, utilizando um processo foto-Fenton homogêneo em pH 7, durante e após a inativação do microrganismo nas concentrações 5 mg.L⁻¹ de Fe²⁺ e 50 mg.L⁻¹ de H₂O₂. A partir dos dados obtidos utilizando PCR convencional, demonstrou que o gene permaneceu presente na amostra total mesmo após a completa inativação de *K. pneumoniae*, obtida em 120 min. Porém, em tempos superiores, houve a redução do número de cópias do gene, indicando a

necessidade de mais tempo de tratamento para garantir a degradação completa do *bla_{KPC}*. Diferentemente do presente estudo, em que o gene foi degradado em 90 min e a bactéria em 120 min no processo com catalisador em uma concentração menor de H₂O₂ (20 mg.L⁻¹).

Nos experimentos realizados neste estudo, foi possível observar que a adição do resíduo de minério, utilizado como catalisador ao sistema de desinfecção UVA/H₂O₂/catalisador na condição otimizada de 20 mg.L⁻¹ de H₂O₂, aumentou consideravelmente a degradação da cepa multirresistente e uma possível degradação do gene *bla_{KPC}* tanto em salina como em efluente tratado. Estes resultados indicam a eficácia da desinfecção do resíduo na remoção de bactérias multirresistentes e um indicativo de degradação de gene de resistência, nas condições experimentais testadas.

6. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo revelaram que as espécies *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* foram predominantes no isolamento de *Enterobacteriales* provenientes de amostras de efluentes brutos e tratados de três diferentes ETEs. Mais da metade dos isolados apresentou o perfil de resistência MDR, seguido pelo perfil XDR. Vale ressaltar que 39,5% (30/76) das cepas que apresentaram esses perfis foram isoladas dos efluentes tratados.

Foi revelada pela primeira vez a presença de *E. coli* resistente a polimixina B e carreando o gene *mcr-1* em efluentes sanitários do município do Rio de Janeiro.

Entre os isolados resistentes aos carbapenêmicos, mais da metade das cepas foram resistentes ao ertapenem e ao imipenem. Mais da metade dos isolados são produtores de carbapenemases ou apresentam atividade carbapenemase. Foram detectados os genes de resistência aos carbapenêmicos *bla_{NDM}*, *bla_{KPC}*, *bla_{OXA-48-like}* e *bla_{IMP}*, sendo pelo menos um destes gene encontrado em mais de 50% dos isolados. Obteve-se também a presença de dois a três desses genes simultaneamente em um mesmo isolado, inclusive em cepas isoladas nos efluentes tratados da ETEs 1 e 2.

A avaliação da relação clonal entre as cepas de *Klebsiella pneumoniae* revelou a presença de cinco diferentes STs: ST11, ST37, ST147, ST244 e ST281. Dentre eles, somente o ST11 foi encontrado em efluentes bruto e tratado da ETE1. Estas cepas apresentaram os perfis MDR e XDR, carreando os genes *bla_{NDM}* e *bla_{KPC}*. Além disso, foi revelado pela primeira vez a presença dos STs 244 e 281 em amostras de origem ambiental, demonstrando a importância da avaliação das relações clonais das cepas de matrizes ambientais.

Nossos resultados revelaram, em efluentes tratados, a ocorrência e persistência em efluentes de ETEs de bactérias multirresistentes portadoras de genes de resistência a antimicrobianos considerados de último recurso na prática clínica, possivelmente carregados por plasmídeos que podem facilmente ser disseminados entre a comunidade microbiana no ambiente aquático. Além disso, é possível afirmar que esses patógenos apresentam o potencial de sobreviver aos tratamentos secundários das ETEs estudadas.

O sistema utilizando resíduo de mineração otimizado UVA/H₂O₂/catalisador (20 mg.L⁻¹/277 mg.L⁻¹), em pH neutro, foi eficaz na remoção total da cepa CCVSU 7173 com perfil de resistência XDR, resistente aos carbapenêmicos, em efluente tratado e uma possível inativação do gene *bla_{KPC}* em solução salina. Mesmo após 180 min do fim do tratamento, a cepa bacteriana permaneceu não viável 24 h depois em condições escuras. Conclui-se que a utilização de resíduos da mineração pode ser uma alternativa eficaz e econômica na desinfecção de efluentes

e representa um guia para futuras aplicações desse sistema para a inativação de outras bactérias resistentes e genes de resistência em águas residuais, a fim de interromper o ciclo da disseminação da resistência bacteriana no ambiente e contribuir para a redução do risco à saúde humana e ambiental.

REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, F. M.; WOOLHOUSE, M. E. J. **Using sewage for surveillance of antimicrobial resistance** *Science*. American Association for the Advancement of Science, , 7 fev. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/498329>. Acesso em: 27 nov. 2020.
- ABRANTES, J. A. **Avaliação da resistência bacteriana em Estações de Tratamento de Esgoto da Fiocruz com ênfase no perfil fenotípico e molecular para beta-lactamases em enterobactérias**. Tese. Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente Fiocruz, Rio de Janeiro, Fiocruz, 2022.
- ABUOUN, M. et al. mcr-1 and mcr-2 variant genes identified in *Moraxella* species isolated from pigs in Great Britain from 2014 to 2015. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 72, n. 10, p. 2745–2749, 1 out. 2017.
- ADEKANMBI, A. O. et al. Detection of sul1 and sul2 genes in sulfonamide-resistant bacteria (SRB) from sewage, aquaculture sources, animal wastes and hospital wastewater in South-West Nigeria. *Gene Reports*, v. 20, 1 set. 2020.
- AGUILAR, S. et al. Inactivation of a wild isolated *Klebsiella pneumoniae* by photo-chemical processes: UV-C, UV-C/H₂O₂ and UV-C/H₂O₂/Fe³⁺. *Catalysis Today*, v. 313, p. 94–99, 1 set. 2018.
- AHMED, N. et al. A Review on the Degradation of Pollutants by Fenton-Like Systems Based on Zero-Valent Iron and Persulfate: Effects of Reduction Potentials, pH, and Anions Occurring in Waste Waters. *Molecules*, v. 26, n. 15, 1 ago. 2021a.
- AHMED, Y. et al. Efficient inactivation of antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes by photo-Fenton process under visible LED light and neutral pH. *Water Research*, v. 179, p. 115878, 15 jul. 2020.
- AHMED, Y. et al. Simultaneous removal of antibiotic resistant bacteria, antibiotic resistance genes, and micropollutants by a modified photo-Fenton process. *Water Research*, v. 197, p. 117075, 1 jun. 2021b.
- AJAYI-ODOKO, A. O. et al. *Proteus mirabilis* isolated from untreated hospital wastewater, Ibadan, Southwestern Nigeria showed low-level resistance to fluoroquinolone and carried qnrD3 on Col3M plasmids. *Environmental Science and Pollution Research*, 1 abr. 2023.
- AJONINA, C. et al. Microbial Pathogens in Wastewater Treatment Plants (WWTP) in Hamburg. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, v. 78, n. 6, p. 381–387, 19 mar. 2015.
- AL-ABRI, M. et al. Chlorination disadvantages and alternative routes for biofouling control in reverse osmosis desalination. *npj Clean Water* 2019 2:1, v. 2, n. 1, p. 1–16, 16 jan. 2019.
- AL SALAH, D. M. M. et al. Hospital wastewaters: A reservoir and source of clinically relevant bacteria and antibiotic resistant genes dissemination in urban river under tropical conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 200, 1 set. 2020.

ALATON, I. A. et al. Elimination of antibiotic resistance in treated urban wastewater by iron-based advanced oxidation processes. **Desalination and Water Treatment**, v. 172, p. 235–253, 1 dez. 2019.

ALEIDAN, F. A. S. et al. Incidence and risk factors of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infection in intensive care units: a matched case–control study. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/14787210.2020.1822736>, v. 19, n. 3, p. 393–398, 2020. Acesso em: 15 fev. 2021.

ALHAJ SULAIMAN, A. A.; KASSEM, I. I. First report of the plasmid-borne colistin resistance gene (*mcr-1*) in *Proteus mirabilis* isolated from domestic and sewer waters in Syrian refugee camps. **Travel Medicine and Infectious Disease**. Elsevier USA, , 1 jan. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31521803/>. Acesso em: 18 fev. 2021.

ALIZADEH, N. et al. Detection of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae by chromogenic screening media. **Journal of Microbiological Methods**. Elsevier B.V., 1 out. 2018.

ALMAKKI, A. et al. Antibiotic resistance in urban runoff. **Science of The Total Environment**, v. 667, p. 64–76, jun. 2019.

ALVEAR-DAZA, J. J. et al. Resistance and induction of viable but non culturable states (VBNC) during inactivation of *E. coli* and *Klebsiella pneumoniae* by addition of H₂O₂ to natural well water under simulated solar irradiation. **Water Research**, v. 188, p. 116499, 1 jan. 2021.

ALVES COELHO, N. T. et al. Occurrence of extended-spectrum betalactamase (ESBL) and carbapenemases among ampicillin-resistant enterobacteriales recovered from a municipal raw sewage in Minas Gerais, Brazil. **Revista Colombiana de Ciências Químico-Farmacéuticas**, ISSN-e 1909-6356, ISSN 0034-7418, Vol. 50, Nº. 3, 2021 (Ejemplar dedicado a: 50(3)), v. 50, n. 3, p. 12, 2021.

ALVIM, A. L. S.; COUTO, B. R. G. M.; GAZZINELLI, A. Epidemiological profile of healthcare-associated infections caused by Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. **Revista da Escola de Enfermagem**, v. 53, 2019.

ANDRADE, L. N. et al. Dissemination of blaKPC-2 by the spread of *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 258 clones (ST258, ST11, ST437) and plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among Enterobacteriaceae species in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 7, p. 3579–3583, 2011.

ANDRADE, L. N.; DARINI, A. L. DA C. Bacilos gram-negativos produtores de beta-lactamases: que bla bla é esse? **Journal of Infection Control**, v. 6, n. 1, p. 16–25, 14 mar. 2017.

ANDRADE, V. C. et al. Carbapenem resistant Enterobacteriaceae from port areas in São Paulo State (Brazil): Isolation and molecular characterization. **Marine Pollution Bulletin**, v. 159, 1 out. 2020.

ANDRÉS JUAN, C. et al. Molecular Sciences The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and

Proteins) and Induced Pathologies. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 22, p. 4642, 2021.

ANTOCHEVIS, L. C. et al. KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from Brazilian hospitals: What (still) remains active? **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 15, p. 173–177, 1 dez. 2018.

ANVISA. Antimicrobianos - Bases teóricas e uso clínico. ANVISA, 2020. Disponível em: https://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/propriedades4.htm. Acesso em: 12 jan. 2021.

ANVISA. Boletim Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 22 - **Avaliação Nacional dos indicadores de IRAS e RM - 2019**. Disponível em: <https://app.powerbi.com/view?r=eyJrIjoiZjQ5ZDhjZmEtNDdhOC00MDk3LWFiNDEtNzg0MmE4MmE2MjhlIiwidCI6ImI2N2FmMjNmLWMzZjMtNGQzNS04MGM3LWI3MDg1ZjVlZGQ4MSJ9&pageName=ReportSectionac5c0437dbe709793b4b>. Acesso em: 12 jan. 2022.

ANYANWU, M. U. et al. Prevalence and Traits of Mobile Colistin Resistance Gene Harbouring Isolates from Different Ecosystems in Africa. **BioMed Research International**, v. 2021, p. 1–20, 22 jan. 2021.

ANYANWU, M. U.; JAJA, I. F.; NWOBI, O. C. Occurrence and characteristics of mobile colistin resistance (Mcr) gene-containing isolates from the environment: A review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. MDPI AG, 1 fev. 2020b. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32041167/>. Acesso em: 18 fev. 2021.

APHA. Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater. 23. ed. Washington: **American Public Health Association**, 2017.

ARAÚJO, S. et al. Carbapenem-resistant bacteria over a wastewater treatment process: Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in untreated wastewater and intrinsically-resistant bacteria in final effluent. **Science of the Total Environment**, v. 782, 15 ago. 2021.

