

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

Kayo Cesar Bianco Fernandes

**Poluentes Químicos e Biológicos em Ambientes Aquáticos e seus Impactos na
Estrutura e no Resistoma Móvel de Comunidades Microbianas**

Rio de Janeiro

2019

Kayo Cesar Bianco Fernandes

**POLUENTES QUÍMICOS E BIOLÓGICOS EM AMBIENTES AQUÁTICOS E SEUS
IMPACTOS NA ESTRUTURA E NO RESISTOMA MÓVEL DE COMUNIDADES
MICROBIANAS**

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

Orientadora: Maysa Beatriz Mandetta Clementino

Rio de Janeiro

2019

Catologação na Fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Biblioteca

Bianco Fernandes, Kayo Cesar

Poluentes Químicos e Biológicos em Ambientes Aquáticos e seus Impactos na Estrutura e no Resistoma Móvel de Comunidades Microbianas. / Kayo Cesar Bianco Fernandes. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2019.

175 f. : fig. ; tab.

Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2019.

Orientadora: Maysa Beatriz Mandetta Clementino.

1. Água. 2. Traços Inorgânicos. 3. Resíduos. 4. Antimicrobianos. 5. Resistência. I. Título.

Chemical and Biological Pollutants in Aquatic Environments and their Impacts on Microbial Communities Mobile Structure and Resistance.

Kayo Cesar Bianco Fernandes

**POLUENTES QUÍMICOS E BIOLÓGICOS EM AMBIENTES AQUÁTICOS E SEUS
IMPACTOS NA ESTRUTURA E NO RESISTOMA MÓVEL DE COMUNIDADES
MICROBIANAS**

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

Aprovado em: _____ de _____ de _____

BANCA EXAMINADORA

Ivano Raffaele Victorio de Filippis Capasso (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - INCQS/FIOCRUZ

Paulo Rubens Guimarães Barrocas (Doutor)
Escola Nacional de Saúde Pública - ENSP/FIOCRUZ

Rodolpho Mattos Albano (Doutor)
Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ

Maysa Beatriz Mandetta Clementino (Doutora)- Orientadora
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - INCQS/FIOCRUZ

Dedico esta tese a mim mesmo,
pelo meu esforço, minha dedicação e perseverança.

Na pesquisa científica depus parte da minha alma e
é essa parte que me mantém vivo em meio aos momentos de escuridão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe, meu porto seguro, heroína que me deu apoio, incentivo nas horas difíceis, de desânimo e cansaço;

Ao meu pai pelo amor, incentivo e apoio incondicional, que apesar de todas as dificuldades me fortaleceu;

Ao meu irmão, que nos momentos de minha ausência, dedicados ao estudo, sempre fez entender que o futuro é feito a partir da constante dedicação no presente;

A minha avó, Iolanda Bianco (*in memoriam*), pelos momentos de descontração e afeto;

A amiga Ariana Tarabal (*in memoriam*), pelo meu nome e pelos abraços infinitos e acolhedores que trocávamos sempre que nos encontrávamos;

À Maysa Mandetta pela orientação e amizade, pelo estímulo à pesquisa, pelo exemplo de dedicação, persistência e consciência social e, acima de tudo, por ter confiado em mim;

À Claudia Flores, uma grande amiga, que sempre esteve disposta a me ajudar. Você sempre ouviu meus infinitos devaneios com uma paciência fenomenal e nunca hesitou em ajudar. Obrigado pelos conselhos e apoio;

À Samara Oliveira, pelos momentos de intensa raiva e felicidade que me fez passar. Nós somos duas pessoas difíceis de aguentar, mas temos um bom coração ;

Aos companheiros de laboratório: Luca Mokus e Andressa Brito, vocês fizeram essa jornada mais leve e me renderam boas risadas;

Ao Dr. Antonio Ventosa, que me recebeu de braços abertos no Laboratório de Halofílicos em Sevilla, por me oferecer tantos recursos e oportunidades para executar este estudo;

A Rafael Huiz, Blanca Veras e Cristina Sanchez-Porro pelas trocas de conhecimentos que foram essenciais para que eu pudesse chegar até aqui;

A todos os alunos do Laboratório de Microrganismos de Referência, Mariana Sobral, Marcella Reis, Nicole Félix, Ana Carolina Oliveira, Debora Ribeiro, Irene Lima e Pedro Vianna por fazerem todos os meus dias mais agradáveis e felizes;

A Ivano de Filippis pelos seus ensinamentos e pela ajuda em sanar minhas dúvidas no desenvolvimento desta tese e pela disponibilidade de tempo, mesmo quando estava sentado em frente a inúmeros problemas;

Ao Rodolpho Albano pelos conhecimentos compartilhados, por todas as dúvidas resolvidas, pelo auxílio nos experimentos e por toda contribuição na compreensão dos resultados.

A Eugênio de Almeida, atual diretor do INCQS, pelos inesquecíveis momentos de alegria;

À Célia Romão por ter realizado a revisão desta tese e pela sua grande ajuda;

Ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária e ao Departamento de Microbiologia que possibilitaram a realização deste estudo;

À CAPES pela concessão da bolsa e pela oportunidade do Doutorado Sanduiche no Exterior, que colaboraram para meu crescimento pessoal e profissional;

À FAPERJ pelo incentivo ao meu destacado desempenho acadêmico mediante a concessão da Bolsa Nota 10;

Por fim, agradeço a todos que iniciaram essa jornada ao meu lado, contribuindo direta ou indiretamente com o desenvolvimento desta tese, e com o passar do tempo nossos caminhos se afastaram.

*Para que a luz brilhe tão intensamente, a
escuridão tem de estar presente.*

Francis Bacon (1561 -1626)

(Político, filósofo, cientista, considerado como fundador da ciência moderna)

RESUMO

O ecossistema aquático é um dos mais ameaçados pela poluição e, conseqüentemente, sua qualidade vem sendo mais afetada do que os ecossistemas terrestres. Apesar de ser geralmente reconhecida a importância da manutenção da qualidade da água, na prática, ocorrem inúmeras descargas de efluentes potencialmente poluidores. Antimicrobianos em sistemas aquáticos são frequentemente degradados rapidamente por meio de vias fotolíticas e outros. Há um debate sobre sua ação, exclusiva, na seleção da resistência e a possibilidade da participação de outros fatores na manutenção e disseminação da mesma. Os metais traço representam uma pressão seletiva de longa data, generalizada e recalcitrante com importância tanto ambiental como clínica que, por seleção indireta, contribui para a manutenção e disseminação de fatores de resistência aos antimicrobianos. O objetivo deste estudo foi avaliar as possíveis alterações na diversidade microbiana, na composição do resistoma microbiano móvel e nos mecanismos de co-seleção, frente à presença de metais traço e antimicrobianos em recursos hídricos destinados ao tratamento e abastecimento público no Rio de Janeiro. Para isso, foram coletadas amostras de água de duas bacias destinadas ao abastecimento (Guandu e São João) e de água potável. A detecção de antimicrobianos, realizada pela Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial, azitromicina, claritromicina e sulfametoxazol foram revelados tanto na água não tratada quanto na água potável. Altas concentrações de urânio foram detectadas em todas as amostras da bacia São João utilizando Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado. Os coliformes totais e *Escherichia coli* foram enumerados de acordo com o método de substrato definido e as concentrações variaram de 228 a >24,196 NPM/100mL e 4,1 a >24,196 NPM/100mL, respectivamente. As contaminações fecais foram determinadas e quantificadas usando marcadores genéticos hospedeiro-específicos do gene *rrs* do 16S rRNA bacteriano associado a suínos, gene *nifH* associado a humanos (*Methanobrevibacter smithii*) e bovinos (*Meth. ruminantium*) e *mcrA* (*Meth. gottschalkii*) associado a equinos. O marcador humano ocorreu em todas as amostras de água não tratada (20/20), enquanto o gene *nifH*, associado a bovinos foi encontrado em 90% (18/20) das amostras. Os marcadores específicos de

equinos e suínos estiveram presentes em 80% (16/20) nas bacias. Nenhum marcador de contaminação fecal hospedeiro-específico foi encontrado nas amostras de água potável. A diversidade bacteriana foi analisada pelo sequenciamento de nova geração da região V4 do *rrs* do 16S rRNA e o resistoma microbiano através do sequenciamento do plasmidoma por shotgun. As sequências foram analisadas pelos programas MG-RAST e CARD. Os três ambientes analisados apresentaram maior abundância de *Proteobacteria* em 93,5% (29/31) das amostras, sendo a maioria das sequências pertencentes à classe Gammaproteobacteria. Além disso, foram observados nove filos arqueanos, com predominância de *Euryarchaeota* e *Thaumarchaeota* em 55% (17/31) e 45% (14/31) das amostras, respectivamente. A composição do plasmidoma revelou 295 diferentes genes de resistência aos antimicrobianos na bacia do Guandu, 103 no São João e 197 na água potável. Noventa e dois isolados de *Pseudomonas* spp., 71 *Serratia* spp., 51 *Acinetobacter* spp. e 51 *Klebsiella* spp. foram avaliados quanto à susceptibilidade aos metais traço. O perfil *Extensively Metal-tolerant* foi prevalente em *Serratia* spp. (71% 5/7) e *Klebsiella* spp. (59% 13/22), isolados da bacia do Guandu. O perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos desses isolados foi avaliado pelo método de difusão de discos. O perfil *Extensively drug-resistant* (XDR) foi observado apenas em isolados de *Acinetobacter* spp. (10%, 5/51) e *Pseudomonas* spp. (8%, 7/92), já o perfil *Pandrug-resistant* apenas em *Pseudomonas* spp. (3%, 3/92). O perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados considerados sensíveis a todos os antimicrobianos foi novamente avaliado na presença de cobre e zinco. Sete por cento (1/14) das *Pseudomonas* spp., 13% (6/47) de *Serratia* spp. e 24% (4/17) de *Klebsiella* spp. apresentaram o perfil XDR na presença desses metais. Para avaliar a alteração da atividade de efluxo dos isolados frente a esses metais, foi utilizado o brometo de etídio como substrato indefinido para bombas de efluxo. Na presença de zinco, 33% (3/9) dos isolados de *Pseudomonas* spp., 87% (26/30) de *Serratia* spp., 65% (11/17) de *Klebsiella* spp. e 33% (1/3) *Acinetobacter* spp. apresentaram aumento na atividade de efluxo. Enquanto isso, 89% (8/9) de *Pseudomonas* spp., 90% (27/30) de *Serratia* spp., 100% (17/17) de *Klebsiella* spp. e 33% (1/3) *Acinetobacter* spp. apresentaram aumento na atividade de efluxo na presença de cobre. Nossos resultados revelaram altos níveis de poluição, nas águas destinadas ao abastecimento público no Rio de Janeiro, o que compromete a qualidade dessas

águas. Embora o tratamento das águas tenha sido considerado satisfatório, microrganismos multidroga resistentes e genes de resistência aos antimicrobianos e metais foram encontrados na água potável. Esses dados poderão contribuir para incentivar discussões a respeito do aprimoramento de políticas ambientais mais eficazes, em relação ao saneamento básico e o monitoramento da qualidade dessas águas.

Palavras-chave: Água. Metais Traço. Resíduos Antimicrobianos. Diversidade Bacteriana. Resistoma. Co-seleção. Resistência Cruzada.