ARCARI, G.; CARATTOLI, A. Global spread and evolutionary convergence of multidrug-resistant and hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* high-risk clones. **Pathogens and Global Health**, 2023.

ARISTIZÁBAL-HOYOS, A. M. et al. High clonal diversity of multidrug-resistant and extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in a wastewater treatment plant. **Journal of Environmental Management**, v. 245, p. 37–47, 1 set. 2019.

ARRUDA, J. M. et al. Revisão bibliográfica de antibióticos beta-lactâmicos Bibliographic review of Beta-lactam antibiotics. **Revista Saúde em foco**, v. 11, p. 982–995, 2019.

ASFAW, T. Review on hospital wastewater as a source of emerging drug resistance pathogens. **Journal of Research in Environmental Science and Toxicology**, v. 7, n. 2, 2018.

ASLAM, B. et al. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. **Infection and Drug Resistance**, v. 11, p. 1645, 2018.

AUGUET, O. et al. Sewers as potential reservoirs of antibiotic resistance. **Science of the Total Environment**, v. 605–606, p. 1047–1054, 15 dez. 2017.

AVEDISSIAN, S. N. et al. A Review of the Clinical Pharmacokinetics of Polymyxin B. **Antibiotics**, v. 8, n. 1, p. 31, 22 mar. 2019.

AYDIN, S. et al. Antibiotics in hospital effluents: occurrence, contribution to urban wastewater, removal in a wastewater treatment plant, and environmental risk assessment. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 1, p. 544–558, 1 jan. 2019.

AYUKEKBONG, J. A.; NTEMGWA, M.; ATABE, A. N. The threat of antimicrobial resistance in developing countries: Causes and control strategies. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**. BioMed Central Ltd., , 15 maio 2017. Disponível em: <http://aricjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13756-017-0208-x>. Acesso em: 23 set. 2020.

BAQUERO, F.; MARTÍNEZ, J. L.; CANTÓN, R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments Current Opinion in Biotechnology. **Curr Opin Biotechnol**, jun. 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18534838/>. Acesso em: 11 fev. 2021.

BARTLEY, P. S. et al. Antibiotic resistance in enterobacteriaceae from surface waters in Urban Brazil highlights the risks of poor sanitation. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, n. 6, p. 1369–1377, 2019.

BARTOLLETI, F. et al. Polymyxin B resistance in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, São Paulo, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 1 out. 2016. Disponível em: </pmc/articles/PMC5038415/>. Acesso em: 15 mar. 2021.

BERGEN, P. J. et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of ‘old’ polymyxins: what is new? **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 74, n. 3, p. 213, nov. 2012.

BIANCO, K. et al. Mobile resistome of microbial communities and antimicrobial residues from drinking water supply systems in Rio de Janeiro, Brazil. **Scientific Reports**. v. 12, p. 19050, 2022.

BIANCULLO, F. et al. Heterogeneous photocatalysis using UVA-LEDs for the removal of antibiotics and antibiotic resistant bacteria from urban wastewater treatment plant effluents. **Chemical Engineering Journal**, v. 367, p. 304–313, jul. 2019.

BIBERG, C. A. et al. KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in a hospital in the Midwest region of Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 501–504, 26 jun. 2015.

BOROWIAK, M. et al. Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, mcr-5, conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 12, p. 3317–3324, 1 dez. 2017.

BOU, G. et al. Detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in various scenarios and health settings. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 32, n. S4, p. 24–

32, 1 dez. 2014.

BRANDÃO, M. B. E S. et al. Isolation of extended-spectrum beta-lactamases producing strains on effluent of state hospital from Boa Vista-RR. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 21, n. 3, p. 248, 20 dez. 2017.

BROWNE, A. J. et al. Global antibiotic consumption and usage in humans, 2000–18: a spatial modelling study. **The Lancet Planetary Health**, v. 5, n. 12, p. e893–e904, 1 dez. 2021.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, mar. 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19995920/>. Acesso em: 4 fev. 2021.

BUTT, A. L.; MPINGA, J. K.; TICHAPONDWA, S. M. Photo-fenton oxidation of methyl orange dye using south african ilmenite sands as a catalyst. **Catalysts**, v. 11, n. 12, p. 1452, 1 dez. 2021.

CACACE, D. et al. Antibiotic resistance genes in treated wastewater and in the receiving water bodies: A pan-European survey of urban settings. **Water Research**, v. 162, p. 320–330, 1 out. 2019.

CADET, J.; RICHARD WAGNER, J. DNA base damage by reactive oxygen species, oxidizing agents, and UV radiation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, n. 2, fev. 2013.

CAHILL, N. et al. Hospital effluent: A reservoir for carbapenemase-producing *Enterobacteriales*? **Science of the Total Environment**, v. 672, p. 618–624, 1 jul. 2019.

CALISTRI, P. et al. Genomics of *Klebsiella pneumoniae* Species Complex Reveals the Circulation of High-Risk Multidrug-Resistant Pandemic Clones in Human, Animal, and Environmental Sources. **Microorganisms** 2022, Vol. 10, Page 2281, v. 10, n. 11, p. 2281, 17 nov. 2022.

CAMARGO, C. H. et al. Genomic diversity of NDM-producing *Klebsiella* species from Brazil, 2013–2022. **Antibiotics**, v. 11, n. 10, 1 out. 2022.

CAMPANA, E. H. et al. NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 goes to the beach. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 49, n. 1, p. 119–121, 1 jan. 2017.

CAPODAGLIO, A. G. Critical Perspective on Advanced Treatment Processes for Water and Wastewater: AOPs, ARPs, and AORPs. **Applied Sciences** 2020, Vol. 10, Page 4549, v. 10, n. 13, p. 4549, 30 jun. 2020.

CARATTOLI, A. et al. Novel plasmid-mediated colistin resistance *mcr-4* gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. **Eurosurveillance**, v. 22, n. 31, 3 ago. 2017.

CARDOSO, A. et al. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase: A PROBLEM WITHOUT SOLUTION? **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research-BJSCR**, 2014. Disponível em: <http://www.mastereditora.com.br/bjscr>. Acesso em: 8 fev. 2021.

CARRARO, E. et al. Hospital effluents management: Chemical, physical, microbiological risks and legislation in different countries. **Journal of Environmental Management**. Academic Press, 1 mar. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26708649/>. Acesso em: 15 set. 2020.

CARROLL, L. M. et al. Identification of Novel Mobilized Colistin Resistance Gene *mcr-9* in a Multidrug-Resistant, Colistin-Susceptible *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium Isolate. **mBio**, v. 10, n. 3, 1 maio 2019.

CASADO, C. et al. Mechanistic modelling of wastewater disinfection by the photo-Fenton process at circumneutral pH. **Chemical Engineering Journal**, v. 403, 1 jan. 2021.

CASELLI, E. et al. Spread of *mcr-1*-driven colistin resistance on hospital surfaces, Italy. **Emerging Infectious Diseases**. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 1 set. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30124425/>. Acesso em: 18 fev. 2021.

CASSINI, A. et al. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, p. 56–66, 1 jan. 2019.

CASTELO, N. M. B.; MAZZEI, A. LA; ROMÃO, C. M. C. Emerging Pollutants: Antimicrobials in the environment, environmental education and the national and international regulatory aspect. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 8, p. e16910817083–e16910817083, 10 jul. 2021.

CAVE, A. Survival of carbapenem resistance through wastewater treatment. New Mexico. **State University**. Thesis. New Mexico, 2019.

CDC. Identifying Healthcare-associated Infections (HAI) for NHSN Surveillance. **Centers for Disease Control and Prevention**. Disponível em: https://www.cdc.gov/nhsn/pdfs/pscmanual/2psc_identifyinghais_nhsncurrent.pdf. Acesso em: 10 dez. 2020.

CDC. Drug Resistance. **Centers for Disease Control and Prevention**. Disponível em: <https://www.cdc.gov/drugresistance/index.html>. Acesso em: 26 nov. 2020.

CHAGAS, T. et al. Occurrence of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in hospital wastewater. **The Journal of hospital infection**, v. 77, n. 3, p. 281, mar. 2011a.

CHAGAS, T. P. G. et al. Multiresistance, beta-lactamase-encoding genes and bacterial diversity in hospital wastewater in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, n. 3, p. 572–581, set. 2011b.

CHATZISYMEON, E. et al. Disinfection of water and wastewater by UV-A and UV-C irradiation: application of real-time PCR method. **Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology**, v. 10, n. 3, p. 389–395, 2011.

CHEN, G. et al. *Biological Wastewater Treatment: Principles, Modeling and Design*. 2nd. ed. **IWA Publishing**, 2020.

CHEN, Q. et al. A Small KPC-2-Producing Plasmid in *Klebsiella pneumoniae* : Implications for Diversified Vehicles of Carbapenem Resistance . **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 3, 29 jun. 2022.

CHERNICHARO, C. A. DE L. et al. Panorama do tratamento de esgoto sanitário nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil: tecnologias mais empregadas. **Revista DAE**, v. 66, n. 213, p. 5–19, 2018.

CHU, C. et al. Water Disinfection in Rural Areas Demands Unconventional Solar Technologies. **Accounts of Chemical Research**, v. 52, n. 5, p. 1187–1195, 21 maio 2019.

CLARIZIA, L. et al. Homogeneous photo-Fenton processes at near neutral pH: A review. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 209, p. 358–371, 2017.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **CLSI M100-ED32:2022 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**, v. 32nd Editi, p. 362, 2022.

COHEN, R. et al. Multidrug-resistant enterobacteriaceae in coastal water: an emerging threat. **Antimicrobial Resistance & Infection Control 2020 9:1**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 30 out. 2020.

COLLIGNON, P. J.; MCEWEN, S. A. One health-its importance in helping to better control antimicrobial resistance. **Tropical Medicine and Infectious Disease**. MDPI AG , 2019.

CONAMA 430/11. 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 - CONAMA**. Brazil, 2011. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646>. Acesso em: 15 jan. 2022.

CONCEIÇÃO-NETO, O. C. et al. Detection of the plasmid-mediated mcr-1 gene in clinical KPC-2-producing *Escherichia coli* isolates in Brazil. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 50, n. 2, p. 282–284, 1 ago. 2017.

CONCEIÇÃO-NETO, O. C. et al. Polymyxin Resistance in Clinical Isolates of *K. pneumoniae* in Brazil: Update on Molecular Mechanisms, Clonal Dissemination and Relationship With KPC-Producing Strains. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, p. 1012, 15 jul. 2022.

CONLEY, J. M. et al. Occurrence and in Vitro Bioactivity of Estrogen, Androgen, and Glucocorticoid Compounds in a Nationwide Screen of United States Stream Waters. **Environmental Science and Technology**, v. 51, n. 9, p. 4781–4791, 2 maio 2017.

CONTE, D. et al. Characterization of CTX-M enzymes, quinolone resistance determinants, and antimicrobial residues from hospital sewage, wastewater treatment plant, and river water. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 136, p. 62–69, 1 fev. 2017.

DA SILVA, K. E. et al. Overview of polymyxin resistance in Enterobacteriaceae. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 55, p. 2022, 25 fev. 2022.

DALMOLIN, T. V. et al. Detection and analysis of different interactions between resistance mechanisms and carbapenems in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 493–498, 1 jul. 2017a.

DALMOLIN, T. V. et al. Co-occurrence of *mcr-1* and *blaKPC-2* in a clinical isolate of *Escherichia coli* in Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. Oxford University Press, , 1 ago. 2017b. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28505353/>. Acesso em: 3 fev. 2021.

DALMOLIN, T. V. et al. Evaluation of the susceptibility test of polymyxin B using the commercial test Policimbac®. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 1135–1137, 1 set. 2020.

DE CAMPOS, T. A. et al. A fatal bacteremia caused by hypermucoviscous KPC-2 producing extensively drug-resistant K64-ST11 *Klebsiella pneumoniae* in Brazil. **Frontiers in Medicine**, v. 5, n. SEP, 2018.

DENG, Y.; ZHAO, R. Advanced Oxidation Processes (AOPs) in Wastewater Treatment. **Current Pollution Reports**, v. 1, n. 3, p. 167–176, 1 set. 2015.

DEVARAJAN, N. et al. Occurrence of Antibiotic Resistance Genes and Bacterial Markers in a Tropical River Receiving Hospital and Urban Wastewaters. **PLOS ONE**, v. 11, n. 2, p. e0149211, 24 fev. 2016.

DEVI, L. G.; SRINIVAS, M.; ARUNAKUMARI, M. L. Heterogeneous advanced photo-Fenton process using peroxymonosulfate and peroxydisulfate in presence of zero valent metallic iron: A comparative study with hydrogen peroxide photo-Fenton process. **Journal of Water Process Engineering**, v. 13, p. 117–126, 2016.

DIANCOURT, L. et al. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, n. 8, p. 4178–4182, ago. 2005.

DORTET, L. et al. Émergence de la résistance à la colistine chez les entérobactéries : une brèche dans le dernier rempart contre la pan-résistance ! **Journal des Anti-Infectieux**. Elsevier Masson SAS, 1 dez. 2016.

DROPA, M. et al. Genetic background of novel sequence types of CTX-M-8- and CTX-M-15-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from public wastewater treatment plants in São Paulo, Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 5, p. 4953–4958, 1 mar. 2016.

DU, H. et al. Emergence of the *mcr-1* colistin resistance gene in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. **The Lancet Infectious Diseases**. Lancet Publishing Group, 1 mar. 2016. Disponível em: <http://dx.doi>. Acesso em: 3 fev. 2021.

DUQUE, S. DA S. Estudo do Gene *merA* em Bactérias Gram-negativas Resistentes ao Mercúrio Isoladas de Ecossistemas Aquáticos Brasileiros: Contribuição para a Mitigação dos Riscos do Mercúrio à Saúde Humana Através da Biorremediação. Tese, Fundação Oswaldo Cruz, 2012.

- DURAND, G. A.; RAOULT, D.; DUBOURG, G. Antibiotic discovery: history, methods and perspectives. **International Journal of Antimicrobial Agents**. Elsevier B.V., 1 abr. 2019.
- EBOMAH, K. E.; OKOH, A. I. Detection of Carbapenem-Resistance Genes in Klebsiella Species Recovered from Selected Environmental Niches in the Eastern Cape Province, South Africa. **Antibiotics** 2020, Vol. 9, Page 425, v. 9, n. 7, p. 425, 21 jul. 2020.
- ECHEVERRI TORO, L. M.; ATEHORTÚA MUÑOZ, S. L.; ROBLEDO RESTREPO, J. K. pneumoniae y betalactamasas: un problema creciente. **Med. U.P.B.**, p. 135–141, 2009.
- EKSTRÖM, S. et al. Integrated Microanalytical Technology Enabling Rapid and Automated Protein Identification. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 2, p. 286–293, 15 jan. 1999.
- ETEBU, E.; ARIKEKPAR, I. Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. **IJAMBR**, v. 4, p. 90–101, 2016.
- EUCAST. **European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing**. Disponível em: <https://www.eucast.org/>. Acesso em: 24 fev. 2021.
- FASNACHT, M.; POLACEK, N. Oxidative Stress in Bacteria and the Central Dogma of Molecular Biology. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 8, p. 392, 10 maio 2021.
- FENG, L. et al. Employing bacterial mutations for the elucidation of photo-Fenton disinfection: Focus on the intracellular and extracellular inactivation mechanisms induced by UVA and H₂O₂. **Water Research**, v. 182, 1 set. 2020.
- FERNANDES, M. R. et al. Silent dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli* in South America could contribute to the global spread of the mcr-1 gene. **Eurosurveillance**, v. 21, n. 17, p. 30214, 28 abr. 2016a.
- FERNANDES, M. R. et al. First report of the globally disseminated IncX4 plasmid carrying the mcr-1 gene in a colistin-resistant *Escherichia coli* sequence type 101 isolate from a human infection in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 10, p. 6415–6417, 1 out. 2016b.
- FERNANDES, M. R. et al. Colistin-Resistant mcr-1-Positive *Escherichia coli* on Public Beaches, an Infectious Threat Emerging in Recreational Waters. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 7, jul. 2017.
- FERREIRA DA SILVA, M. et al. Antimicrobial resistance patterns in Enterobacteriaceae isolated from an urban wastewater treatment plant. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 60, n. 1, p. 166–176, abr. 2007.
- FERRO, G. et al. β -lactams resistance gene quantification in an antibiotic resistant *Escherichia coli* water suspension treated by advanced oxidation with UV/H₂O₂. **Journal of Hazardous Materials**, v. 323, p. 426–433, 5 fev. 2017.
- FIGUEIRA, V. et al. Comparison of ubiquitous antibiotic-resistant Enterobacteriaceae populations isolated from wastewaters, surface waters and drinking waters. **Journal of Water**

and Health, v. 10, n. 1, p. 1–10, 2012.

FLORES, C. et al. Genetic Relatedness of NDM-Producing *Klebsiella pneumoniae* Co-Occurring VIM, KPC, and OXA-48 Enzymes from Surveillance Cultures from an Intensive Care Unit. **Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)**, v. 26, n. 10, p. 1219–1226, 1 out. 2020.

FREIWALD, A.; SAUER, S. Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry. **Nature Protocols**, v. 4, n. 5, p. 732–742, 23 abr. 2009.

FRÓES, A. M. et al. Distribution and classification of serine β -lactamases in Brazilian hospital sewage and other environmental metagenomes deposited in public databases. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. NOV, 15 nov. 2016.

FUGA, B. et al. WHO Critical Priority *Escherichia coli* as One Health Challenge for a Post-Pandemic Scenario: Genomic Surveillance and Analysis of Current Trends in Brazil. 2022.

GARCÍA-FERNÁNDEZ, I. et al. Bacteria and fungi inactivation using Fe³⁺/sunlight, H₂O₂/sunlight and near neutral photo-Fenton: A comparative study. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 121–122, p. 20–29, 13 jun. 2012.

GARCÍA-MUÑOZ, P. et al. Ilmenite (FeTiO₃) as low cost catalyst for advanced oxidation processes. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 4, n. 1, p. 542–548, 1 mar. 2016.

GARCÍA-MUÑOZ, P. et al. Sulfonamides photoassisted oxidation treatments catalyzed by ilmenite. **Chemosphere**, v. 180, p. 523–530, 2017a.

GARCÍA-MUÑOZ, P. et al. Treatment of hospital wastewater through the CWPO-Photoassisted process catalyzed by ilmenite. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 5, n. 5, p. 4337–4343, 1 out. 2017b.

GARCÍA-MUÑOZ, P. et al. Treatment of hospital wastewater through the CWPO-Photoassisted process catalyzed by ilmenite. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 5, n. 5, p. 4337–4343, 1 out. 2017c.

GARCÍA-MUÑOZ, P. et al. Photocatalytic activation of peroxymonosulfate using ilmenite (FeTiO₃) for *Enterococcus faecalis* inactivation. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 10, n. 5, p. 108231, 1 out. 2022.

GARZA-RAMOS, U. et al. Phenotypic and molecular characterization of *Klebsiella* spp. isolates causing community-acquired infections. **New Microbes and New Infections**, v. 23, p. 17–27, 1 maio 2018.

GASPAR, G. G. et al. Nosocomial Outbreak of Extensively Drug-Resistant (Polymyxin B and Carbapenem) *Klebsiella pneumoniae* in a Collapsed University Hospital Due to COVID-19 Pandemic. **Antibiotics (Basel, Switzerland)**, v. 11, n. 6, 1 jun. 2022.

GIAMARELLOU, H. Epidemiology of infections caused by polymyxin-resistant pathogens. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 48, n. 6, p. 614–621, 1 dez. 2016.

GIANNAKIS, S. et al. Monitoring the post-irradiation *E. coli* survival patterns in environmental water matrices: Implications in handling solar disinfected wastewater. **Chemical Engineering Journal**, v. 253, p. 366–376, 1 out. 2014.

GIANNAKIS, S. et al. Ultrasound enhancement of near-neutral photo-Fenton for effective *E. coli* inactivation in wastewater. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 22, p. 515–526, 1 jan. 2015.

GIANNAKIS, S. et al. Castles fall from inside: Evidence for dominant internal photocatalytic mechanisms during treatment of *Saccharomyces cerevisiae* by photo-Fenton at near-neutral pH. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 185, p. 150–162, 15 maio 2016a.

GIANNAKIS, S. et al. Solar disinfection is an augmentable, in situ-generated photo-Fenton reaction—Part 2: A review of the applications for drinking water and wastewater disinfection. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 198, p. 431–446, 5 dez. 2016b.

GIANNAKIS, S. et al. Effect of Fe(II)/Fe(III) species, pH, irradiance and bacterial presence on viral inactivation in wastewater by the photo-Fenton process: Kinetic modeling and mechanistic interpretation. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 204, p. 156–166, 5 maio 2017.

GIANNAKIS, S. et al. Solar photo-Fenton disinfection of 11 antibiotic-resistant bacteria (ARB) and elimination of representative AR genes. Evidence that antibiotic resistance does not imply resistance to oxidative treatment. **Water Research**, v. 143, p. 334–345, 15 out. 2018.

GONÇALVES, C. C.; BRAGA, P. F. A. Heavy Mineral Sands in Brazil: Deposits, Characteristics, and Extraction Potential of Selected Areas. **Minerals** 2019, Vol. 9, Page 176, v. 9, n. 3, p. 176, 13 mar. 2019.

GONZALES-ESCALANTE, E. et al. Whole-Genome Analysis of a High-Risk Clone of *Klebsiella pneumoniae* ST147 Carrying Both *mcr-1* and *bla*NDM-1 Genes in Peru. **Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)**, v. 28, n. 2, p. 171–179, 1 fev. 2022.

GUIMARÃES, D. O.; DA SILVA MOMESSO, L.; PUPO, M. T. Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quimica Nova** Sociedade Brasileira de Química, , 2010. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422010000300035&lng=en&nrm=iso&tlng=pt. Acesso em: 6 jan. 2021

GUSATTI, C. D. S. et al. Resistência a β -lactâmicos em *Acinetobacter* spp isolados de efluente hospitalar no sul do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 2, p. 183–187, mar. 2009.

HALDEN, R. U. Introduction to contaminants of emerging concern in the environment: Ecological and human health considerations. **ACS Symposium Series**. American Chemical Society, 2 nov. 2010

HALLER, L. et al. Occurrence and characteristics of extended-spectrum β -lactamase- and carbapenemase- producing bacteria from hospital effluents in Singapore. **Science of the Total Environment**, v. 615, p. 1119–1125, 15 fev. 2018.

HASSAN, H.; HAMEED, B. H. Fe–clay as effective heterogeneous Fenton catalyst for the decolorization of Reactive Blue 4. **Chemical Engineering Journal**, v. 171, n. 3, p. 912–918, 15 jul. 2011.

HASSEN, B. et al. Genetic characterization of ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from wastewater and river water in Tunisia: predominance of CTX-M-15 and high genetic diversity. **Environmental Science and Pollution Research**, 2020.

HAYASHI, W. et al. Acquisition of *mcr-1* and Cocarriage of Virulence Genes in Avian Pathogenic *Escherichia coli* Isolates from Municipal Wastewater Influent in Japan. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 85, n. 22, 11 nov. 2019.

HEIDARI, Z. et al. Application of Mineral Iron-Based Natural Catalysts in Electro-Fenton Process: A Comparative Study. **Catalysts**, v. 11, n. 1, p. 57, 1 jan. 2021.

HEMBACH, N. et al. Occurrence of the *mcr-1* colistin resistance gene and other clinically relevant antibiotic resistance genes in microbial populations at different municipal wastewater treatment plants in Germany. **Front. Microbiol.**, v. 8, n. JUL, p. 1–11, 11 jul. 2017a.

HEMBACH, N. et al. Occurrence of the *mcr-1* colistin resistance gene and other clinically relevant antibiotic resistance genes in microbial populations at different municipal wastewater treatment plants in Germany. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JUL, 11 jul. 2017b.