ABSTRACT

The aquatic ecosystem is one of the most threatened by pollution and, consequently, its quality has been affected more than terrestrial ecosystems. Although the importance of maintaining water quality is generally recognized, in practice there are numerous discharges of potentially polluting effluents. Antimicrobials in aquatic systems are often rapidly degraded by photolytic and other pathways. There is a question about its exclusive action in the selection of resistance and the possibility of participation of other factors in the maintenance of this dissemination. Trace metals represent a long-standing, generalized and recalcitrant selective pressure with environmental and clinical importance that, through indirect selection, contributes to the maintenance and dissemination of antimicrobial resistance factors. The objective of this study was to evaluate the possible alterations in microbial diversity, microbial mobile resistance and co-selection mechanisms, against the presence of trace metals and antimicrobials in water resources destined for treatment and public supply in Rio de Janeiro. For this, water samples were collected from two watersheds for treatment (Guandu and São João) and drinking water. Antimicrobial detection, performed by High Efficiency Liquid Chromatography coupled to Sequential Mass Spectrometry, showed residues of azithromycin, clarithromycin and sulfamethoxazole have been reported in both untreated water and drinking water. High concentrations of uranium were detected in all samples from the São João watershed using Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry. Total coliforms and *Escherichia coli* were enumerated according to the defined substrate method and concentrations varied from 228 to >24, 196 MPN/100 mL and 4.1 to >24.196 MPN/100 mL, respectively. Drinking water samples showed no indicators. Fecal contaminations were determined and quantified using host-specific genetic marker as *16S rRNA* gene associated with swine, *nifH* gene human- (*Methanobrevibacter smithii*) and bovine-associated (*Meth. ruminantium*) and *mcrA* (*Meth. gottschalkii*) associated gene to equine. The human marker occurred in all untreated water samples (20/20), while the *nifH* gene, associated with cattle, was found in 90% (18/20) of the samples. Specific equine and swine markers were present in 80% (16/20) of watersheds. No marker of host-specific fecal contamination was found in drinking water samples. Bacterial diversity was analyzed by the new generation

sequencing of V4 region of the 16S *rRNA* gene and the microbial resistome through the shotgun plasmid sequencing. The sequences were analyzed by the MG-RAST and CARD databases. The three environments analyzed showed greater abundance of *Proteobacteria* in 93.5% (29/31) of samples, being the majority of the sequences belonging to *Gammaproteobacteria* class. In addition, nine Archaeal phylum were observed, being *Euryarchaeota* and *Thaumarchaeota* predominating in 55% (17/31) and 45% (14/31) of samples, respectively. The composition of the plasmidome revealed 295 different antimicrobial resistance genes in the Guandu watershed, 103 in São João watershed and 197 in drinking water. The Extensively metal-tolerant profile was prevalent in *Serratia* spp. (71% 5/7) and *Klebsiella* spp. (59% 13/22), isolated from the Guandu watershed. The antimicrobial susceptibility profile of these isolates was evaluated by the disc diffusion method. The Extensively Drug-resistant (XDR) profile was observed only in *Acinetobacter* spp. (10%, 5/51) and *Pseudomonas* spp. (8%, 7/92), and the Pandrug-resistant profile only in *Pseudomonas* spp. (3%, 3/92). The antimicrobial susceptibility profile of the isolates considered sensitive to all antimicrobials was again evaluated in the presence of copper and zinc. Seven percent (1/14) of *Pseudomonas* spp., 13% (6/47) of *Serratia* spp. and 24% (4/17) of *Klebsiella* spp. presented the XDR profile in the presence of these metals. To evaluate the change in the efflux activity of the isolates against these metals, ethidium bromide was used as an undefined subset for efflux pumps. In the presence of zinc, 33% (3/9) of *Pseudomonas* spp., 87% (26/30) of *Serratia* spp., 65% (11/17) of *Klebsiella* spp. and 33% (1/3) *Acinetobacter* spp. showed an increase in efflux activity. Meanwhile, 89% (8/9) of *Pseudomonas* spp., 90% (27/30) of *Serratia* spp., 100% (17/17) of *Klebsiella* spp. and 33% (1/3) of *Acinetobacter* spp. showed an increase in efflux activity in the presence of copper. Our results revealed high levels of pollution in the waters destined for the treatment and public supply in Rio de Janeiro, which compromises the quality of these waters. Although water treatment was considered satisfactory, multi-drug resistant microorganisms, resistance genes to antimicrobials and metals were found in drinking water. Brazil lacks research in this area, not having, among others, surveys on the occurrence of trace metal and antimicrobial residues and their possible impacts on diversity and microbial resistance in the aquatic environment, and also no studies on the dynamics of these compounds in that waters. These data may contribute to encourage

discussions on improving the most effective environmental policies in relation to basic sanitation and the monitoring of water quality.

Keywords: Water. Heavy Metal. Antimicrobial. Microbial Diversity. Resistome. Co-selection. Cross-resistance.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Representação das Bacias do Guandu e do São João.....	38
Figura 2 Pontos de coleta da Bacia do Guandu.....	47
Figura 3 Pontos de coleta da Bacia do São João.....	47
Figura 4 Parâmetros abióticos dos pontos de coleta de amostras de água não tratada e potável.....	62
Figura 5 Frequência de detecção e níveis de concentração de coliformes totais e <i>E. coli</i> em amostras de água não tratada e potável.....	63
Figura 6 Frequência de detecção e níveis de concentração de antimicrobianos em amostras de água não tratada e potável.....	66
Figura 7 Teor de alumínio, urânio e ferro nas amostras de água não tratada e potável.....	69
Figura 8 Quantificação de contaminação fecal hospedeiro-específico, através de qPCR nas amostras de água não tratada e fezes dos hospedeiros-alvo.....	71
Figura 9 Abundância relativa da composição bacteriana no nível de filo nas amostras de água não tratada e potável.....	73
Figura 10 Abundância relativa da composição arqueana no nível de filo nas amostras de águas analisadas.....	74
Figura 11 Comparação da <i>alpha</i> diversidade de <i>Operational taxonomic unit</i> (OTUs) entre as coletas de amostras de água não tratada. Análise de cobertura de <i>Chao1</i>	76
Figura 12 Dendrograma de similaridade das comunidades bacterianas nas amostras de água analisadas. Agrupamento realizado utilizando a matriz de distância <i>Jensen-Shannon Divergence</i> , <i>strains/OTU-levels</i> e algoritmo de clusterização <i>Ward</i> . Os grupos de amostras foram indicados por cores diferentes.....	78
Figura 13 Dendrograma de similaridade das comunidades arqueanas nas amostras de água analisadas. Agrupamento realizado utilizando a matriz de distância <i>Jensen-Shannon Divergence</i> , <i>strains/OTU-levels</i> e algoritmo de clusterização <i>Ward</i> . Os grupos de amostras foram por cores diferentes.....	79
Figura 14 Comparação da <i>alpha</i> diversidade de OTUs bacterianas e arqueanas entre as amostras de água analisadas. Análise de cobertura de <i>Simpson</i> . Mediana (linha contínua) e amostras (círculos).81	
Figura 15 Análise de coordenadas principais (PCoA) entre comunidades bacterianas e arqueanas presentes na bacia do Guandu (verde), na bacia do São João (azuis) e na água potável (vermelho).83	
Figura 16 Abundância relativa da composição bacteriana no nível de classe nas amostras de água não tratada e potável.....	84
Figura 17 Abundância relativa da composição arqueana a nível de classe nas amostras de água não tratada e potável.....	85
Figura 18 Abundância relativa das sequências relacionadas aos subsistemas de resistência aos antimicrobianos e compostos tóxicos nas amostras de água não tratada e potável.....	87
Figura 19 Abundância absoluta de ARGs em relação aos mecanismos de resistência, nos três grupos de amostras.....	88

Figura 20 Abundância relativa de ARGs em relação aos mecanismos de resistência, nos três grupos de amostras.	89
Figura 21 Abundância relativa de ARGs em relação as classes de antimicrobianos, nos três grupos de amostras.	90
Figura 22 Número de isolados em relação ao metal e local de coleta de água.	92
Figura 23 Gêneros bacterianos identificados em águas em relação aos metais utilizados no isolamento.	93
Figura 24 Perfil de susceptibilidade aos metais traço dos isolados em relação ao metal utilizado no isolamento.	95
Figura 25 Perfil de tolerância dos gêneros bacterianos isolados frente aos metais traço em relação ao local de isolamento.	96
Figura 26 Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados de <i>Pseudomonas</i> spp. recuperados de água destinadas ao tratamento e potável.	97
Figura 27 Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados de <i>Acinetobacter</i> spp. recuperados de água destinadas ao tratamento.	98
Figura 28 Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados de <i>Serratia</i> spp. recuperados de água destinadas ao tratamento.	99
Figura 29 Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados de <i>Klebsiella</i> spp. recuperados de água destinadas ao tratamento.	100
Figura 30 Classificação dos perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos em relação aos gêneros avaliados.	101
Figura 31 Classificação dos perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos em relação aos locais de isolamento.	102
Figura 32 Associação entre os perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos e o metal traço utilizado no isolamento.	103
Figura 33 Associação entre os perfis de susceptibilidade aos metais traço e antimicrobianos.	104
Figura 34 Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados de <i>Pseudomonas</i> spp. recuperados de água não tratada na presença de zinco e cobre.	105
Figura 35 Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados de <i>Serratia</i> spp. recuperados de água não tratada na presença de zinco e cobre.	107
Figura 36 Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados de <i>Klebsiella</i> spp. recuperados de água não tratada na presença de zinco e cobre.	109
Figura 37 Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados de <i>Acinetobacter</i> spp. recuperados de água não tratada na presença de zinco e cobre.	111
Figura 38 Classificação dos perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos em relação à concentração de metal traço utilizada.	113
Figura 39 Caracterização da atividade de efluxo na ausência e presença de zinco e cobre.	115
Figura 40 Dendrograma representativo de similaridade do perfil de banda das 14 linhagens de <i>Pseudomonas</i> spp. sensíveis a todos os antimicrobianos.	116

Figura 41 Dendrograma representativo de similaridade dos perfis de bandas dos isolados de <i>Serratia</i> spp.	117
Figura 42 Dendrograma representativo de similaridade dos perfis de bandas dos isolados de <i>Acinetobacter</i> spp.	118
Figura 43 Dendrograma representativo de similaridade dos perfis de bandas dos isolados de <i>Klebsiella</i> spp.	118
Figura 44 Dendrograma de similaridade completo do perfil de bandas das linhagens de <i>Pseudomonas</i> spp.	167
Figura 45 Dendrograma de similaridade completo do perfil de bandas das linhagens de <i>Serratia</i> spp.	169
Figura 46 Dendrograma de similaridade completo do perfil de bandas das linhagens de <i>Acinetobacter</i> spp.	170
Figura 47 Dendrograma de similaridade completo do perfil de bandas das linhagens de <i>Klebsiella</i> spp.	171

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Potencial tóxico dos metais traço ao organismo humano.....	28
Tabela 2 - Principais mecanismos de ação e de resistência aos antimicrobianos.	31
Tabela 3 - Mecanismo de resistências comuns aos antimicrobianos e metais traço em microrganismos	33
Tabela 4 - Antimicrobianos pesquisados nas amostras de água não tratada e potável.....	49
Tabela 5 - Oligonucleotídeos utilizados na qPCR.....	53
Tabela 6 - Microrganismos de referência tolerantes a metais traço.	56
Tabela 7 - Teor de metais nas amostras de água não tratada e potável.....	67