HERRERA-IBARRA, L. M. et al. Treatment of Textile Industrial Wastewater by the Heterogeneous Solar Photo-Fenton Process Using Copper Slag. **Topics in Catalysis**, v. 65, n. 9–12, p. 1163–1179, 1 ago. 2022.

HO, L. T.; VAN ECHELPOEL, W.; GOETHALS, P. L. M. Design of waste stabilization pond systems: A review. **Water Research**. Elsevier Ltd, , 15 out. 2017.

HOOBAN, B. et al. A Point Prevalence Survey of Antibiotic Resistance in the Irish Environment, 2018–2019. **Environment International**, v. 152, p. 106466–106466, 8 mar. 2021.

HU, X. B. et al. Biofilm regeneration on carriers in MBBR used for vitamin C wastewater treatment. **Water Science and Technology**, v. 67, n. 6, p. 1310–1316, 1 mar. 2013.

HUANG, W. et al. UVA-UVB activation of hydrogen peroxide and persulfate for advanced oxidation processes: Efficiency, mechanism and effect of various water constituents. **Journal of hazardous materials**, v. 347, p. 279–287, 5 abr. 2018.

HUANG, X. et al. Capsule type defines the capability of *Klebsiella pneumoniae* in evading Kupffer cell capture in the liver. **PLOS Pathogens**, v. 18, n. 8, p. e1010693, 1 ago. 2022.

HUSSAIN, S.; ANEGGI, E.; GOI, D. Catalytic activity of metals in heterogeneous Fenton-like oxidation of wastewater contaminants: a review. **Environmental Chemistry Letters** **2021 19:3**, v. 19, n. 3, p. 2405–2424, 14 fev. 2021.

IDEXX. Protocolo Colilert Test Kit. Disponível em: <https://www.idexx.com.br/files/colilert-procedure-en.pdf>. Acesso em: 24 set. 2021.

IGOUD, S. et al. Wastewater disinfection using ultraviolet (UVA, UVC) and solar radiation. **New pub: Balaban**, v. 56, n. 10, p. 2646–2652, 4 dez. 2014.

IGWARAN, A.; IWERIEBOR, B. C.; OKOH, A. I. Molecular characterization and antimicrobial resistance pattern of *Escherichia coli* recovered from wastewater treatment plants in Eastern Cape South Africa. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 6, 12 jun. 2018.

IMLAY, J. A. Cellular Defenses against Superoxide and Hydrogen Peroxide. 2008.

IOC. **Combate ao uso excessivo de antibióticos**. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infol=3391&sid=32&tpl=printerview>. Acesso em: 26 nov. 2020.

ISLAM, A. et al. Colistin resistant *Escherichia coli* carrying mcr-1 in urban sludge samples: Dhaka, Bangladesh. **Gut Pathogens**, v. 9, n. 1, 20 dez. 2017.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. The Changing Face of the Family Enterobacteriaceae (Order: “*Enterobacterales*”): New Members, Taxonomic Issues, Geographic Expansion, and New Diseases and Disease Syndromes. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 34, n. 2, p. 1–45, 2021.

JELIĆ, A. et al. Occurrence and Elimination of Pharmaceuticals During Conventional Wastewater Treatment. In: **Handbook of Environmental Chemistry**. Springer Verlag, 2012. v. 19p. 1–23.

JELIĆ, M. et al. Characterization of Isolates Associated with Emergence of OXA-48-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Croatia. **Liebertpub**. v. 24, n. 7, p. 973–979, 1 set. 2018.

JIMÉNEZ-TOTOTZINTLE, M. et al. Removal of contaminants of emerging concern (CECs) and antibiotic resistant bacteria in urban wastewater using UVA/TiO₂/H₂O₂ photocatalysis. **Chemosphere**, v. 210, p. 449–457, 2018.

JIN, L. et al. Emergence of mcr-1 and carbapenemase genes in hospital sewage water in Beijing, China. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 1, p. 84–87, 1 jan. 2018.

KAPOOR, G.; SAIGAL, S.; ELONGAVAN, A. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. **Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology**. Medknow Publications, 1 jul. 2017. Disponível em: </pmc/articles/PMC5672523/?report=abstract>. Acesso em: 6 jan. 2021

KARKMAN, A. et al. Antibiotic-Resistance Genes in Waste Water. **Trends in Microbiology**. Elsevier Ltd, 1 mar. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29033338/>. Acesso em: 26 nov. 2020

KEHL, K. et al. Dissemination of carbapenem resistant bacteria from hospital wastewater into the environment. **Science of the Total Environment**, v. 806, 1 fev. 2022.

KEHRER, J. P. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. **Toxicology**, v. 149, n. 1, p. 43–50, 14 ago. 2000.

KELCH, W. J.; LEE, J. S. Antibiotic resistance patterns of gram-negative bacteria isolated from environmental sources. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 450–456, 1978.

KHANNA, N. R.; GERRIETS, V. Beta-Lactamase Inhibitors. **StatPearls**, 26 set. 2022.

KIEJZA, D. et al. Peracids - New oxidants in advanced oxidation processes: The use of peracetic acid, peroxymonosulfate, and persulfate salts in the removal of organic micropollutants of emerging concern - A review. **The Science of the total environment**, v. 790, 10 out. 2021.

KING, T. L. B.; SCHMIDT, S.; ESSACK, S. Y. Antibiotic resistant *Klebsiella* spp. from a hospital, hospital effluents and wastewater treatment plants in the uMgungundlovu District, KwaZulu-Natal, South Africa. **Science of The Total Environment**, v. 712, p. 135550, 10 abr. 2020.

KNEIS, D.; BERENDONK, T. U.; HESS, S. High prevalence of colistin resistance genes in German municipal wastewater. **Science of the Total Environment**, v. 694, 1 dez. 2019.

KOBS, V. C. et al. *mcr-1*-carrying Enterobacteriaceae isolated from companion animals in Brazil. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 40, n. 9, p. 690–695, 2021.

KONG, K. F.; SCHNEPER, L.; MATHEE, K. Beta-lactam antibiotics: From antibiotics to resistance and bacteriology. **APMISNIH Public Access**, jan. 2010. Disponível em: [/pmc/articles/PMC2894812/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22894812/). Acesso em: 14 jan. 2021

KORZENIEWSKA, E.; HARNISZ, M. Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-positive Enterobacteriaceae in municipal sewage and their emission to the environment. **Journal of Environmental Management**, v. 128, p. 904–911, 15 out. 2013.

KUMAR, M. et al. Treatment enhances the prevalence of antibiotic-resistant bacteria and antibiotic resistance genes in the wastewater of Sri Lanka, and India. **Environmental Research**, v. 183, p. 109179, 1 abr. 2020.

KÜMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part II. **Chemosphere**. Pergamon, 1 abr. 2009.

KVESIĆ, M. et al. Submarine Outfalls of Treated Wastewater Effluents are Sources of Extensively- and Multidrug-Resistant KPC- and OXA-48-Producing Enterobacteriaceae in Coastal Marine Environment. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 1486, 6 maio 2022.

LAI, L. et al. Critical review of natural iron-based minerals used as heterogeneous catalysts in peroxide activation processes: Characteristics, applications and mechanisms. **Journal of Hazardous Materials**, v. 416, p. 125809, 15 ago. 2021.

LAM, P. L. et al. The role of reactive oxygen species in the biological activity of antimicrobial agents: An updated mini review. **Chemico-Biological Interactions**, v. 320, 1

abr. 2020.

LAPP, Z. et al. Regional Spread of bla_{NDM-1}-Containing *Klebsiella pneumoniae* ST147 in Post-Acute Care Facilities. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 73, n. 8, p. 1431–1439, 15 out. 2021.

LARAKI, N. et al. Structure of In31, a bla(IMP)-containing *Pseudomonas aeruginosa* integron phyletically related to In5, which carries an unusual array of gene cassettes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 4, p. 890–901, 1999.

LAURETTI, L. et al. Cloning and characterization of bla(VIM), a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 7, p. 1584–1590, 1999.

LE, T.-H. et al. Occurrences and Characterization of Antibiotic-Resistant Bacteria and Genetic Determinants of Hospital Wastewater in a Tropical Country. Thesis. 2016.

LEE, A. H. Y. et al. Genomic insights into the diversity, virulence and resistance of *klebsiella pneumoniae* extensively drug resistant clinical isolates. **Microbial Genomics**, v. 7, n. 8, 2021.

LEE, H. J. et al. UVA-induced damage to DNA and proteins: direct versus indirect photochemical processes . **J. Phys.: Conf. Ser.**, v. 261, p. 57, 2011.

LEKUNBERRI, I.; BALCÁZAR, J. L.; BORREGO, C. M. Detection and quantification of the plasmid-mediated mcr-1 gene conferring colistin resistance in wastewater. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 50, n. 6, p. 734–736, 1 dez. 2017.

LÉPESOVÁ, K. et al. Annual changes in the occurrence of antibiotic-resistant coliform bacteria and enterococci in municipal wastewater. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 18, p. 18470–18483, 1 jun. 2019.

LEPUSCHITZ, S. et al. Whole genome sequencing reveals resemblance between ESBL-producing and carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from Austrian rivers and clinical isolates from hospitals. **Science of The Total Environment**, v. 662, p. 227–235, 20 abr. 2019.

LIAO, W.; LIU, Y.; ZHANG, W. Virulence evolution, molecular mechanisms of resistance and prevalence of ST11 carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in China: A review over the last 10 years. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 23, p. 174–180, 1 dez. 2020.

LIMA, L. M. et al. β -lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 208, p. 112829, 2020.

LING, Z. et al. Epidemiology of mobile colistin resistance genes mcr-1 to mcr-9. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. Oxford University Press, 1 nov. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32514524/>. Acesso em: 3 fev. 2021.

LIU, J.; WANG, R.; FANG, M. Clinical and drug resistance characteristics of *Providencia stuartii* infections in 76 patients. **The Journal of International Medical Research**, v. 48, n.

10, 2020.

LIU, Y. Y. et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 2, p. 161–168, 1 fev. 2016.

LOFRANO, G. et al. Advanced Oxidation Processes for Antibiotics Removal: A Review. **Current Organic Chemistry**, v. 21, p. 1–14, 2017.

LOGAN, L. K.; WEINSTEIN, R. A. The epidemiology of Carbapenem-resistant enterobacteriaceae: The impact and evolution of a global menace. **Journal of Infectious Diseases**, v. 215, n. suppl_1, p. S28–S36, 2017.

LONG, H. et al. The co-transfer of plasmid-borne colistin-resistant genes *mcr-1* and *mcr-3.5*, the carbapenemase gene *bla* NDM-5 and the 16S methylase gene *rmtB* from *Escherichia coli*. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2019.

LORENZONI, V. V. et al. Bloodstream infection by *mcr-1*-harboring *Escherichia coli* in a cancer patient in southern Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**. Elsevier Editora Ltda, , 1 jul. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30092177/>. Acesso em: 4 fev. 2021.

MA, D. et al. Critical review of advanced oxidation processes in organic wastewater treatment. **Chemosphere**, v. 275, 1 jul. 2021.

MACHADO, E. C. et al. Detection and quantification of bacteria resistant to ampicillin and chloramphenicol in domestic sewage treatment plants. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 25, n. 6, p. 847–857, 1 nov. 2020.

MACHADO, E. C. et al. Antibiotic resistance profile of wastewater treatment plants in Brazil reveals different patterns of resistance and multi resistant bacteria in final effluents. **Science of The Total Environment**, v. 857, p. 159376, 20 jan. 2023.

MACHUCA, J. et al. Molecular characterisation of an outbreak of NDM-7-producing *Klebsiella pneumoniae* reveals ST11 clone expansion combined with interclonal plasmid dissemination. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 59, n. 4, p. 106551, 1 abr. 2022.

MACNAIR, C. R. et al. Overcoming *mcr-1* mediated colistin resistance with colistin in combination with other antibiotics. **Nature Communications 2018 9:1**, v. 9, n. 1, p. 1–8, 31 jan. 2018.