LISTAS DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Ag	Prata
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ARBs	Antibiotic Resistant Bacteria
ARGs	Antibiotic Resistance Genes
As	Arsênio
Au	Ouro
BacMet	Antibacterial Biocide and Metal Resistance Genes Database
CARD	Comprehensive Antibiotic Resistance Database
CARVS	Coleção de Arqueas de Referência em Vigilância Sanitária
CBRVS	Coleção de Bactérias de Referência em Vigilância Sanitária
Cd	Cádmio
Co	Cobalto
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
COSIGUA	Companhia Siderúrgica da Guanabara
Cr	Cromo
Cu	Cobre
CVE	Centro de Vigilância Epidemiológica
DANMAP	Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme
DNA	ácido desoxirribonucleico
ERIC-PCR	Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus - Polymerase Chain Reaction
EtBr	Brometo de Etídio
Fe	Ferro
Hg	Mercúrio
HGT	Horizontal Genes Transfer
ICP-OES	Espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado
IPC	Internal Positive Control
L	Litro
LC-MS/MS Sequencial	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Espectrometria de Massas
m ³	metros cúbicos
MC _{EtBr}	Minimum Concentration of EtBr
MDR	Multidrug-resistant
mg	miligrama
MG-RAST	Meta Genome - Rapid Annotation using Subsystem Technology
MGE	Mobile Genetic Elements
mL	mililitro
mM	milimolar

MMT	Multimetal-tolerant
Mn	Manganês
MST	Microbial Source Traking
ng	nanograma
Ni	Níquel
NMP	número mais provável
n°	Número
non-MDR	non Multidrug-resistant
non-MMT	non Multimetal-tolerant
OMS	Organização mundial da saúde
Pb	Chumbo
PBS	solução salina tamponada com fosfato
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDR	Pandrug-resistant
PMT	Panmetal-tolerant
qPCR	quantitative Polymerase Chain Reaction
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
s	segundos
Sb	Antimônio
Se	Selênio
Tm	temperatura de melting
MRGs	Metal Resistance Genes
ug	micrograma
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average
V	Vanádio
VSA	Vigilância Sanitária Ambiental
XDR	Extensively drug-resistant
XMT	Extensively Metal-tolerant
Zn	Zinco
µm	micrometro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Água	21
1.2 Poluição hídrica	23
1.2.1 Detritos fecais	24
1.2.2 Metais traço	25
1.2.3 Antimicrobianos	28
1.3 Co-seleção de resistência aos antimicrobianos e metais traço	32
1.4 Resistoma e plasmidoma microbiano	35
1.5 Locais do estudo	38
2 RELEVÂNCIA PARA A VIGILÂNCIA SANITÁRIA	42
3 OBJETIVO	45
4 METODOLOGIA	46
4.1 Coleta das amostras	46
4.2 Detecção de antimicrobianos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Espectrometria de Massas Sequencial (LC-MS/MS)	48
4.3 Determinação dos níveis de metais traço por Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES)	50
4.4 Caracterização do metagenoma dos ambientes selecionados	50
4.4.1 Processamento das amostras para extração de DNA genômico e plasmidial. 50	
4.4.2 Diversidade microbiana	51
4.4.3 Plasmidoma	52
4.5 Detecção e quantificação de contaminação fecal pela qPCR	53
4.6 Processamento das amostras para isolamento bacteriano	55
4.7 Identificação dos isolados tolerantes a metais traço	56
4.8 Determinação do perfil de susceptibilidade aos metais traço	57
4.9 Determinação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos	58
4.10 Avaliação dos efeitos da presença de metais traço no perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos	59
4.11 Avaliação da atividade de efluxo induzida pelos metais traço	59
4.12 Caracterização de agrupamentos genéticos dos isolados	60
5 RESULTADOS	61

5.1 Dosagem de parâmetros abióticos e microbiológicos	61
5.2 Detecção de antimicrobianos nas amostras de água.....	63
5.3 Determinação dos níveis de metais traço nas amostras de água	67
5.4 Detecção e quantificação de contaminação fecal pela qPCR.....	70
5.5 Caracterização do metagenoma dos ambientes selecionados	72
5.5.1 Diversidade microbiana	72
5.5.2 Plasmidoma.....	85
5.6 Isolamento e identificação de microrganismos tolerantes a metais traço ..	91
5.7 Determinação do perfil de susceptibilidade aos metais traço.....	94
5.8 Determinação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos	96
5.9 Associação entre os perfis de tolerância aos metais traço e resistência aos antimicrobianos.....	102
5.10 Avaliação do impacto dos metais traço no perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos.....	104
5.11 determinação da atividade de efluxo induzida pelos metais traço	114
5.12 agrupamentos genéticos dos isolados	116
6 DISCUSSÃO	119
7 CONCLUSÕES	135
REFERÊNCIAS.....	136
APÊNDICE A - LISTA DE GENES DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS ANOTADOS UTILIZANDO O BANCO DE DADOS CARD.....	157
APÊNDICE B - DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE DO PERFIL DE BANDAS DAS LINHAGENS BACTERIANAS.....	167
APÊNDICE C - ARTIGO PUBLICADO EM AUTORIA PRINCIPAL.....	172
APÊNDICE D - ARTIGOS PUBLICADOS EM CO-AUTORIA.....	175

1 INTRODUÇÃO

1.1 Água

Cerca de 70% do planeta Terra é coberto por água, desta, 97% é salgada e encontra-se nos oceanos e 3% doce. Aproximadamente 2,25% está localizada nas calotas polares e nas geleiras, enquanto apenas 0,75% é encontrada na forma de água subterrânea, em lagos, rios e também na atmosfera, como vapor d'água (INSTITUTO TRATA BRASIL, 2015). Desta forma, a água é um recurso natural que deve ser gerido de maneira adequada para não causar impactos na biodiversidade, no meio ambiente e na saúde da população. Utilizada para o consumo humano e para as atividades socioeconômicas, é retirada de rios, lagos, represas e aquíferos, tendo influência direta sobre a saúde, a qualidade de vida e o desenvolvimento das populações. Atualmente, a agricultura é o setor que mais usa água no mundo, utilizando até 70% da água doce disponível (ANSTEAD; BOAR, 2010; CHEN *et al.*, 2018a).

A distribuição de água no mundo não ocorre de maneira igualitária, o continente americano possui a maior parcela (39,6%) seguido da Ásia (31,8%), Europa (15%), África (9,7%) e Oceania (3,9%). Embora, Brasil, Rússia, China, Canadá, Indonésia, EUA, Índia, Colômbia e a República Democrática do Congo concentrem mais de 60% da água disponível no planeta (AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS, 2017). O Brasil possui a maior disponibilidade hídrica do mundo, 12%, tendo em território nacional a produção hídrica de $182.170 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$. Porém, a sua distribuição ocorre de forma irregular entre as regiões: no Norte estão concentrados aproximadamente 70% da água disponível para uso, onde habita apenas 7% da população nacional; enquanto os 30% restantes distribuem-se desigualmente pelo país, para atender a 82,5% da população. Oitenta e três por cento da população brasileira tem acesso ao sistema de abastecimento de água potável, por outro lado, 49% não possui rede de esgoto, além disso, apenas 43% do que é coletado é tratado (AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS, 2017).

O Estado do Rio de Janeiro é responsável pela produção de 9,4% do esgoto gerado em todo o Brasil. Setenta e três por cento de todo o esgoto produzido é coletado, entretanto, somente 42% é tratado. A Região dos Lagos, no Estado do Rio

de Janeiro, foi a região que mais avançou até agora no setor de saneamento, tendo sido alcançado os índices de 96,5% da população abastecida com água potável e 77% de esgoto coletado e tratado (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2015).

O ecossistema aquático é um dos mais ameaçados e, conseqüentemente, sua qualidade é mais afetada do que os ecossistemas terrestres (BAKER-AUSTIN *et al.*, 2006). Apesar de ser geralmente reconhecida a importância da manutenção da qualidade da água, na prática, ocorrem inúmeras descargas (industriais, urbanas, doméstica e hospitalares) de efluentes potencialmente poluidores de cursos de água. Com isso, a ocupação humana nas bacias hidrográficas, de forma cada vez mais desordenada, tem promovido uma deterioração da qualidade das águas naturais, com riscos de propagação de doenças de veiculação hídrica. O controle da qualidade da água destinada ao consumo humano requer o desenvolvimento de planos de gestão que, quando implementados, forneçam base para a proteção de todo o sistema, ou seja, desde a captação até o consumidor, garantindo assim que o número de patógenos e as concentrações de substâncias químicas não representem risco à saúde pública (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2015; GORCHEV; OZOLINS, 2011). Desta forma, a Resolução nº 357/2005, e a portaria de consolidação nº 05/2017 estabelecem diretrizes para a avaliação química, física e microbiológica de águas superficiais e potáveis (CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE, 2005; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017)

Considerando a recente crise hídrica enfrentada pelos sistemas de abastecimento de água em algumas regiões do Brasil em 2015, o momento é propício para valorização e conscientização deste bem comum. Vale ressaltar o caso do Sistema Cantareira onde mais de 14 milhões de pessoas da região metropolitana de São Paulo e de municípios do interior dependem deste sistema de abastecimento de água. Desde meados de 2015, o nível baixo do reservatório fez com que o sistema precisasse recorrer ao chamado volume morto, reserva abaixo do nível baixo da captação da represa. No Rio de Janeiro o nível do reservatório de Paraibuna, principal sistema que abastece o Estado, alcançou o volume morto em janeiro de 2015 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2015).

1.2 Poluição hídrica

A água pode ter sua qualidade afetada pelas mais diversas atividades do homem, sejam elas domésticas, comerciais ou industriais. Cada uma dessas atividades gera poluentes característicos que têm uma determinada implicação na qualidade do ambiente aquático. A alteração da qualidade dos ecossistemas aquáticos além de gerar a degradação ambiental, diminui consideravelmente a disponibilidade de água de boa qualidade.

A poluição aquática pode ser caracterizada como biológica, física e química, entretanto, a adição de apenas um tipo de poluente pode alterar outras características da água. A poluição biológica está associada à presença de algas tóxicas e microrganismos (bactérias, vírus e protozoários), que podem constituir uma ameaça à saúde. A química está relacionada à presença de substâncias químicas em concentrações tóxicas, que podem ser nocivas à saúde. Enquanto isso, a poluição física está associada às características estéticas da água, tais como cor, turbidez, gosto e odor (BRAGA *et al.*, 2005; SUGAWARA; NIKAIDO, 2014).

Os problemas que mais afetam a qualidade de ecossistemas aquáticos e, conseqüentemente, a saúde pública estão associados, principalmente, a efluentes inadequadamente tratados ou não tratados. A poluição hídrica pode ocorrer pela falta de saneamento básico e/ou pela descarga de rejeitos industriais sem tratamento por fontes pontuais ou difusas (LIU; LU, 2014; YAO *et al.*, 2015). A poluição pontual ocorre de maneira concentrada no corpo hídrico, por exemplo a descarga de esgoto doméstico e industrial em um manancial. Na poluição difusa, porém, os poluentes adentram o corpo de água de maneira dispersa, o que a torna mais difícil de ser contida (NAYLOR; BALL, 2005; VERÍSSIMO; FERREIRA, 2013).

A presença de poluentes nos ambientes aquáticos pode alterar a estrutura genética de organismos, provocando mutações e alterações no padrão de expressão de genes implicados com o desenvolvimento da espécie, comprometendo o desenvolvimento normal dos organismos, o que pode levar a variações na espécie e até mesmo a sua extinção (LOO; CLARKE, 1995).

1.2.1 Detritos fecais

A poluição biológica é causada geralmente por detritos orgânicos, como restos de alimentos, detergentes ou material fecal, lançados geralmente por esgotos domésticos e indústrias (GORCHEV; OZOLINS, 2011).

Problemas com a poluição fecal são comuns a todas as nações, independentemente de situação econômica, embora o nível de poluição e o tipo variem entre os países (FENG et al., 2010). Estimativas globais sugerem que o contato com água contaminada com material fecal e consumo de moluscos colhidos a partir destas águas vêm resultando em cerca de 175 milhões de casos de doenças infecciosas a cada ano (SHUVAL, 2003). Essa situação tem se agravado nos últimos anos devido à contaminação frequente das águas destinadas ao consumo humano, a recreação e a irrigação, por patógenos emergentes como *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp., *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC), entre outros (GORCHEV; OZOLINS, 2011). Compreender a origem da poluição fecal é essencial para a avaliação, mais precisa, de riscos à saúde humana e de medidas de remediação, uma vez que, contaminações de diferentes origens oferecem níveis de risco distintos.

O monitoramento microbiológico da água é atualmente realizado por bioindicadores como coliformes totais, *E. coli* e *Enterococcus* spp. amplamente utilizados em programas de controle de qualidade de água (CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE, 2000, 2005). Os coliformes são considerados indicadores primários da contaminação fecal em águas, entretanto esse método representa uma análise generalizada, incapaz de correlacionar a contaminação a um organismo fonte. Fator que pode ser atribuído, pelo menos em parte, ao fato de que os coliformes são eliminados nas fezes de todos os animais homeotérmicos (HARWOOD et al., 1999; LECLERC et al., 2001). Outra limitação desses indicadores é a sua utilização em ambientes tropicais, onde esses microrganismos podem sobreviver em sedimentos. Assim, sua presença na coluna de água pode não estar associada à contaminação fecal recente. Por esses motivos, há a necessidade de selecionar marcadores de poluição fecal, precisos e específicos, na detecção de contaminação fecal humana e animal recente (BLATCHLEY et al., 2007).

Além disso, estudos epidemiológicos não conseguiram associar os níveis de coliformes e os riscos à saúde, particularmente pela ausência da identificação da origem da contaminação (BOEHM *et al.*, 2009). Compreender a origem da poluição fecal é essencial para a avaliação precisa dos riscos para a saúde humana, com a contaminação de fontes diferentes os níveis de risco também são diferentes.

Assim, o rastreamento de fonte microbiana (*Microbial Source Tracking* - MST) surgiu no final do século XX como uma ferramenta para determinar as fontes dominantes de contaminação fecal em águas (HARWOOD *et al.*, 2009). Essa abordagem baseia-se em moléculas de assinatura (biomarcadores), tais como as sequências de DNA de microrganismos associadas a diferentes espécies animais, permitindo a distinção entre as fontes de contaminações fecais (FIELD; SAMADPOUR, 2007; MIESZKIN *et al.*, 2009). Microrganismos anaeróbicos são apontados como bioindicadores alternativos ao grupo coliforme, devido à sua taxa de sobrevivência curta no ambiente em consequência de sua baixa tolerância ao oxigênio, à correlação com hospedeiros específicos e, além disso, constituem a maior parte da microbiota de fezes humanas e animais (BOEHM *et al.*, 2009; OKABE *et al.*, 2007).

Inicialmente, a ordem dos *Bacteroidales* foi proposta como um biomarcador fecal hospedeiro-específico, pois são abundantes nas fezes de muitos animais de sangue quente, incluindo humanos, e não sobrevivem por muito tempo no ambiente (FREMAUX *et al.*, 2009). Outros bons candidatos são representantes de arqueas do gênero *Methanobrevibacter* que inclui 16 espécies conhecidas. Esses microrganismos habitam o trato intestinal de animais, plantas em decomposição e lodo anaeróbico de estações de tratamento de efluentes. Como apenas algumas espécies ocorrem em mais de um hospedeiro, elas podem ser vistas como indicadores microbianos específicos de poluição fecal em amostras ambientais (OLIVEIRA *et al.*, 2016). Dentro deste contexto, uma variedade de outros biomarcadores também tem sido proposta para discriminar os eventos de poluição fecal em águas ambientais (FREMAUX *et al.*, 2009).

1.2.2 Metais traço

Substâncias tóxicas provenientes do despejo de efluentes industriais, como minerais, sulfatos, fosfatos e metais traço, são considerados poluentes pseudo-persistente, devido à sua introdução contínua no ambiente e caracterizam a poluição química. Este tipo de poluição representa uma ameaça significativa para os ecossistemas aquáticos. Estudos indicam que, ao longo do século passado, aproximadamente 30% das extinções de espécies de peixes têm sido resultado de contaminação química (RICCIARDI *et al.*, 2009). No entanto, diversas substâncias nocivas são continuamente lançadas no meio ambiente, sem que se conheça de forma satisfatória o perigo que representam à saúde da população e do meio ambiente (BERGAMASCO *et al.*, 2011).

Os metais traço podem ocorrer naturalmente nos ambientes aquáticos independentemente de atividades humanas, geralmente sem quaisquer efeitos prejudiciais (JASMINE; VENKADESAN; RAGUL, 2012). Entretanto, o acelerado crescimento industrial e agrícola, a utilização de agrotóxicos, muitas vezes sem critério e o lançamento de resíduos doméstico e industrial, sem tratamento adequado, nos corpos hídricos, vêm provocando o aumento dos níveis destes elementos no ambiente, colocando em risco a saúde humana (WORLD HEALTH ORGANISATION, 2007). Atividades industriais, tipicamente, resultam na deposição de elevados níveis de chumbo (Pb), cádmio (Cd), mercúrio (Hg) e zinco (Zn) em rios e lagos, vindo a atingir os organismos aquáticos, razão porque estudos ligados à qualidade dos ambientes aquáticos devem levar em conta não apenas a qualidade da água, mas igualmente a vegetação, os organismos aquáticos, os sedimentos suspensos e de fundo (JACKSON, 1991; MOURA, 2002).

No Brasil, a exploração mineral é de extrema importância sendo um dos setores básicos da economia que contribui para o desenvolvimento da sociedade, já que os minérios explorados estão em quase todos os produtos utilizados pelo homem. O crescente desenvolvimento tecnológico e industrial do país aumenta a demanda pelos metais, cuja extração só é possível através da escavação de rochas e de solos, gerando, em consequência, a liberação de rejeitos industriais metálicos de arsênio (As), cromo (Cr), Cd, cobre (Cu), ferro (Fe), Hg, Pb, Zn dentre outros (COSTA *et al.*, 2014).

A presença de metais traço na atmosfera, solo e água pode causar sérios problemas a todos os organismos considerando que, a biodisponibilidade destes

poluentes pode resultar em bioacumulação (WASEEM *et al.*, 2014). A água é o ambiente que mais gera preocupações ao ser contaminado por metais traço, principalmente, devido à solubilização destes poluentes promovendo a biodisponibilidade, e conseqüentemente, a bioacumulação ao longo da cadeia alimentar, o que potencializa o seu efeito nocivo.

Alguns metais traço são considerados essenciais do ponto de vista biológico, entretanto, mesmo os essenciais, quando presentes em altas concentrações no ambiente, podem causar impactos negativos aos ecossistemas terrestres e à saúde humana, constituindo assim, um problema ambiental e de saúde pública. Metais traço como prata (Ag), As, ouro (Au), Cd, Hg, Pb, antimônio (Sb) e U não têm papéis biológicos significativos e são considerados tóxicos para quase todos os organismos, substituindo metais essenciais de seus locais de ligação naturais ou interagindo com outros ligandos específicos. Enquanto isso, Fe, molibdênio (Mo), manganês (Mn) e selênio (Se) são considerados fundamentais para reações bioquímicas celulares. Já o Zn, níquel (Ni), Cu, vanádio (V), cobalto (Co), tungstênio (W) e Cr também são importantes, porém são tóxicos em altas concentrações (NIES, 1999; VOICA *et al.*, 2016).

Sendo assim, todos os metais e seus compostos possuem toxicidade, ou seja, a capacidade inerente que um elemento químico tem para causar danos significativos ao ambiente e à saúde humana. Entretanto esse grau de toxicidade pode variar de acordo com o tempo de exposição e a concentração do composto envolvido (Tabela 1) (MUNIZ; OLIVEIRA-FILHO, 2008; WORLD HEALTH ORGANISATION, 2011).

Tabela 1 - Potencial tóxico dos metais traço ao organismo humano.

Íon	Efeitos no homem*	Níveis aceitáveis**
Al	Náuseas, vômitos, diarreia, úlceras na boca e na pele, erupções cutâneas, dores artríticas, demência e disfunção cognitiva	0,1 mg.L ⁻¹
As	Câncer, intoxicação e morte (130 mg)	0,01 mg.L ⁻¹
Cd	Anemia, retardamento do crescimento, disfunção renal, hipertensão, arteriosclerose, câncer, doenças crônicas e morte (9 gramas)	0,001 mg.L ⁻¹
Co	Doenças pulmonares, bócio, colapso cardíaco e hipotireoidismo	0,05 mg.L ⁻¹
Cr	Alergias, câncer e intoxicação	0,05 mg.L ⁻¹
Cu	Lesões no fígado e Intoxicação.	0,009 mg.L ⁻¹
Hg	Vômitos, dores abdominais, diarreia, osteoporose, lesões cerebrais e renais, alterações psicológicas e psicomotoras e morte (3-30 gramas)	0,0002 mg.L ⁻¹
Ni	Câncer, dermatites, alterações cardíacas e respiratórias e câncer.	0,025 mg.L ⁻¹
Pb	Saturismo, tontura, irritabilidade, dor de cabeça, perda de memória, deficiências musculares, inflamação gastrintestinal, vômitos e diarreias	0,01 mg.L ⁻¹
U	Nefrotoxicidade, câncer	0,02 mg.L ⁻¹
Zn	Alterações respiratórias, gástricas e cardíacas.	0,18 mg.L ⁻¹

Fonte: *International Chemical Safety Cards (ICSCs, 2011); **CONAMA – Resolução nº 357 (2005)

Caso o ecossistema receba níveis de metais mais altos do que aqueles que presidiram sua evolução, ocorrerá pressão seletiva o que poderá promover a eliminação de estirpes ou de espécies sensíveis. Com isso a diversidade de espécies tenderia a diminuir, ocasionando alterações na estrutura da comunidade.

1.2.3 Antimicrobianos

Diversos grupos de substâncias têm sido considerados contaminantes emergentes, incluindo, novos agrotóxicos, fármacos tais como os antimicrobianos, produtos de higiene pessoal, alguns subprodutos provenientes de processos de desinfecção de água, adoçantes como a sucralose, além de nanomateriais, alguns microrganismos e toxinas de algas (RICHARDSON; TERNES, 2014). Estimativas indicam que as principais classes de fármacos que mais causam impactos ao meio ambiente sejam os antimicrobianos e os hormônios (BEHERA *et al.*, 2011).

Os antimicrobianos têm sido amplamente utilizados na medicina humana e animal. No entanto, cerca de 70% a 80% das doses ingeridas são excretadas inalteradas e carregadas para os corpos hídricos, principalmente, através de águas residuais de indústrias farmacêuticas e hospitalares, da eliminação e adubação de fezes (MANTEN, 1971; SARMAH; MEYER; BOXALL, 2006). A contaminação de ecossistemas aquáticos por antimicrobianos tem sido documentada em muitos países, incluindo os da Europa, América do Norte e Ásia Oriental, e vem aumentando em consequência do aumento de atividades antrópicas (DING; HE, 2010; SEGURA *et al.*, 2009a).