MADAN, S.; MADAN, R.; HUSSAIN, A. Advancement in biological wastewater treatment using hybrid moving bed biofilm reactor (MBBR): a review. **Applied Water Science**, v. 12, n. 6, p. 1–13, 1 jun. 2022.

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. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 3, p. 268–281, 2012.

- MAHTO, K. U.; DAS, S. Bacterial biofilm and extracellular polymeric substances in the moving bed biofilm reactor for wastewater treatment: A review. **Bioresource Technology**, v. 345, p. 126476, 1 fev. 2022.
- MAKOWSKA, N. et al. Metagenomic analysis of β -lactamase and carbapenemase genes in the wastewater resistome. **Water Research**, v. 170, 1 mar. 2020.
- MARCH, C. et al. Role of Bacterial Surface Structures on the Interaction of *Klebsiella pneumoniae* with Phagocytes. **PLOS ONE**, v. 8, n. 2, p. e56847, 15 fev. 2013.
- MARQUEZI, M. C. et al. Comparação entre métodos para a análise de coliformes totais e *E. coli* em amostras de água Comparison of methods for analysis of total coliforms and *E. coli* in water samples. **Rev Inst Adolfo Lutz**. 2010.
- MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. J. Carbapenemases in Enterobacteriaceae: Types and molecular epidemiology. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 32, n. S4, p. 4–9, 1 dez. 2014.
- MARTINEZ, J. L. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. **Environmental Pollution**, 2009.
- MARTINEZ, J. L. General principles of antibiotic resistance in bacteria. **Drug Discovery Today: Technologies**. Elsevier Ltd, , 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24847651/>. Acesso em: 21 out. 2020.
- MARTINO, M. D. V. et al. Evaluation of a new rapid test for carbapenemase detection in carbapenem resistant Enterobacteriaceae. **Journal of Microbiological Methods**, v. 115, p. 20–21, 1 ago. 2015.
- MATASEJE, L. F. et al. *Klebsiella pneumoniae* ST147: and then there were three carbapenemases. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 12, p. 1467–1472, 1 dez. 2022.
- MATEI, E. et al. Ferrous Industrial Wastes—Valuable Resources for Water and Wastewater Decontamination. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 21, 1 nov. 2022.
- MATHERS, A. J. et al. Chromosomal Integration of the *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase Gene, bla KPC , in *Klebsiella* Species Is Elusive but Not Rare. 2017.
- MCEWEN, S. A.; COLLIGNON, P. J. Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. In: **Antimicrobial Resistance in Bacteria from Livestock and Companion Animals**. [s.l.] American Society of Microbiology, 2018. p. 521–547.
- MENDES, C. A. C.; BURDMANN, E. A. Polymyxins - A review focusing on their nephrotoxicity. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 55, n. 6, p. 752–758, 2009.
- MENDES OLIVEIRA, V. R.; PAIVA, M. C.; LIMA, W. G. Plasmid-mediated colistin resistance in Latin America and Caribbean: A systematic review. **Travel Medicine and**

Infectious Disease. Elsevier USA, , 1 set. 2019. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31336179/>. Acesso em: 3 fev. 2021.

MENDES SAGGIORO, E. et al. Use of Titanium Dioxide Photocatalysis on the Remediation of Model Textile Wastewaters Containing Azo Dyes. **Molecules**, v. 16, p. 10370–10386, 2011.

MEZRIOUI, N.; BALEUX, B. Resistance patterns of *E. coli* strains isolated from domestic sewage before and after treatment in both aerobic lagoon and activated sludge. **Wat. Res.**, v. 28, n. 11, p. 2399–2406, 1994.

MICHAEL, I. et al. Urban wastewater treatment plants as hotspots for the release of antibiotics in the environment: A review. **Water Research**. Elsevier Ltd, , 1 mar. 2013.

MILLS, M.; LEE, J. The threat of carbapenem-resistant bacteria in the environment: evidence of widespread contamination of reservoirs at a global scale. **Environ Pollut**, v. 255, n. Pt 1, p. 113143, 1 dez. 2019.

MIŁOBEDZKA, A. et al. Monitoring antibiotic resistance genes in wastewater environments: The challenges of filling a gap in the One-Health cycle. **Journal of Hazardous Materials**, v. 424, p. 127407, 15 fev. 2022.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Saúde Única Ministério da Saúde . DF, 2019. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/svsa/antimicrobianos/plano-nacional-antimicrobianos-pan-br-14fev19-isbn.pdf/view>. Acesso em: 7 maio. 2023.

MIRZAEI, A. et al. Removal of pharmaceuticals from water by homo/heterogonous Fenton-type processes – A review. **Chemosphere**, v. 174, p. 665–688, 1 maio 2017.

MMATLI, M.; MBELLE, N. M.; SEKYERE, J. O. Global Epidemiology and Genetic Environment of *mcr* genes: A One Health Systematic Review of Current and Emerging Trends. **medRxiv**, p. 2022.02.28.22271560, 1 mar. 2022.

MOHAPATRA, S. S.; DWIBEDY, S. K.; PADHY, I. Polymyxins, the last-resort antibiotics: Mode of action, resistance emergence, and potential solutions. **Journal of Biosciences** **2021** **46:3**, v. 46, n. 3, p. 1–18, 26 ago. 2021.

MOKRACKA, J.; KOCZURA, R.; KAZNOWSKI, A. Multiresistant Enterobacteriaceae with class 1 and class 2 integrons in a municipal wastewater treatment plant. **Water Research**, v. 46, n. 10, p. 3353–3363, 15 jun. 2012.

MONTAGNER, C. C.; VIDAL, C.; ACAYABA, R. D. Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do Brasil: cenário atual e aspectos analíticos, ecotoxicológicos e regulatórios. **Quim. Nova**, v. 40, n. 9, p. 1094–1110, 2017.

MONTEIRO, J. et al. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. **American Society for Microbiology (ASM)**, jan. 2009. Disponível em: [/pmc/articles/PMC2612176/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17612176/). Acesso em: 8 fev. 2021

- MONTEIRO, J. et al. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 4, p. 906–909, abr. 2012.
- MONTES, L. D. Molecules That Changed the World (K. C. Nicolaou and T. Montagnon). **Journal of Chemical Education**, v. 86, n. 12, p. 1372, dez. 2009.
- MONTEZZI, L. F. et al. Occurrence of carbapenemase-producing bacteria in coastal recreational waters. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 45, n. 2, p. 174–177, 2015.
- MORAES, S. S. Evaluation of a Moving Bed Biofilm Reactor (MBBR) for Treating Hospital Wastewater. **Water Science and Technology**, v. 76, p. 1249–1257, 2017.
- MUKHERJEE, M. et al. Increased Antimicrobial and Multidrug Resistance Downstream of Wastewater Treatment Plants in an Urban Watershed. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 1269, 24 maio 2021.
- MÜLLER, H. et al. Dissemination of multi-resistant Gram-negative bacteria into German wastewater and surface waters. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 94, n. 5, p. 5, 1 maio 2018.
- MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Microbiology spectrum**, v. 4, n. 2, 25 mar. 2016.
- MUNOZ-PRICE, L. S. et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. **The Lancet Infectious Diseases**. Lancet Infect Dis, set. 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23969216/>. Acesso em: 8 fev. 2021.
- MURRAY, C. J. et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **The Lancet**, v. 399, n. 10325, p. 629–655, 12 fev. 2022.
- NAAS, T. et al. Beta-lactamase database (BLDB)—structure and function. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 32, n. 1, p. 917–919, 1 jan. 2021.
- NASCIMENTO, T. et al. International high-risk clones of *Klebsiella pneumoniae* KPC-2/CC258 and *Escherichia coli* CTX-M-15/CC10 in urban lake waters. **Science of the Total Environment**, v. 598, p. 910–915, 15 nov. 2017.
- NASRI, E. et al. Abundance of carbapenemase genes (blaKPC, blaNDM and blaOXA-48) in wastewater effluents from Tunisian hospitals. **Environmental Pollution**, v. 229, p. 371–374, 1 out. 2017.
- NCBI et al. NCBI Taxonomy: A comprehensive update on curation, resources and tools. **Database**, v. 2020, 2020.
- NICOLETTI, A. G. et al. Characterization of BKC-1 class A carbapenemase from *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 59, n. 9, p. 5159–5164, 1 set. 2015.
- NIDHEESH, P. V.; GANDHIMATHI, R. Trends in electro-Fenton process for water and

wastewater treatment: An overview. **Desalination**, v. 299, p. 1–15, 1 ago. 2012.

NIKKHAHI, F. et al. First detection of mobilized colistin resistance *mcr-1* gene in *Escherichia coli* isolated from livestock and sewage in Iran. **New Microbes and New Infections**, v. 41, 1 maio 2021.

NOGUEIRA, R. F. P.; OLIVEIRA, M. C.; PATERLINI, W. C. Simple and fast spectrophotometric determination of H₂O₂ in photo-Fenton reactions using metavanadate. **Talanta**, v. 66, n. 1, p. 86–91, 31 mar. 2005.

NOGUERA-OVIEDO, K.; AGA, D. S. Lessons learned from more than two decades of research on emerging contaminants in the environment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 316, p. 242–251, 2016.

NORDMANN, P. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: Overview of a major public health challenge. **Medecine et Maladies Infectieuses**, fev. 2014.

NORDMANN, P.; NAAS, T.; POIREL, L. Global spread of carbapenemase producing Enterobacteriaceae. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 10, p. 1791–1798, 2011.

NOSAKA, Y.; NOSAKA, A. Understanding Hydroxyl Radical (\bullet OH) Generation Processes in Photocatalysis. **ACS Energy Letters**, v. 1, n. 2, p. 356–359, 12 ago. 2016.

NOVO, A. et al. Antibiotic resistance, Antimicrobial residues and bacterial community composition in urban wastewater. **Water Research**, v. 47, n. 5, p. 1875–1887, 1 abr. 2013.

NOVO, A.; MANAIA, C. M. Factors influencing antibiotic resistance burden in municipal wastewater treatment plants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 3, p. 1157–1166, jul. 2010.

NÜESCH-INDERBINEN, M. et al. Complete and assembled genome sequence of an NDM-9- and CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* ST147 wastewater isolate from Switzerland. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 13, p. 53–54, 1 jun. 2018.

O'DOWD, K.; PILLAI, S. C. Photo-Fenton disinfection at near neutral pH: Process, parameter optimization and recent advances. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 8, n. 5, p. 104063, 1 out. 2020.

OBASI, A. et al. Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* from Pharmaceutical Wastewaters in South-Western Nigeria. **Microbial Drug Resistance**, v. 23, n. 8, p. 1013–1018, 1 dez. 2017.

OECD. **Antimicrobial Resistance - Tackling the Burden in the European Union**. 2019

OGURA, Y. et al. The level of antimicrobial resistance of sewage isolates is higher than that of river isolates in different *Escherichia coli* lineages. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–10, 1 dez. 2020.

OLAITAN, A. O.; MORAND, S.; ROLAIN, J. M. Mechanisms of polymyxin resistance: Acquired and intrinsic resistance in bacteria. **Frontiers in Microbiology**. Frontiers Media

S.A., , 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25505462/>. Acesso em: 3 mar. 2021.

OLIVEIRA, F. A. et al. MCR-1-positive colistin-resistant *Escherichia coli* in immunocompromised hospitalised patients. **International Journal of Antimicrobial Agents**. Elsevier B.V., 1 set. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29944955/>. Acesso em: 4 fev. 2021.

OLIVEIRA, P. M. et al. Clonal complexes of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* recovered from community sewage. **Journal of water and health**, v. 21, n. 1, p. 94–108, 1 jan. 2023.

ONE HEALTH COMMISSION. **What is One Health? - One Health Commission**.

Disponível em:

https://www.onehealthcommission.org/en/why_one_health/what_is_one_health/. Acesso em: 6 set. 2021.

OPAS. Alerta Epidemiológico: Surgimento e aumento de novas combinações de carbapenemases em *Enterobacteriales* na América Latina e no Caribe (22 de outubro de 2021). 22 out. 2021.