Na agricultura, os antimicrobianos são usados como biocidas, na criação de animais pela medicina veterinária, ou como promotores de crescimento em rações animais. Mais de 1 milhão de toneladas destes compostos foram lançadas na biosfera durante os últimos 50 anos, metade desse total são estimados como procedentes de aplicações agrícolas e veterinários (BOXALL; LEEDER, 2006). Além disso, dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) apontam que mais de 50% das prescrições de antimicrobianos no mundo são inadequadas. No Brasil, o consumo de antimicrobianos chega a 40% dos medicamentos comercializados, com mais de 70 milhões de unidades, segundo relatório do Instituto IMS Health (VILMORE, 2010). Com o objetivo de fortalecer a política de uso racional de antimicrobianos e, conseqüentemente, contribuindo para a redução da resistência bacteriana na população a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) implementou a RDC 44/2010, atualizada pela RDC 20/2011, estas novas resoluções determinaram que os antimicrobianos vendidos em farmácias e drogarias do país apenas poderão ser entregues ao consumidor mediante receita de controle especial em duas vias, e somente poderão ser comercializados mediante escrituração obrigatória no Sistema Nacional de Gerenciamento de Produtos Controlados (SNGPC) (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2010, 2011). Vale destacar que, atualmente, no Brasil, de acordo com a Resolução nº 174/2017 da ANVISA consta com uma lista de 129 antimicrobianos registrados (não se aplica aos antimicrobianos de uso exclusivo hospitalar) (ANVISA, 2017).

O destino e o comportamento ambiental destes compostos, assim como de outros xenobióticos, são influenciados por uma variedade de fatores, como as propriedades físico-químicas da molécula, as condições ambientais e de manejo

prevalecentes (KEMPER, 2008). Como exemplos, as sulfonamidas podem ser facilmente transportadas até os cursos d'água devido ao seu baixo potencial de sorção, ao passo que a tilosina é rapidamente degradada pela microbiota do solo (SARMAH; MEYER; BOXALL, 2006).

Os antimicrobianos são apenas parcialmente removidos pelo tratamento de águas residuais e, dependendo do composto, podem ainda ser encontrados em níveis entre 10 e 1000 ng.L⁻¹ em efluentes. Antimicrobianos liberados pelo descarte de efluentes no ambiente são considerados poluentes e mesmo em baixos níveis no meio ambiente são o sinal chave que promove a disseminação de genes e conseqüentemente o aumento da resistência. Muitos antimicrobianos são compostos biodegradáveis naturais, mas os sintéticos, como as quinolonas, são mais resistentes à biodegradação no ambiente. Isso leva a efeitos prolongados nas comunidades bacterianas e um forte impacto sobre o aumento da resistência. Mesmo quando a contaminação por antimicrobianos é eliminada, determinantes de resistência podem ser mantidos e disseminados na população microbiana (GILLINGS *et al.*, 2015; LE-MINH *et al.*, 2010; MARTINEZ, 2009).

Os principais mecanismos de resistência aos antimicrobianos podem envolver a inativação do antimicrobiano através de ação enzimática, mecanismos de efluxo, diminuição de permeabilidade ou alteração dos sítios-alvo (Tabela 2) (FLUIT; VISSER; SCHMITZ, 2001).

Tabela 2 - Principais mecanismos de ação e de resistência aos antimicrobianos.

Classe	Exemplos	Mecanismo de ação	Mecanismo de resistência
β-lactâmicos	Penicilinas	Inibição da síntese de peptidoglicano, através da ação das PBPs	Hidrólise enzimática do anel β-lactâmico (β-lactamases)
	Cefalosporinas		Mutação nas PBPs
	Carbapenêmicos		Alteração da permeabilidade transmembrana Efluxo
Quinolonas e Fluoroquinolonas	Ciprofloxacina	Bloqueio da ação das topoisomerases do tipo II, DNA girase e topoisomerase IV	Mutações nos genes <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> (DNA girase), <i>parC</i> e <i>parE</i> (topoisomerase IV) Alteração da permeabilidade transmembrana Efluxo
Tetraciclínas	Tetraciclina	Inibição da síntese proteica ao nível da subunidade 30S dos ribossomos	Proteção do ribossomo por proteínas citoplasmáticas Alteração da permeabilidade transmembrana Efluxo
Aminoglicosídeos	Gentamicina	Inibição da síntese proteica ao nível da subunidade 30S dos ribossomos	Inativação enzimática Mutação ribossomal Efluxo
Glicopeptídeos	Vancomicina	Inibição da síntese de peptidoglicano	Alteração enzimática dos ribossomos Efluxo
Macrolídeos	Eritromicina	Inibição da síntese proteica ao nível da subunidade 50S dos ribossomos	Mutação ribossomal Efluxo
Sulfonamidas	Sulfametoxazol	Inibição competitiva da dihidrofolato redutase (DHFR), bloqueando a síntese de DNA e RNA	Aumento da produção de DHFR Mutação no gene estrutural da DHFR Efluxo
Lincosamidas	Clindamicina	Atuação ao nível da subunidade 50S dos ribossomos	Mutação ribossomal Alteração da permeabilidade transmembrana Efluxo
Polipeptídeos	Polimixina B e E	Desestabilização da membrana, deslocando competitivamente os íons Ca e Mg ao se ligarem a fosfolípidos e lipopolisacáridos (LPS)	Alterações no LPS Efluxo

Fonte: (VÁZQUEZ-LASLOP; MANKIN, 2018).

A resistência antimicrobiana, particularmente a múltipla resistência, é um problema de saúde pública e a presença de organismos resistentes no ambiente aquático é um problema emergente disseminado em todo o mundo (WATKINSON; MURBY; COSTANZO, 2007). Desta forma, a busca por genes de resistência é uma

importante fonte de conhecimento que permite obter informações sobre a resistência bacteriana que está circulando no meio e então fornecer subsídios para ações preventivas.

1.3 Co-seleção de resistência aos antimicrobianos e metais traço

Os antimicrobianos em sistemas aquáticos são frequentemente degradados rapidamente por meio das vias fotolíticas e outros (CARDOZA *et al.*, 2005; ENGEMANN *et al.*, 2006). Há um debate sobre se somente os antimicrobianos agem na seleção de resistência ou se outros fatores também tem o papel de manter e difundir a resistência (KNAPP *et al.*, 2008, 2010). Sendo assim, há uma crescente preocupação com a contaminação por metais traço, que por seleção indireta levam ao aumento da proliferação da resistência aos antimicrobianos (BAKER-AUSTIN *et al.*, 2006; KNAPP *et al.*, 2008).

Quando o ambiente é contaminado com metais traço os microrganismos são os primeiros organismos impactados. A contaminação por metais representa uma pressão seletiva de longa data, generalizada e recalcitrante com importância tanto ambiental como clínica que, potencialmente, contribui para a manutenção e disseminação de fatores de resistência aos antimicrobianos. Desta forma, estudos têm associado os tipos e níveis de contaminação por metais a padrões específicos de resistência aos antimicrobianos, sugerem ainda que vários mecanismos subjacentes a este processo de co-seleção. Estes mecanismos incluem a co-resistência, quando diferentes determinantes de resistência são codificados no mesmo elemento genético móvel (*Mobile genetic elements* - MGE) tal como plasmídeos, *transposons* ou *integrons* (SCHLÜTER *et al.*, 2007); resistência cruzada, quando o mesmo determinante genético é responsável pela resistência aos antimicrobianos e metais (SEILER; BERENDONK, 2012); resistência co-regulada ocorre quando o microrganismo se defende contra compostos estruturalmente diferentes, como metais e antimicrobianos, utilizando a mesma via, como no caso de bombas de efluxo multidroga resistente (MARTINEZ *et al.*, 2009).

Desta forma, a presença de metais traço pode contribuir para o aumento da resistência aos antimicrobianos (Tabela 3) (BAKER-AUSTIN *et al.*, 2006; CHAPMAN, 2003; HASMAN, 2005; WRIGHT, 2010).

Tabela 3 - Mecanismo de resistências comuns aos antimicrobianos e metais traço em microrganismos.

Mecanismo de resistência	Metal	Antimicrobiano
Redução da permeabilidade da membrana	Ag, Al, As, Co, Cu, Mn, Ni, Pb, Zn	β -lactâmicos, cefalosporinas carbapenêmicos, fluoroquinolonas, gentamicina, tetraciclinas e cloranfenicol
Inativação/Modificação do Antimicrobianos/Metal	As, Hg	β -lactâmicos, carbapênemicos, ciprofloxacina, trimetoprim, rifampicina, vancomicina e cloranfenicol
Efluxo	As, Cd, Co, Cu, Ni, Zn	β -lactâmicos, fluoroquinolonas, tetraciclinas, cloranfenicol, imipenem, aminoglicosídeos
Alteração do alvo celular	Cu, Hg, Zn	β -lactâmicos, ciprofloxacina, trimetoprim, rifampicina e gentamicina
Sequestro da droga e do metal	Cd, Cu, Zn	Coumermicina

Fonte: (Adaptado de BAKER-AUSTIN *et al.*, 2006).

Vale ressaltar que no ambiente aquático a troca de genes ocorre mais frequentemente devido à fácil movimentação de microrganismos e de MGE (PEIXOTO *et al.*, 2012). Estudos indicam que a microbiota ambiental se adapta rapidamente à presença de contaminantes, através da dispersão de genes entre espécies e, principalmente, pela transferência plasmidial. Além disso, genes podem ser acumulados em MGE, possibilitando assim, a disseminação não só da resistência aos antimicrobianos e metais, mas também de fatores de virulência, fixação de nitrogênio e da degradação de compostos tóxicos. Nota-se ainda que, *integrons* classe 1 estão relacionados a mecanismos de co-seleção, sendo frequentemente associados com cassetes de genes de resistência a metais (*Metal Resistance Genes* - MRGs) e genes de resistência a antimicrobianos (*Antibiotic Resistance Genes* - ARGs) (DI CESARE; ECKERT; CORNO, 2016; SEILER; BERENDONK, 2012).

No que diz respeito aos metais, termos como “resistência” e “tolerância” são arbitrários e são frequentemente utilizados como sinônimos na literatura. O termo “resistência” é utilizado quando é possível caracterizar o mecanismo específico de desintoxicação bacteriana para um metal. Portanto, o termo tolerância parece mais apropriado para se referir à capacidade de uma bactéria crescer na presença de altas concentrações de metal, em todos os casos em que o mecanismo desse processo não foi investigado (DE LIMA E SILVA *et al.*, 2012).

Estudos revelaram a presença de *integrons* de classe 1 contendo o gene *aadA1*, que confere resistência aos aminoglicosídeos, adjacente ao *operon mer*, responsável por garantir tolerância ao mercúrio, e ao *operon chr*, que confere tolerância ao cromo (BRANCO *et al.*, 2008; ROSEWARNE *et al.*, 2010). Apesar de poucos *integrons* de classe 1 não-clínicos terem sido caracterizados, estes poucos dados vêm fortalecendo as evidências de que a presença de metais traço pode levar disseminação de *integrons* de classe 1 em ambientes aquáticos devido à co-seleção. Sendo assim, microrganismos carreando MGE, em ambientes contaminados com metais traço e outros contaminantes, têm uma vantagem evolutiva em comparação ao resto da comunidade (DI CESARE *et al.*, 2016; ROSEWARNE *et al.*, 2010; WRIGHT *et al.*, 2008).

Análises proteômicas revelaram que o arsênio pode induzir a resistência antimicrobiana através da modulação da permeabilidade da membrana, com base na expressão de porina de membrana externa e proteínas de transporte de aminoácidos (CUI *et al.*, 2016).

Enquanto isso, como parte do programa de vigilância dinamarquês *Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme - DANMAP*, um estudo associou a presença do gene *tcrB* e a respectiva tolerância ao cobre com a resistência a lincosamidas, estreptograminas grupo B, macrolídeos e glicopeptídeos em *Enterococcus faecium* obtidos a partir de suínos expostos a cobre. Este estudo sugere ainda que um único plasmídeo carregava além do gene *tcrB*, os genes de resistências *vanA* e *ermB* (BAGER *et al.*, 2014; HASMAN, 2005).

Além disso, estudos sugerem uma associação frequente entre o *operon mer*, promotor da tolerância ao mercúrio, e genes de resistência a ampicilina, tetraciclina, canamicina, gentamicina, estreptomicina, ácido nalidíxico, cloranfenicol, sulfametoxazol/trimetoprim, tobramicina (DAVIS *et al.*, 2005; READY *et al.*, 2007; SILVER; PHUNG, 1996; SOGE *et al.*, 2008). A dispersão do *operon mer* tem sido principalmente estudada em microrganismos Gram-negativos. Entretanto, bactérias Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus*, foram descritas carreando o *transposon* Tn6009, constituído pelo *operon mer* e o *transposon* conjugativo Tn916, que confere resistência à tetraciclina. Além disso, diversos MGEs têm sido descritos carreando simultaneamente o *operon mer* e ARGs (SOGE *et al.*, 2008).

A expressão do gene *czcA* em biofilmes de *Xylella fastidiosa* sugere que este gene pode estar associado a resistência a metais e multidrogas (RODRIGUES, 2007). Outro estudo também associou a super expressão de *copA* a redução na expressão de *oprD* (CAILLE; ROSSIER; PERRON, 2007).

No Brasil, *P. aeruginosa* recuperadas de um rio contaminado com efluentes hospitalares e industriais apresentaram plasmídeos carregando os genes *copA* e *tetA*. Este estudo demonstrou que a presença de um plasmídeo conjugado conferiu resistência à tetraciclina e ao cobre, reforçando a preocupação de que a resistência antimicrobiana pela aquisição de MGEs pode ser induzida pela pressão seletiva exercida pelos metais traço no ambiente (MARTINS *et al.*, 2014). Portanto, não só o uso indiscriminado de antimicrobianos, mas também a contaminação por metais traço pode levar ao aumento dos níveis de resistência aos antimicrobianos, aumentando os riscos e danos à saúde humana.

1.4 Resistoma e plasmidoma microbiano

A resistência antimicrobiana, seja ela, intrínseca ou adquirida, é um processo adaptativo que garante a sobrevivência dos microrganismos resistentes na presença destes contaminantes. Denomina-se resistoma o conjunto de genes de resistência existentes em um dado local, que podem esclarecer como os microrganismos presentes interagem, tanto pela produção de antimicrobianos quanto pela presença de genes de resistência antimicrobiana, que possibilitam a competição e a comunicação dos microrganismos em um dado ambiente (D’COSTA *et al.*, 2006).

Vale ressaltar que alguns microrganismos são produtores naturais de antimicrobianos e que a maioria destes compostos é produzida no ambiente, o que significa que os ARGs também surgem em *habitats* não poluídos. Além disso, em ambientes naturais, os genes de resistência a antimicrobianos podem ter papéis metabólicos que podem incluir a biossíntese de macromoléculas e a manutenção da homeostase (ALONSO; SÁNCHEZ; MARTÍNEZ, 2001; FAJARDO; LINARES; MARTÍNEZ, 2009).

Estudos tradicionais de descrição de mecanismos de resistência antimicrobiana focam em microrganismos patogênicos cultiváveis, limitando, assim, a descrição de novos elementos de resistência, o que impossibilita, em muitos

casos, o levantamento de informações sobre a origem destes genes. A pesquisa por genes de resistência em amostras ambientais aborda quase a totalidade dos microrganismos, aumentando o espectro de organismos estudados, sem focar somente em microrganismos patogênicos cultiváveis isolados do ambiente clínico (PIDDOCK, 2006b).

A poluição química causada pelos antimicrobianos e metais traço pode gerar uma pressão seletiva, resultando no desenvolvimento de comunidades microbianas multidroga resistentes e na disseminação de genes de resistência (KEMPER, 2008). Os microrganismos possuem o mais rico repertório de diversidade genética e metabólica existente na natureza. As bactérias podem desenvolver resistência a esses poluentes químicos através da mutação de genes existentes ou através da aquisição de novos genes a partir de outras cepas ou espécies (transferência horizontal de genes). Elementos genéticos móveis, incluindo fagos, plasmídeos e *transposons*, entre outros medeiam esta transferência, e em algumas circunstâncias, baixos níveis de antimicrobianos e/ou metais traço no meio ambiente é o sinal chave que promove a transferência de genes, talvez assegurando que a comunidade microbiana esteja protegida do antimicrobiano (SCHMIEDER; EDWARDS, 2012).

Plasmídeos se disseminam rapidamente em ambientes que sua carga genética confere a vantagem seletiva apropriada. Assim, eles representam um recurso vasto e altamente dinâmico que permite que bactérias não adaptadas utilizem um reservatório de genes muito maior para adquirir novas funções. Como resultado, os plasmídeos são importantes mediadores da transferência horizontal de genes (*Horizontal Genes Transfer* - HGT), um processo que influencia significativamente na atividade bacteriana e na evolução (NORMAN *et al.*, 2014; NORMAN; HANSEN; SØRENSEN, 2009; WRIGHT, 2007). No entanto, o conhecimento básico sobre como respondem às perturbações ambientais é fundamental para a compreensão da evolução natural, acúmulo e propagação de genes microbianos.

Estudos recentes têm utilizado abordagens metagenômicas para tentar elucidar como alterações ambientais influenciam na composição e na disseminação de plasmídeos (LI; LI; ZHANG, 2015; LI *et al.*, 2012; WALKER, 2012). No entanto, o plasmidoma é consideravelmente menos atraente, pois os plasmídeos habitam quase exclusivamente o citoplasma de seu hospedeiro, impedindo o enriquecimento

através de filtração simples de suspensões celulares. Os estudos do plasmidoma devem, portanto, tomar medidas para minimizar, se não eliminar, a contribuição dos fragmentos cromossômicos mais abundantes. Este é um passo crucial, uma vez que apenas uma fração insignificante da comunidade total consistirá em plasmídeos, e as análises de dados subsequentes são tornadas inviáveis por uma presença esmagadora de dados não plasmidiais (ZHANG; ZHANG; YE, 2011).

Um plasmidoma é definido como um metagenoma de elementos genéticos circulares (plasmídeos) dentro de uma determinada comunidade. As análises metagenômicas de plasmídeos fornecem informações sobre a composição e estrutura do resistoma móvel. Sendo assim, apesar de trabalhoso é considerado um método promissor que fornece informações sobre os tipos de plasmídeos presentes na comunidade microbiana estudada, bem como MGE contidos nesses plasmídeos (LI *et al.*, 2012; ZHANG; ZHANG; YE, 2011).

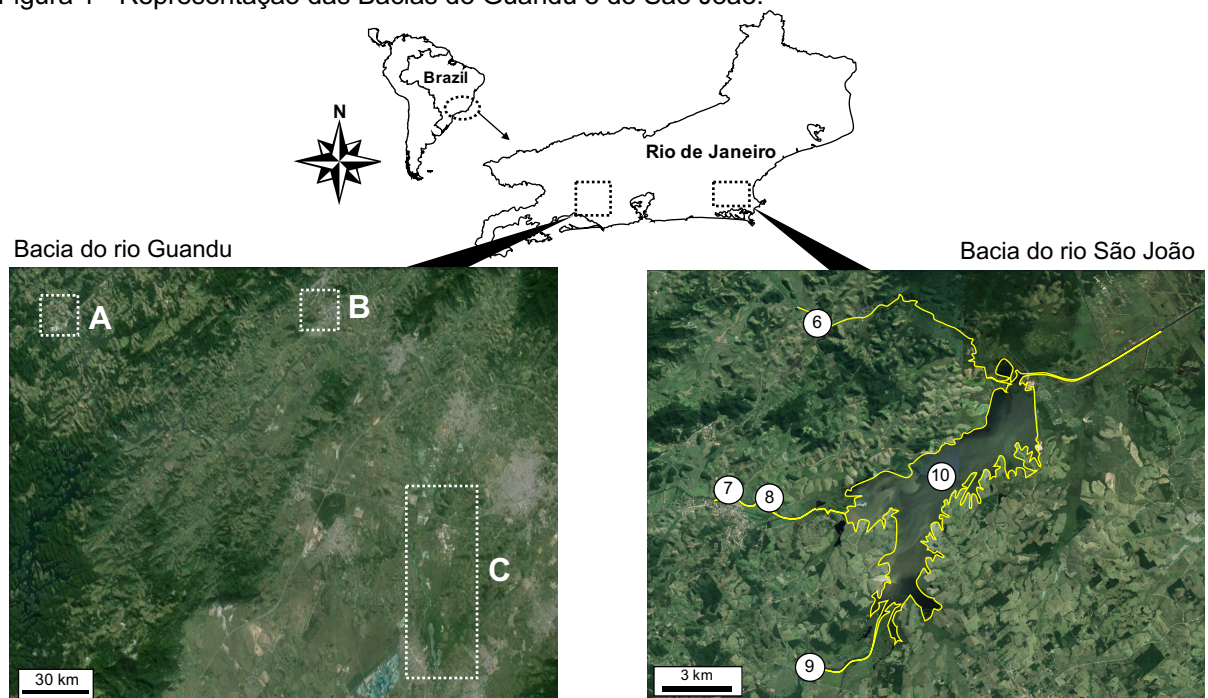
O papel dos ambientes não-clínicos no aumento da disseminação da resistência bacteriana aos antimicrobianos ainda não foi totalmente elucidado, porém deve ser avaliado com bastante cautela e atenção. Em geral, microrganismos resistentes surgem no ambiente e os genes de resistência não são facilmente removidos de áreas poluídas, mesmo quando a pressão já desapareceu. Esta pode ser a explicação do porque os genes de resistência a antimicrobianos são frequentemente detectados em ambientes livres de antimicrobianos (AMINOV; MACKIE, 2007; RAHMAN *et al.*, 2008). A resistência aos antimicrobianos, confinada inicialmente em hospitais, vem apresentando, também, alta prevalência em ambientes comunitários, tornando as decisões terapêuticas mais complexas (BAQUERO; MARTÍNEZ; CANTÓN, 2008).

Desta forma, a partir do conhecimento de que genes de resistência antimicrobiana (e também microrganismos produtores de antimicrobianos) têm origem ambiental, tornou-se evidente a necessidade de identificar reservatórios ambientais de tais genes e elucidar como se dá a movimentação deles do meio ambiente para microrganismos patogênicos e comensais humanos. O Brasil carece de pesquisas nessa área, não dispondo, entre outros, de levantamentos sobre a ocorrência de resíduos dos principais antimicrobianos, seus possíveis efeitos sobre o meio ambiente e, ou, tampouco qualquer estudo a respeito da dinâmica desses compostos em nossas águas.