ÖSTERBLAD, M. et al. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Finland: the first years (2008–11). **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 67, n. 12, p. 2860–2864, dez. 2012.

OTEO, J. et al. Evolution of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae at the global and national level: What should be expected in the future? **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 32, n. S4, p. 17–23, 1 dez. 2014.

OVEJERO, C. M. et al. Spread of mcr-1 carrying Enterobacteriaceae in sewage water from Spain. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 4, p. dkw533, 10 jan. 2017.

PACHECO JORDÃO, E.; PESSOA, C. A. **TRATAMENTO DE ESGOTOS DOMÉSTICOS**. 8ª ed. Rio de Janeiro:2017.

PACZOSA, M. K.; MECSAS, J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 3, p. 629–661, set. 2016.

PAGE, M. G. P. Beta-lactam antibiotics. In: **Antibiotic Discovery and Development**. Springer US, 2020. v. 9781461414p. 79–117.

PAHO. **Antimicrobial Resistance, Fueled by the COVID-19 Pandemic**. 2021.

PAIVA, M. C. et al. Identification of new bacteria harboring qnrS and aac(6')-Ib/cr and mutations possibly involved in fluoroquinolone resistance in raw sewage and activated sludge samples from a full-scale WWTP. **Water Research**, v. 110, p. 27–37, 1 mar. 2017.

PALERMO, R. L. et al. Detecção de metalo-beta-lactamases em pseudomonas aeruginosa isoladas de efluente hospitalar e de amostras da estação de tratamento de esgoto municipal. **Londrina: II Congresso Paranaense de Microbiologia - Simpósio Sul**, 2016. Disponível

em: <https://proceedings.science/cpm/papers/deteccao-de-metallo-beta-lactamases-em-pseudomonas-aeruginosa-isoladas-de-efluente-hospitalar-e-de-amstras-da-estacao-de-tratamento-de-esgoto>. Acesso em: 21 fev. 2021.

PALZKILL, T. Metallo- β -lactamase structure and function. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1277, n. 1, p. 91–104, 1 jan. 2013.

PANDIS, P. K. et al. Key Points of Advanced Oxidation Processes (AOPs) for Wastewater, Organic Pollutants and Pharmaceutical Waste Treatment: A Mini Review. **ChemEngineering** 2022, Vol. 6, Page 8, v. 6, n. 1, p. 8, 18 jan. 2022.

PARVEZ, S.; KHAN, A. U. Hospital sewage water: a reservoir for variants of New Delhi metallo- β -lactamase (NDM)- and extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 51, n. 1, p. 82–88, 1 jan. 2018.

PASCHOAL, R. P. et al. Concentration and variety of carbapenemase producers in recreational coastal waters showing distinct levels of pollution. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 12, 1 dez. 2017.

PATAQUIVA-MATEUS, A. Y.; ZEA, H. R.; RAMIREZ, J. H. Degradation of Orange II by Fenton reaction using ilmenite as catalyst. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 7, p. 6187–6194, 1 mar. 2017.

PEACH, K. C. et al. Mechanism of action-based classification of antibiotics using high-content bacterial image analysis. **Molecular BioSystems**, v. 9, n. 7, p. 1837–1848, 4 jun. 2013.

PEIRANO, G. et al. Carbapenem-hydrolysing β -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, n. 2, p. 265–268, 2009.

PEIRANO, G. et al. Emerging antimicrobial-resistant high-risk *Klebsiella pneumoniae* clones ST307 and ST147. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 64, n. 10, 1 out. 2020.

PERDIGÃO NETO, L. V. et al. Simultaneous colonization by *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* harboring mcr-1 in Brazil. **Infection**, v. 47, n. 4, p. 661–664, 1 ago. 2019.

PEREIRA, A. L. et al. Environmental spreading of clinically relevant carbapenem-resistant gram-negative bacilli: the occurrence of bla KPC-or-NDM strains relates to local hospital activities. **BMC Microbiology**, v. 22, n. 1, p. 1–12, 1 dez. 2022.

PETRIE, B.; BARDEN, R.; KASPRZYK-HORDERN, B. A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: Current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. **Water Research**, v. 72, p. 3–27, 1 abr. 2015.

PETROVIC, M. et al. Emerging contaminants in waste waters: Sources and occurrence. **Handbook of Environmental Chemistry, Volume 5: Water Pollution**, v. 5 S1, p. 1–35, 2008.

- PICÃO, R. C. et al. 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, maio 2013.
- PICCIRILLI, A. et al. Whole-Genome Sequencing (WGS) of Carbapenem-Resistant *K. pneumoniae* Isolated in Long-Term Care Facilities in the Northern Italian Region. **Microorganisms** 2021, Vol. 9, Page 1985, v. 9, n. 9, p. 1985, 17 set. 2021.
- PINTO, P. S. et al. Iron Recovery from Iron Ore Tailings by Direct Hydrogen Reduction at Low Temperature and Magnetic Separation. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 33, n. 8, p. 969–977, 15 jun. 2022.
- POIREL, L. et al. Plasmid-mediated carbapenem and colistin resistance in a clinical isolate of *Escherichia coli*. **The Lancet Infectious Diseases**. Lancet Publishing Group, 1 mar. 2016. Disponível em: <http://www.resapath.anses.fr>. Acesso em: 3 fev. 2021.
- POIREL, L.; JAYOL, A.; NORDMANN, P. Polymyxins: Antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. **Clinical Microbiology Reviews**. American Society for Microbiology, 1 abr. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28275006/>. Acesso em: 2 fev. 2021.
- POLLY, M. et al. Impact of the COVID-19 pandemic on the incidence of multidrug-resistant bacterial infections in an acute care hospital in Brazil. **American journal of infection control**, v. 50, n. 1, p. 32–38, 1 jan. 2022.
- POURAN, S. R. et al. Review on the application of modified iron oxides as heterogeneous catalysts in Fenton reactions. **Journal of Cleaner Production**. Elsevier. 2014.
- PRAVEENKUMARREDDY, Y. et al. Occurrence of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* in sewage treatment plants of south India. **Journal of Water Sanitation and Hygiene for Development**, v. 10, n. 1, p. 48–55, 1 mar. 2020.
- PRUDEN, A. Balancing water sustainability and public health goals in the face of growing concerns about antibiotic resistance. **Environmental Science and Technology**, v. 48, n. 1, p. 5–14, 7 jan. 2014.
- RADOVIĆ VUČIĆ, M. et al. Comparison of the advanced oxidation processes in the degradation of pharmaceuticals and pesticides in simulated urban wastewater: Principal component analysis and energy requirements. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 149, p. 786–793, 1 maio 2021.
- RAMALHO, R. et al. The occurrence of antimicrobial residues and antimicrobial resistance genes in urban drinking water and sewage in Southern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 1, p. 3, 2022.
- RASTOGI, R. P. et al. Molecular Mechanisms of Ultraviolet Radiation-Induced DNA Damage and Repair. **Journal of Nucleic Acids**, v. 2010, p. 32, 2010.
- RAU, R. B. et al. Emergence of mcr-1 Producing *Salmonella enterica* serovar Typhimurium

from Retail Meat: First Detection in Brazil. **Foodborne Pathogens and Disease**. Mary Ann Liebert Inc., 1 jan. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29048947/>. Acesso em: 3 fev. 2021.

REBELO, A. R. et al. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* and *mcr-5* for surveillance purposes. **Eurosurveillance**, v. 23, n. 6, 8 fev. 2018.

REDDY, N. et al. A 2018–2019 patent review of metallo beta-lactamase inhibitors. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**. Taylor and Francis Ltd, , 2 jul. 2020. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/13543776.2020.1767070>. Acesso em: 26 nov. 2020.

REINKE, R. A. et al. A method to quantify viable carbapenem resistant gram-negative bacteria in treated and untreated wastewater. **Journal of Microbiological Methods**, v. 179, p. 106070, 1 dez. 2020.

REIS, M. Aplicabilidade de sistemas simplificados para estações de tratamento de esgoto de cidades de pequeno porte. Dissertação. **UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA**, 2014.

REIS, M. Degradação dos antibióticos ciprofloxacino, sulfametoxazol e tetraciclina por fotocatalise heterogênea mediada por resíduo de mineração. Tese. Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca (ENSP), 2022.

REYGAERT, W. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. **AIMS Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 482–501, 2018.

RIBEIRO, V. B. et al. Molecular characterization of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing isolates in southern Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. PART 11, p. 1721–1727, 1 nov. 2013.

RIVERA-IZQUIERDO, M. et al. OXA-48 Carbapenemase-Producing *Enterobacteriales* in Spanish Hospitals: An Updated Comprehensive Review on a Rising Antimicrobial Resistance. **Antibiotics**, v. 10, n. 1, p. 1–16, 1 jan. 2021.

RIZZO, L. et al. Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: A review. **Science of the Total Environment**, 1 mar. 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23396083/>. Acesso em: 15 set. 2020.

ROBERTS, J. A.; WEBB, S. A. R.; LIPMAN, J. Cefepime versus ceftazidime: considerations for empirical use in critically ill patients. **International journal of antimicrobial agents**, v. 29, n. 2, p. 117–128, fev. 2007.

ROBERTS, S. C.; ZEMBOWER, T. R. Global increases in antibiotic consumption: a concerning trend for WHO targets. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, p. 10–11, 1 jan. 2021.

ROCHA, I. V. et al. Ciprofloxacin-resistant and extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* ST410 strain carrying the *mcr-1* gene associated with bloodstream infection.

International Journal of Antimicrobial Agents. Elsevier B.V., 1 maio 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28302539/>. Acesso em: 4 fev. 2021.

ROCK, C.; DONNENBERG, M. S. Human Pathogenic Enterobacteriaceae. **Reference Module in Biomedical Sciences**, 1 jan. 2014.

RODRIGUES, A. C. S. et al. Molecular Epidemiology of blaKPC-Encoding *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Public Hospitals in Midwest of Brazil. **Microbial Drug Resistance**, v. 28, n. 1, p. 1–6, 1 jan. 2022.

RODRÍGUEZ-MOLINA, D. et al. Do wastewater treatment plants increase antibiotic resistant bacteria or genes in the environment? Protocol for a systematic review. **Systematic Reviews**, v. 8, n. 1, p. 1–8, 5 dez. 2019.

RODRÍGUEZ-MOLINA, D. et al. Carriage of ESBL-producing *Enterobacteriales* in wastewater treatment plant workers and surrounding residents — the AWARE Study. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, p. 1, 2021.

RODRIGUEZ-MOZAZ, S. et al. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river. **Water Research**, v. 69, p. 234–242, 1 fev. 2015.

ROLBIECKI, D. et al. Detection of carbapenemase-producing, hypervirulent *Klebsiella* spp. in wastewater and their potential transmission to river water and WWTP employees. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 237, 1 ago. 2021.

ROLIM TAVARES, F. B. et al. Análise do Acesso da População Brasileira a Serviços de Saneamento Básico. **Research, Society and Development, ISSN-e 2525-3409, Vol. 8, Nº. 4, 2019 (Ejemplar dedicado a: April; e3684899)**, v. 8, n. 4, p. 20, 2019.

RUALES-LONFAT, C. et al. Iron oxides semiconductors are efficient for solar water disinfection: A comparison with photo-Fenton processes at neutral pH. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 166–167, p. 497–508, 1 maio 2015.

RUALES-LONFAT, C. et al. Bacterial inactivation with iron citrate complex: A new source of dissolved iron in solar photo-Fenton process at near-neutral and alkaline pH. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 180, p. 379–390, 1 jan. 2016.

RUBIO, D. et al. Comparative effect of simulated solar light, UV, UV/H₂O₂ and photo-Fenton treatment (UV-Vis/H₂O₂/Fe²⁺,³⁺) in the *Escherichia coli* inactivation in artificial seawater. **Water Research**, v. 47, n. 16, p. 6367–6379, 5 out. 2013.

RUNCHAROEN, C. et al. Whole genome sequencing of ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from patients, farm waste and canals in Thailand. **Genome Medicine**, v. 9, n. 1, 6 set. 2017.