1.5 Locais do estudo

Foram selecionadas duas bacias hidrográficas, as bacias São João ($22^{\circ}37'36.60''$ S e $42^{\circ}17'54.36''$ O) e Guandu ($22^{\circ}50'22.11''$ S e $43^{\circ}36'36.70''$ O), ambas destinadas ao abastecimento e no Estado do Rio de Janeiro (Figura 1).

Figura 1 - Representação das Bacias do Guandu e do São João.



Fonte: (Do autor, 2015).

A bacia hidrográfica do Rio Guandu é formada pelos rios Guandu, da Guarda e Guandu-Mirim, está situada a oeste da bacia da Baía de Guanabara, contribuinte à Baía de Sepetiba, no Estado do Rio de Janeiro, e ocupa uma área de 3.600 km², abrangendo 15 municípios onde vivem aproximadamente de 8 milhões de habitantes (Figura 1). Grande parte do volume de água que a compõe tem origem na transposição do Rio Paraíba do Sul, no município de Barra do Piraí. O rio Guandu possui como principais afluentes os rios dos Macacos, Santana, São Pedro, Poços/Queimados e Ipiranga, todos muito impactados negativamente em função de lançamentos de efluentes *in natura* (AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS, 2006).

Após a barragem da Estação de Tratamento de Água (ETA) do Guandu, uma parte é destinada a ETA ao tratamento e a outra parte do rio Guandu recebe as águas do rio Guandu-Mirim e é dividido em vários canais, sendo o principal deles o canal de São Francisco, que serve à importante zona industrial, em que se encontram a COSIGUA (Companhia Siderúrgica da Guanabara) e a termelétrica de Santa Cruz, terminando por desaguar na baía de Sepetiba. As águas da bacia abastecem a segunda maior região metropolitana do país, a Região Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro, sendo responsável pela subsistência e desenvolvimento da mesma. O problema do abastecimento da Região Metropolitana do Rio de Janeiro é histórico e estende-se desde os primórdios do Brasil Colônia até os dias atuais.

Outro grande problema são os areais, alguns clandestinos, que são locais em que se abrem grandes buracos para extração de areia do solo, retirando para isso a cobertura vegetal e, muitas vezes, a extração de areia que se dá no leito e ao longo das margens do rio Guandu. A extração é proibida dentro da área de proteção ambiental do rio Guandu, que abrange uma faixa de terra de até quinhentos metros em ambas as margens do rio. Esta prática promove o assoreamento do rio, o que diminui a vazão da água e aumenta a concentração de poluição, facilita a ocorrência de enchentes e aumenta a quantidade de resíduos a serem retirados da água durante o tratamento.

Enquanto isso, a bacia hidrográfica do Rio São João está localizada na Região dos Lagos, norte do estado do Rio de Janeiro (Figura 1). Na década de 80, a bacia hidrográfica do rio São João sofreu uma grande intervenção feita pelo governo federal para tornar o vale do São João em uma área agricultável. Ainda neste projeto, uma represa foi construída ampliando a área original da Lagoa de Juturnaíba de 8 para 30 quilômetros quadrados, causando diversos impactos ambientais.

O rio São João é o principal rio da região, por isso o mesmo dá o nome à Bacia Hidrográfica e, juntamente com os Rios Bacaxá e Capivari, formam a Represa Juturnaíba, manancial que abastece de água para abastecimento público da Região dos Lagos do Rio de Janeiro. Sete municípios integram parcialmente o território da bacia Cachoeiras de Macacu, Rio Bonito, Casimiro de Abreu, Araruama, São Pedro da Aldeia, Cabo Frio e Rio das Ostras, enquanto o município de Silva Jardim está

integralmente nela inserido. A bacia faz limite a oeste com a bacia da baía da Guanabara, ao norte e nordeste com as bacias dos rios Macaé e das Ostras e ao sul com as bacias do rio Una e das lagoas de Araruama, Jacarepiá e Saquarema, totalizando uma área de aproximadamente de 2160 km² (COMITÊ DAS BACIAS HIDROGRÁFICAS DAS LAGOAS DE ARARUAMA, 2013).

A Represa Juturnaíba tem capacidade de acumular um volume de 10 milhões de m³, sendo o tempo de residência da água (detenção hidráulica) estimado em 38 dias. Contam-se ainda dezenas de açudes, todos de pequeno tamanho, utilizados principalmente para dessedentação do gado e para irrigação. Apesar do barramento, Juturnaíba é considerada por muitos como um santuário ecológico, em razão de sua proximidade com a Reserva Biológica Poço das Antas, além de possuir uma grande diversidade de peixes e pequenas ilhas que fazem da lagoa um viveiro natural de espécies nativas de animais (CBHLSJ, 2013). Além do abastecimento público, estas águas são destinadas ainda para irrigação, suprimento de pequenas indústrias, mineração, produção de sal, recreação e lazer, navegação de pequenas embarcações e ainda como habitat de diversos animais, plantas e microrganismos (VERÍSSIMO; FERREIRA, 2013).

Vale ressaltar que poucas moradias próximas ao rio São João, contam com um sistema de abastecimento de água e coleta de esgoto, fazendo-se, muitas vezes, uso da água de poços e o descarte dos efluentes líquidos, em fossas sépticas ou lançando diretamente no rio e seus afluentes. Um estudo revelou que de 51 amostras coletadas no rio São João, 21 apresentaram a presença bactérias potencialmente patogênicas pertencentes ao gênero *Campylobacter*, sendo em sua maioria obtidas próximo a Represa Juturnaíba (THADEU et al., 2011).

Ainda não há proposta de enquadramento dos corpos de água para a Bacia Hidrográfica do Rio São João. De acordo com o CONAMA Resolução 357/2005 em seu artigo 42, *“enquanto não aprovados os respectivos enquadramentos, as águas doces serão consideradas classe 2, as salinas e salobras classe 1, exceto se as condições de qualidade atuais forem melhores, o que determinará a aplicação da classe mais rigorosa correspondente”* (CBHLSJ, 2013; CONAMA, 2005).

Apesar da importância da bacia do São João, pouco se sabe sobre a qualidade destas águas e o monitoramento da mesma é recente, iniciado em maio de 2011. Além disso, não há registros de monitoramento da qualidade das águas da

Represa Juturnaíba, isso demonstra a necessidade de medidas mais consistentes para o controle da qualidade sanitária da bacia, a fim de minimizar possíveis impactos no ambiente e na saúde da população.

2 RELEVÂNCIA PARA A VIGILÂNCIA SANITÁRIA

A saúde ambiental como subárea da saúde pública, busca articular o conhecimento científico interdisciplinar, de forma a contribuir para a formulação de políticas públicas para o desenvolvimento humano sustentável, através da inter-relação entre os aspectos do ambiente que impactam a saúde humana e vice-versa, como forma de entender cada vez mais esse processo, a fim de minimizar agravos à saúde da população e do ambiente (TUCCI, 2000).

A vigilância em saúde ambiental (VSA) é definida como um conjunto de ações que proporciona o conhecimento e a detecção de qualquer mudança nos fatores determinantes e condicionantes do meio ambiente que interferem na saúde humana, com a finalidade de identificar as medidas de prevenção e de controle de riscos ambientais relacionadas a doenças ou outros agravos à saúde (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002). Entretanto, no Brasil, estudos na área da VSA apresentam atualmente um campo ainda pouco explorado. Desta forma, o monitoramento da qualidade da água que abastece as estações de tratamento é de extrema importância para a VSA.

Dos 195 países reconhecidos pelas Nações Unidas, apenas 27 conseguiram fornecer água potável para 100% da população e tratar os esgotos de todas as residências. Destes 27 países que alcançaram a universalização, 11 estão na Europa (Andorra, Áustria, Chipre, Dinamarca, Espanha, Itália, Malta, Mônaco, Luxemburgo, Portugal, Suíça), cinco na América (Anguilha, Canadá, Chile, EUA, Groenlândia), sete na Ásia (Arábia Saudita, Coreia do Sul, Israel, Japão, Kuwait, Singapura, Uzbequistão) e quatro na Oceania (Austrália, Cook, Niue Palau). No entanto, um olhar mais atento para as 55 nações consideradas desenvolvidas, de acordo com os parâmetros da ONU, mostra que o problema do saneamento já foi solucionado para 95% da população (WHO; UNICEF, 2017).

A qualidade da água *in natura* é de grande importância nos sistemas de tratamento de águas superficiais, uma vez que uma falha no tratamento pode produzir água com risco à saúde dos consumidores. Vale ressaltar que no Brasil, a grande maioria dos municípios não possui sistema de tratamento de esgotos. Desta forma, uma das principais fontes de contaminação fecal nas águas naturais é, sem dúvida, a descarga de resíduos sanitários.

As doenças veiculadas através da água têm sido apontadas constantemente como um problema nos diversos tempos históricos da humanidade. A destinação dos resíduos produzidos pelas populações humanas, sejam eles químicos ou biológicos, sempre estiveram presentes entre os problemas de saúde pública (BARCELLOS; QUITÉRIO, 2006). Fatos históricos demonstram que algumas das mais generalizadas epidemias que já infligiram às populações humanas, com exceção da peste bubônica, tiveram sua origem em sistemas de distribuição de água (ARRIGO, 2005).

Em 1988 ocorreu um surto de doenças de veiculação hídrica, na Suécia, atingindo cerca de 11.000 pessoas em decorrência de uma falha na cloração da água. Entre 2011 e 2012, nos EUA, foram 32 surtos associados à água potável, sendo responsável por, pelo menos, 14 mortes (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2013).

No Brasil, no período de 2007 a 2015 foram notificados 371 surtos de doenças transmitidas pela água, entre os quais 14 estão vinculados ao estado do Rio de Janeiro (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2015). Pesquisas realizadas pelo Instituto Brasileiro de Defesa do Consumidor nas cidades de São Paulo, Rio de Janeiro e Paraná, constataram que a água fornecida para estas cidades, principalmente no Rio de Janeiro, tem entre seus principais problemas a contaminação por coliformes e o baixo teor de cloro na água. No Rio de Janeiro, dentre os locais avaliados, o que tem maior grau de contaminação é onde a água é fornecida pela Companhia de Águas e Esgotos do Rio de Janeiro (CEDAE). Tais parâmetros avaliados são de fundamental importância para a saúde do consumidor, pois alguns patógenos podem estar presentes na água podendo provocar surtos de doenças como cólera, gastroenterites, sobretudo a diarreia (CVE, 2014).

Já no Estado de São Paulo, um estudo do Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE), revelou que com a atual crise hídrica, os casos de diarreia aguda tiveram um aumento significativo em 2014. O CVE associa esse aumento de quase 35.000 casos, aos problemas de abastecimento de água que ainda afetam toda a região sudeste. Nos anos anteriores à crise, 2008 a 2013, a média do Estado mostra que o número de casos se situava entre 15.000 e 20.000, nunca superando

os 25.000 (CVE, 2015). A crise hídrica revelou problemas que não são novos em relação à qualidade da água e ao saneamento no Brasil.

Além disso, a água constitui não somente um meio de disseminação de doenças entre populações humanas e animal, mas também a via pela qual, microrganismos resistentes aos antimicrobianos (*antibiotic resistant bacteria* - ARBs) e ARGs são introduzidos no ecossistema (BAQUERO; MARTÍNEZ; CANTÓN, 2008). A contaminação do ambiente aquático por agentes antimicrobianos, detergentes, desinfetantes e resíduos industriais, como metais traço, favorece a proliferação de ARBs e ARGs, além de promover a HGT (TACÃO; CORREIA; HENRIQUES, 2012).