RYU, S. et al. One Health Perspectives on Emerging Public Health Threats. **Journal of Preventive Medicine and Public Health**, v. 50, n. 6, p. 411, 1 nov. 2017.

SACRAMENTO, A. G. et al. Genomic analysis of MCR-1 and CTX-M-8 co-producing

Escherichia coli ST58 isolated from a polluted mangrove ecosystem in Brazil. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**. Elsevier Ltd, , 1 dez. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30404044/>. Acesso em: 4 fev. 2021.

SAKKAS, H. et al. Antimicrobial Resistance in Bacterial Pathogens and Detection of Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* Isolates from Hospital Wastewater. **Antibiotics**, v. 8, n. 3, 1 set. 2019.

SALAZAR, C. et al. Human microbiota drives hospital-associated antimicrobial resistance dissemination in the urban environment and mirrors patient case rates. **Microbiome**, 2021.

SANDERSON, H. et al. Antibiotic resistance genes as an emerging environmental contaminant. **Environmental Reviews**. Canadian Science Publishing, , 2016. Disponível em: <https://cdnsiencepub.com/doi/abs/10.1139/er-2015-0069>. Acesso em: 10 abr. 2021.

SAWA, T.; KOOGUCHI, K.; MORIYAMA, K. Molecular diversity of extended-spectrum β -lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance. **Journal of Intensive Care**. BioMed Central Ltd., , 28 jan. 2020. Disponível em: <https://jintensivecare.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40560-020-0429-6>. Acesso em: 4 fev. 2021.

SCARIA, J.; NIDHEESH, P. V. Pre-treatment of real pharmaceutical wastewater by heterogeneous Fenton and persulfate oxidation processes. **Environmental Research**, v. 217, p. 114786, 15 jan. 2023.

SEIBERT, G. et al. Nosocomial infections by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase producing enterobacteria in a teaching hospital. **Einstein (São Paulo, Brazil)**, v. 12, n. 3, p. 282–286, 1 set. 2014.

SEKI, L. M. et al. Molecular epidemiology of KPC-2- producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Brazil: The predominance of sequence type 437. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 70, n. 2, p. 274–277, jun. 2011.

SEKIZUKA, T. et al. Complete Genome Sequence of a bla KPC-2 -Positive *Klebsiella pneumoniae* Strain Isolated from the Effluent of an Urban Sewage Treatment Plant in Japan . **mSphere**, v. 3, n. 5, 19 set. 2018.

SELLERA, F. P. et al. *Escherichia coli* carrying IncX4 plasmid-mediated *mcr-1* and *bla*_{CTX-M} genes in infected migratory Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 4, p. dkw543, 28 dez. 2016.

SERNA-GALVIS, E. A. et al. Inactivation of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* by photo-Fenton: Residual effect, gene evolution and modifications with citric acid and persulfate. **Water Research**, v. 161, p. 354–363, 15 set. 2019.

SHARMA, V. K. et al. Elimination of antibiotic resistance genes and control of horizontal transfer risk by UV-based treatment of drinking water: A mini review. **Frontiers of Environmental Science and Engineering**. Higher Education Press, , 1 jun. 2019. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11783-019-1122-7>. Acesso em: 7 abr. 2021.

- SHEN, Z. et al. Early emergence of *mcr-1* in *Escherichia coli* from food-producing animals. **The Lancet Infectious Diseases**. Lancet Publishing Group, 1 mar. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26973308/>. Acesso em: 3 fev. 2021.
- SHEU, C. C. et al. Infections Caused by Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: An Update on Therapeutic Options. **Frontiers in microbiology**, v. 10, n. JAN, 2019.
- SHIN, H. et al. Emergence of High Level Carbapenem and Extensively Drug Resistant *Escherichia coli* ST746 Producing NDM-5 in Influent of Wastewater Treatment Plant, Seoul, South Korea. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 664, 23 mar. 2021.
- SILVA, P. N. et al. Saneamento e Saúde. In: **Série Fiocruz - Documentos Institucionais**. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 2018. p. 1–74.
- SILVEIRA, J. E. et al. UV-LED/ilmenite/persulfate for azo dye mineralization: The role of sulfate in the catalyst deactivation. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 219, p. 314–321, 15 dez. 2017.
- SKOV, R. L.; MONNET, D. L. Plasmid-mediated colistin resistance (*mcr-1* gene): three months later, the story unfolds. **Eurosurveillance**, v. 21, n. 9, p. 30155, 3 mar. 2016.
- SNIS. Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgoto. **Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento**. 2021. Disponível em: <http://www.snis.gov.br/diagnosticos>. Acesso em: 23 mar. 2021.
- SOON, A. N.; HAMEED, B. H. Heterogeneous catalytic treatment of synthetic dyes in aqueous media using Fenton and photo-assisted Fenton process. **Desalination**, v. 269, n. 1–3, p. 1–16, 15 mar. 2011.
- SOUSA, A. B. A.; RAMALHO, F. L.; CAMARGO, B. Prevalência de Infecções nosocomiais ocasionadas por *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase (KPC) em indivíduos hospitalizados. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 2, p. 1915–1932, 16 mar. 2020.
- SPUHLER, D.; ANDRÉS RENGIFO-HERRERA, J.; PULGARIN, C. The effect of Fe²⁺, Fe³⁺, H₂O₂ and the photo-Fenton reagent at near neutral pH on the solar disinfection (SODIS) at low temperatures of water containing *Escherichia coli* K12. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 96, n. 1–2, p. 126–141, 26 abr. 2010.
- STANGE, C. et al. Comparative removal of antibiotic resistance genes during chlorination, ozonation, and UV treatment. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 222, n. 3, p. 541–548, 2019.
- SUN, H. QI; LU, X. MEI; GAO, P. JI. The Exploration of the Antibacterial Mechanism of FE₃⁺ against Bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 410, 2011.
- SUTHERLAND, K. P. et al. Human sewage identified as likely source of white pox disease of the threatened Caribbean elkhorn coral, *Acropora palmatae*. 2010.
- SUZUKI, Y. et al. Environmental presence and genetic characteristics of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae from hospital sewage and river water in the philippines.

Applied and Environmental Microbiology, v. 86, n. 2, 1 jan. 2020.

TADEUSZ, P.; KONIECZNY, R.; ALICJA, BARANOWSKA ZBIGNIEW, S. The growing resistance of bacterial strains to antibiotics. **Pol Merkur Lekarski**, v. 47, n. 279, p. 106–110, 2019.

TCHOBANOGLIOUS, G.; BURTON, F. L.; DAVID STENSEL, H. Wastewater Engineering: Treatment and Resource Recovery. **McGraw-Hills** 5th editio ed. 2014.

TEBAN-MAN, A. et al. Wastewaters, with or without Hospital Contribution, Harbour MDR, Carbapenemase-Producing, but Not Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. **Antibiotics (Basel, Switzerland)**, v. 10, n. 4, 1 abr. 2021.

TEKELI, A. et al. Characterization of *Klebsiella pneumoniae* Coproducing KPC and NDM-1 Carbapenemases from Turkey. **Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)**, v. 26, n. 2, p. 118–125, 1 fev. 2020.

TENOVER, F. C. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. **American Journal of Medicine**, v. 119, n. 6 SUPPL. 1, p. S3–S10, 1 jun. 2006.

THAKUR, I.; ÖRMECI, B.; VERMA, A. Inactivation of *E. coli* in water employing Fe-TiO₂ composite incorporating in-situ dual process of photocatalysis and photo-Fenton in fixed-mode. **Journal of Water Process Engineering**, v. 33, 1 fev. 2020.

TIAN, D. et al. Resistance phenotype and clinical molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* among pediatric patients in Shanghai. **Infection and drug resistance**, v. 11, p. 1935–1943, 2018.

TIEDJE, J. M. et al. Antibiotic Resistance Genes in the Human-Impacted Environment: A One Health Perspective. **Pedosphere**, v. 29, n. 3, p. 273–282, 1 jun. 2019.

TILAHUN, M. et al. Emerging Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Infection, Its Epidemiology and Novel Treatment Options: A Review. 2021.

TOKUMURA, M. et al. Iron redox cycling in hydroxyl radical generation during the photo-Fenton oxidative degradation: Dynamic change of hydroxyl radical concentration. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 106, n. 3–4, p. 565–576, 11 ago. 2011.

TOLENTINO, F. M. et al. Endemicity of the High-Risk Clone *Klebsiella pneumoniae* ST340 Coproducing QnrB, CTX-M-15, and KPC-2 in a Brazilian Hospital. **Liebertpub**, v. 25, n. 4, p. 528–537, 8 maio 2019.

TOO, R. J. et al. Frequency and diversity of carbapenemase-producing *Enterobacterales* recovered from untreated wastewater impacted by selective media containing cefotaxime and meropenem in Ohio, USA. **PLOS ONE**, v. 18, n. 2, p. e0281909, 1 fev. 2023.

TOOKE, C. L. et al. β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. **Journal of Molecular Biology**. Academic Press, 23 ago. 2019a. Disponível em: [/pmc/articles/PMC6723624/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35484441/). Acesso em: 14 jan. 2021.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 12ª Edição ed. Porto Alegre: 2017.

TUROLLA, A. et al. Antibiotic resistant bacteria in urban sewage: Role of full-scale wastewater treatment plants on environmental spreading. **Chemosphere**, v. 191, p. 761–769, 2018.

TURUMTAY, H. et al. Characteristics in the whole-genome sequence of *Klebsiella pneumoniae* ST147 from Turkey. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v. 69, n. 2, p. 144–149, 22 fev. 2022.

UMAR, M.; RODDICK, F.; FAN, L. Moving from the traditional paradigm of pathogen inactivation to controlling antibiotic resistance in water - Role of ultraviolet irradiation. **Science of the Total Environment**, v. 662, p. 923–939, 2019.

VARDANYAN, R.; HRUBY, V. Antibiotics. In: **Synthesis of Best-Seller Drugs**. Elsevier, 2016. p. 573–643.

VELKOV, T. et al. Pharmacology of polymyxins: New insights into an 'old class of antibiotics. **Future Microbiology**, v. 8, n. 6, p. 711–724, jun. 2013.

VELKOV, T. et al. Teaching “old” polymyxins new tricks: New-generation lipopeptides targeting gram-negative “superbugs”. **ACS Chemical Biology**, v. 9, n. 5, p. 1172–1177, 16 maio 2014.

VENIERI, D. et al. Solar photocatalysis as disinfection technique: Inactivation of *Klebsiella pneumoniae* in sewage and investigation of changes in antibiotic resistance profile. **Journal of Environmental Management**, v. 195, p. 140–147, 15 jun. 2017.

VIEGAS, D. M.; SOARES, V. M. Prevalence of carbapenemase in Enterobacteriaceae with decreased susceptibility to carbapenems isolated in a tertiary referral hospital. **Journal Bras Patol Med Lab.**, v. 54, n. 2, p. 95–98, 2018.

VIVAS, R. et al. Prevalence of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase - and New Delhi metallo-beta-lactamase-positive *K. pneumoniae* in Sergipe, Brazil, and combination therapy as a potential treatment option. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 53, p. 1–8, 2020.

VON SPERLING, M. Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos. **Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias**. 3. ed. ed. Belo Horizonte: DESA-UFMG, 2005.

VON SPERLING, M. Tratamento de esgotos domésticos. 6ª edição ed. **Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental** da Universidade Federal de Minas Gerais., 2017.

WALTER, M. V; VENNES, J. W. Occurrence of multiple-antibiotic-resistant enteric bacteria in domestic sewage and oxidation lagoons. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 930–933, 1985.

WANG, C. et al. Identification of novel mobile colistin resistance gene mcr-10. **Emerging**

Microbes and Infections, v. 9, n. 1, p. 508–516, 1 jan. 2020.

WANG, J.; ZHUAN, R. Degradation of antibiotics by advanced oxidation processes: An overview. **Science of the Total Environment**, v. 701, 20 jan. 2020.

WANG, R. et al. The global distribution and spread of the mobilized colistin resistance gene *mcr-1*. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2018a.

WANG, X. et al. Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, *mcr-8*, in NDM-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Emerging Microbes and Infections**, v. 7, n. 1, 1 dez. 2018b.

WHITMAN, W. B. et al. (EDS.). *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2015.

WHO. Health promotion and the social determinants of health. **World Health Organization**. Disponível em: [https://www.who.int/social_determinants/country_action/AFRO Health promotion Dr Nyamwaya- HPR.pdf](https://www.who.int/social_determinants/country_action/AFRO_Health_promotion_Dr_Nyamwaya-HPR.pdf). Acesso em: 5 set. 2021.

WHO. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. World Health Organization, 2014. Disponível em: <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>. Acesso em: 24 out. 2020.

WHO. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. **World Health Organization**. Genebra, Suíça: World Health Organization, 2017a. Disponível em: <http://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/>. Acesso em: 2 mar. 2021.

WHO. Antibiotic resistance. **World Health Organization** Disponível em: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5664:folha-informativa-resistencia-aos-antibioticos&Itemid=812. Acesso em: 19 out. 2020.

WHO. Guidelines on use of medically important antimicrobials in food-producing animals. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 7, n. 1, 17 jan. 2018b.

WHO. No time to wait: Securing the future from drug-resistant infections. **World Health Organization**. 2019.

WHO. Surveillance of Antimicrobial Use. **World Health Organization**. 2019.

WHO. Technical Brief on Water, Sanitation, Hygiene and Wastewater Management to Prevent Infections and Reduce the Spread of Antimicrobial Resistance. **World Health Organization**. 2020.

WHO. Global Tricycle Surveillance. **World Health Organization** 2021. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240021402>. Acesso em: 12 jan. 2021.

WHO. Preventing Antimicrobial Resistance Together. **World Antimicrobial Awareness Week Preventing Antimicrobial Resistance Together**. 2022. Disponível em: <https://www.who.int/campaigns/world-antimicrobial-awareness-week>. Acesso em: 12 jan.

2021.

WHO; UNICEF. Contributing to One World, One Health: a strategic framework for reducing risks of infectious diseases at the animal-human-ecosystems interface. 2008. Disponível em: <http://www.fao.org/3/aj137e/aj137e00.htm>. Acesso em: 8 set. 2021.

WINK, P. L. et al. Increased frequency of bla_{NDM} in a tertiary care hospital in southern Brazil. **Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, v. 52, n. 1, p. 299–301, 1 mar. 2021.

WOODFORD, N. et al. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and non-Enterobacteriaceae from animals and the environment: an emerging public health risk of our own making? **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 69, n. 2, p. 287–291, fev. 2014.

XAVIER, B. B. et al. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, mcr-2, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. **Eurosurveillance**, v. 21, n. 27, p. 30280, 7 jul. 2016.

XIA, D. et al. Persulfate-mediated catalytic and photocatalytic bacterial inactivation by magnetic natural ilmenite. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 238, p. 70–81, 15 dez. 2018.

YANG, Y.-Q. et al. Novel plasmid-mediated colistin resistance gene mcr-7.1 in *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 7, p. 1791–1795, 1 jul. 2018.

YANG, Y. et al. Carriage of distinct bla KPC-2 and bla OXA-48 plasmids in a single ST11 hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* isolate in Egypt. **BMC Genomics**, v. 23, n. 1, p. 1–9, 1 dez. 2022.

YAO, X. et al. Carbapenem-resistant and colistin-resistant *Escherichia coli* co-producing NDM-9 and MCR-1. **The Lancet Infectious Diseases** Lancet Publishing Group, , 1 mar. 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/>. Acesso em: 3 fev. 2021.

YAO, Y. et al. New Delhi Metallo- β -Lactamase-Producing *Enterobacteriales* Bacteria. **Emerging infectious diseases**, v. 28, n. 1, p. 265, 1 jan. 2022.

YEOH, J. X. et al. Comparison between Conventional Treatment Processes and Advanced Oxidation Processes in Treating Slaughterhouse Wastewater: A Review. **Water 2022, Vol. 14, Page 3778**, v. 14, n. 22, p. 3778, 21 nov. 2022.

YIGIT, H. et al. Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 4, p. 1151–1161, 2001.

YIN, W. et al. Novel plasmid-mediated colistin resistance gene mcr-3 in *Escherichia coli*. **mBio**, v. 8, n. 3, p. 543–560, 1 maio 2017.

YONG, D. et al. Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, bla NDM-1, and a

novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 12, p. 5046–5054, 1 dez. 2009.

YU, Z. et al. Antibacterial Mechanisms of Polymyxin and Bacterial Resistance. **BioMed Research Internacional**. p. 11 2015.

ZAGUI, G. S. et al. Gram-negative bacteria carrying β -lactamase encoding genes in hospital and urban wastewater in Brazil. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 192, n. 6, 1 jun. 2020.

ZAGUI, G. S. et al. Tertiary hospital sewage as reservoir of bacteria expressing MDR phenotype in Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 82, 5 mar. 2021.

ZAVASCKI, A. P. et al. Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, n. 6, p. 1206–1215, 3 out. 2007.

ZENG, L. et al. Microbial Characteristics and Genomic Analysis of an ST11 Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Strain Carrying blaKPC-2 Conjugative Drug-Resistant Plasmid. **Frontiers in Public Health**, v. 9, 27 jan. 2022.

ZHANG, L. et al. The prevalence and characterization of extended-spectrum β -lactamase-and carbapenemase-producing bacteria from hospital sewage, treated effluents and receiving rivers. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 4, 2 fev. 2020.

ZHANG, Y. et al. Reduction of antibiotic resistance genes in municipal wastewater effluent by advanced oxidation processes. **Science of The Total Environment**, v. 550, p. 184–191, 15 abr. 2016.

ZHAO, F. et al. IncP plasmid carrying colistin resistance gene *mcr-1* in *Klebsiella pneumoniae* from hospital sewage. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 2, 1 fev. 2017a.

ZHAO, F. et al. Remarkable diversity of *Escherichia coli* carrying *mcr-1* from hospital sewage with the identification of two new *mcr-1* variants. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. OCT, 25 out. 2017b.

ZHAO, F.; ZONG, Z. *Kluyvera ascorbata* strain from hospital sewage carrying the *mcr-1* colistin resistance gene. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 12, p. 7498–7501, 1 dez. 2016.

ZHAO, X.; DRLICA, K. Reactive oxygen species and the bacterial response to lethal stress. **Current opinion in microbiology**, v. 0, p. 1, 2014.

ZURFUH, K. et al. Occurrence of the Plasmid-Borne *mcr-1* Colistin Resistance Gene in Extended-Spectrum-Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* in River Water and Imported Vegetable Samples in Switzerland. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. American Society for Microbiology, 1 abr. 2016. Disponível em:

148<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26883696/>. Acesso em: 18 fev. 2021.

ANEXO A – ARTIGO PUBLICADO

Journal of Applied Microbiology, 2023, 0, 1–10
<https://doi.org/10.1093/jambio/ksad130>
 Advance access publication date: 30 June 2023
 Research Article

JOURNAL OF
 APPLIED
 MICROBIOLOGY

OXFORD
 UNIVERSITY PRESS

Occurrence of *Klebsiella pneumoniae* ST244 and ST11 extensively drug-resistant producing KPC, NDM, OXA-370 in wastewater, Brazil

Kaylanne Montenegro^{1,2}, Claudia Flores³, Ana Paula Alves Nascimento³, Beatriz Oliveira Farias³, Andressa S. Gonçalves Brito^{3,4}, Mariana Magaldi³, Aline Gimenez³, Ivano de Filippis^{3,4}, Maysa Mandetta Clementino^{3,4,5}, Kayo Bianco^{3,4,5,*}, Enrico Saggiaro^{2,6,*}, Paulo Barrocas^{1,2}

¹National School of Public Health Sérgio Arouca, ENSP, Oswaldo Cruz Foundation—FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ 4365, Brazil

²Post-Graduation Program in Public Health and Environment, Sergio Arouca National School of Public Health, Oswaldo Cruz Foundation, 1480 Leopoldo Bulhões Ave, Rio de Janeiro, RJ 21041-210, Brazil

³National Institute of Quality Control in Health—INCQS, Oswaldo Cruz Foundation—FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ 4365, Brazil

⁴Fiocruz Genomic Network, Oswaldo Cruz Foundation—FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ 4365, Brazil

⁵COVID-19 Monitoring Network in Wastewater, 09210-580, Brazil

⁶Environmental Health Evaluation and Promotion Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, 4365 Brasil Ave, Rio de Janeiro, RJ 21045-900, Brazil

*Corresponding author. Kayo Bianco, National Institute of Quality Control in Health—INCQS, Oswaldo Cruz Foundation—FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ 4365, Brazil. E-mail: kayo.bianco@fiocruz.br; Enrico Saggiaro, Post-Graduation Program in Public Health and Environment, Sergio Arouca National School of Public Health, Oswaldo Cruz Foundation, 1480 Leopoldo Bulhões Ave, Rio de Janeiro, RJ 21041-210. E-mail: enrico.saggiaro@fiocruz.br

Abstract

Aims: To investigate the occurrence of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKP) and their clonal relationships from hospital and municipal wastewater treatment plants (WWTPs).

Methods and results: Eighteen *Kl. pneumoniae* strains recovered from three WWTPs were identified by matrix-assisted laser desorption-ionization–time of flight (MALDI-TOF). The antimicrobial susceptibility were evaluated by disk-diffusion and the carbapenemases production by CarbaPenembaio®. The carbapenemases genes were investigated by real-time PCR and the clonal relationship through multilocus sequence typing (MLST). Thirty nine % (7/18) of isolates were classified as multidrug-resistant (MDR), 61.1% (11/18) extensively drug-resistant (XDRI), and 83.3% (15/18) showed carbapenemase activity. Three carbapenemase-encoding genes were found, *bla_{KPC}* (55%), *bla_{NDM}* (27.8%) and *bla_{OXA-370}* (11.1%) as well five sequencing types ST11, ST37, ST147, ST244, and ST281. ST11 and ST244, sharing four alleles were grouped into clonal complex 11 (CC11).

Conclusions: Our results show the importance of monitoring antimicrobial resistance in WWTPs effluents to minimize the risk of spreading bacterial load and ARGs in aquatic ecosystems, using advanced treatment technologies to reduce these emerging pollutants at WWTPs.

Significance and impact of study

To our knowledge, this is the first report of KPC, NDM, OXA-370- producing ST 244 in sewage. Furthermore, the occurrence and persistence of CRKP ST11 carrying different resistance genetic profiles in treated effluents may generating negative impacts on public and environmental health.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, wastewater, antibiotic resistance genes, carbapenemase, multilocus sequencing typing

Introduction

Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKP) strains are constantly associated with nosocomial infections (David et al. 2019, Li et al. 2022). The spread of high-risk clones is considered a worldwide potential threat (Arcari and Caratoli 2023). Carbapenems are effective antimicrobials and are widely used for the treatment of infections caused by multidrug-resistant (MDR) *Enterobacteriales*. Due to the increase in its use, the great adaptive capacity of bacteria, which are able to develop or acquire different resistance mechanisms that allow them to survive exposure to antibiotics (Reddy et al. 2020, Zhang et al. 2020). One of the main mechanisms of re-

sistance to these antibiotics is the production of hydrolytic enzymes, among them the so-called carbapenemases (Aurilio et al. 2022). As an example, one can cite the *Kl. pneumoniae* carbapenemase (KPC) (Flores et al. 2020), New Delhi metallo- β -lactamases (NDM) (Yao et al. 2022), and Oxacillinases (OXA) (Rivera-Izquierdo et al. 2021).

CRKP carriers of carbapenemase-encoding genes are a cause for great concern, as their prevalence in nosocomial infections limits therapeutic options and is associated with high mortality rates (Bush 2018; Vrancianu et al. 2021). The increased prevalence of CRKP KPC and NDM enzymes in hospitals has already been reported in Brazil (Vivas et al. 2020,

Received: April 25, 2023. Revised: June 5, 2023. Accepted: June 28, 2023

© The Author(s) 2023. Published by Oxford University Press on behalf of Applied Microbiology International. All rights reserved. For permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com