Estações de tratamento de águas não removem de forma eficiente antimicrobianos, desinfetantes e metais traço. Como resultado, quaisquer bactérias que transportam MGE com determinantes de resistência, ou que são capazes de adquiri-los por HGT, aumentariam em abundância durante as várias etapas do tratamento (HEGSTAD *et al.*, 2010; ROSEWARNE *et al.*, 2010).

Em função desta problemática, é de grande relevância a realização de estudos voltados à caracterização da poluição química e biológica, em conjunto com a determinação da diversidade microbiana e na estrutura do resistoma móvel nos ambientes aquáticos. Além disso, analisar a comunidade microbiana pode ampliar o entendimento da interação desses microrganismos em ambientes naturais contaminados por metais, antimicrobianos e fezes.

Os resultados obtidos poderão revelar um grande número de dados a respeito da influência de poluentes químicos e biológicos na microbiota e no resistoma aquático brasileiro. Desta forma, contribuir para o aprimoramento de ações da vigilância ambiental e epidemiológica, o que caracteriza sua extrema relevância para à saúde pública.

3 OBJETIVO

3.1 Geral

Avaliar as possíveis alterações na diversidade microbiana, na composição do resistoma microbiano móvel e nos mecanismos de co-seleção, frente à presença de metais traço e antimicrobianos em recursos hídricos destinados ao tratamento e abastecimento público.

3.2 Específicos

- Avaliar os parâmetros abióticos, bem como, determinar as concentrações de coliformes totais e *E. coli* nos ambientes selecionados;
- Detectar e identificar resíduos de antimicrobianos nas amostras por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS);
- Determinar as concentrações de metais traço nas amostras por espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES);
- Detectar e quantificar contaminação fecal hospedeiro-específico pela reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR);
- Determinar a diversidade microbiana e do plasmidoma dos ambientes aquáticos, através do sequenciamento de nova geração.
- Isolar e identificar microrganismos tolerantes a metais traço;
- Determinar os perfis de susceptibilidade aos metais e antimicrobianos dos isolados;
- Avaliar a influência dos metais traço nos perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos, bem como, na atividade de efluxo dos isolados;
- Verificar agrupamentos genéticos dos isolados bacterianos pela ERIC-PCR;

4 METODOLOGIA

4.1 Coleta das amostras

Foram selecionados cinco pontos de coleta na Bacia do Guandu: rios Queimados, Guandu, Piraí, Macacos e a Represa Guandu onde a água é captada para o tratamento. Cinco pontos na Bacia do São João: rios Capivari, Bacaxá, São João, a Foz do rio São João e a Represa Juturnaíba onde esses rios desembocam e a água é captada para o tratamento e abastecimento público (Figuras 2 e 3). Além disso, foram coletadas amostras de água potável de ambos os sistemas nos bairros Centro, Copacabana, Ilha do Governador, Jacarepaguá, Jardim Botânico, Leblon, Realengo, Santa Teresa, Vista Alegre (Sistema Guandu) e Unamar (Sistema São João) e no município de Itaguaí (Sistema Guandu).

As amostras (5 - 10 L de cada ponto) foram coletadas, em garrafas estéreis, com frequência semestral (janeiro e junho/2015). As amostras foram refrigeradas até serem processadas no laboratório. Uma alíquota de 500 mL de cada amostra foi encaminhada para o Setor de Resíduos do Laboratório de Alimentos do Departamento de Química do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) para a detecção de antimicrobianos por cromatografia. O volume restante foi encaminhado ao Setor de Bactérias e Arqueas onde foram realizadas as dosagens de parâmetros abióticos e microbiológicos, a detecção e quantificação de contaminação fecal hospedeiro-específico e isolamento bacteriano. Para a análise metagenômica foram utilizadas réplicas biológicas que foram coletadas durante três meses consecutivos e com frequência semestral.

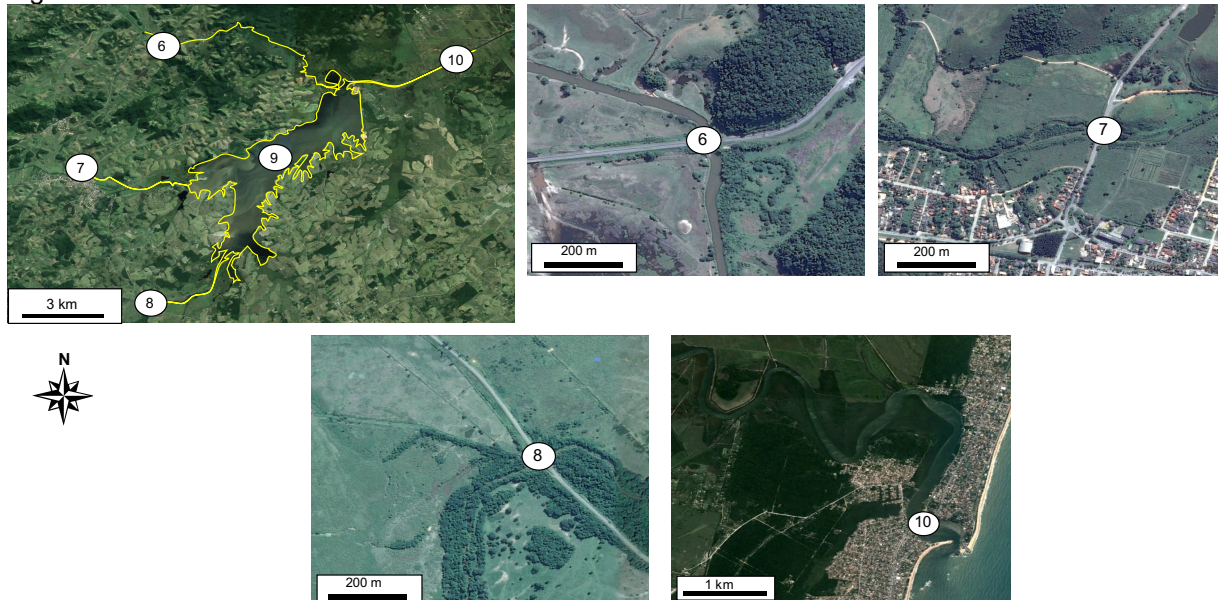
Figura 2 - Pontos de coleta da Bacia do Guandu.



1. Rio Pirai ($22^{\circ}37'41.90''\text{S}$ $43^{\circ}53'49.22''\text{O}$); 2. Rio dos Macacos ($22^{\circ}38'5.99''\text{S}$ $43^{\circ}42'17.79''\text{O}$); 3. Rio Guandu ($22^{\circ}43'40.35''\text{S}$ $43^{\circ}38'26.18''\text{O}$); 4. Rio Queimados ($22^{\circ}44'45.90''\text{S}$ $43^{\circ}36'42.37''\text{O}$); 5. Represa Guandu ($22^{\circ}48'31.69''\text{S}$ $43^{\circ}37'39.44''\text{O}$).

Fonte: (Do autor, 2015).

Figura 3 - Pontos de coleta da Bacia do São João.



6. Rio São João ($22^{\circ}33'52.85''\text{S}$ $42^{\circ}21'49.68''\text{O}$); 7. Rio Capivari ($22^{\circ}38'33.31''\text{S}$ $42^{\circ}24'0.87''\text{O}$); 8. Rio Bacaxá ($22^{\circ}42'44.56''\text{S}$ $42^{\circ}21'37.18''\text{O}$); 9. Represa Juturnaíba ($22^{\circ}38'26.98''\text{S}$ $42^{\circ}18'16.97''\text{O}$); 10. Foz do Rio São João ($22^{\circ}35'41.08''\text{S}$ $41^{\circ}59'43.85''\text{O}$).

Fonte: (Do autor, 2015).

Para a dosagem de metais traço as amostras foram coletadas em recipientes de polietileno de 500 mL contendo 1 mL de ácido nítrico P.A. (pH 2,0), a uma profundidade de 50 cm da superfície em seguida foram refrigeradas a 4°C e encaminhadas ao Setor de Elementos Inorgânicos do Laboratório de Alimentos do Departamento de Química do INCQS.

Em cada ponto foram realizadas as dosagens de pH, turbidez, oxigênio dissolvido, temperatura, salinidade com o equipamento *Water Quality Checker U-10* (Horiba, Japão). A determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais e *E. coli* foi realizada através do método do substrato definido com o *Colilert®* e *Quanti-Tray/2000 kit* (Idexx Laboratories, EUA), conforme protocolo descrito em *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA/AWWA/WEF, 2012).

4.2 Detecção de antimicrobianos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Espectrometria de Massas Sequencial (LC-MS/MS)

Os padrões de β -lactâmicos, fluoroquinolonas, macrolídeos, sulfonamidas e tetraciclinas foram obtidos no setor de Substâncias Químicas de Referência (SQRFB) do INCQS e preparados a fim de obter uma concentração de aproximadamente $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Tabela 4). As soluções estoques de β -lactâmicos foram preparadas em água, as de fluoroquinolonas em solução de $0,03 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaOH e de macrolídeos, sulfonamidas e tetraciclinas em MeOH. A massa teórica pesada para cada padrão foi calculada considerando correções de pureza, teor de água e ácido livre. As soluções foram transferidas para microtubos e estocadas em freezer a temperaturas igual ou inferior a -70°C .

Tabela 4 - Antimicrobianos pesquisados nas amostras de água não tratada e potável.

Classe de antimicrobianos	Antimicrobianos
β-lactâmicos	Amoxicilina, ampicilina, benzilpenicilina, cefaclor, cefadroxila, cefalexina, cefapirina, cefazolina, cefoperazona, cefquinoma, ceftiofur, cloxacilina, desacetilcefapirina, dicloxacilina, fenoximetilpenicilina, oxacilina e nafcilina
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacina, moxifloxacina, norfloxacina e ofloxacina
Macrolídeos	Azitromicina, claritromicina, eritromicina, espiramicina, oleandomicina, roxitromicina, tilmicosina, tilosina e troleandomicina.
Sulfonamidas	Dapsona, sulfacetamida, sulfadimetoxina, sulfamerazina, sulfametazina, sulfametoxazol, sulfaquinoxalina e sulfatiazol
Tetraciclina	Clortetraciclina, doxiciclina, metaciclina, oxitetraciclina, tetraciclina, 4-epiclorotetraciclina, 4-epioxitetraciclina e 4-epitetraciclina

Fonte: (Do autor, 2015).

Foram adicionados 25 mg de Na₂EDTA em uma alíquota de 25 mL de amostra filtrada. Em seguida o pH foi ajustado a 2,5 com HCl concentrado para promover uma melhor adsorção dos analitos na etapa de extração por fase sólida, empregando-se cartuchos Oasis HLB 500 mg/6 mL (Waters, EUA), previamente condicionados com 5 mL de metanol, 5 mL de água ultrapura e 5 mL de água acidificada com HCl concentrado a pH 2,5. Após uma lavagem com duas porções de 2,5 mL de água ultrapura para eliminação de interferentes, os analitos foram eluídos com duas porções de 3 mL de metanol e em seguida com duas porções de 2 mL de solução de metanol: acetona (1:1, v/v). O eluato foi separado em dois tubos de centrifuga, um para análise de tetraciclina e sulfonamidas, e o outro para análise de β-lactâmicos, macrolídeos e quinolonas. Os eluatos foram evaporados à secura com N₂ à temperatura de no máximo 47,5 °C. O extrato seco contido no tubo de centrifuga referente a tetraciclina e sulfonamidas foi reconstituído com 1 mL do solvente de reconstituição (80:20 (v/v) de 0,1% v/v de ácido fórmico em água e metanol) e o outro tubo de centrifuga referente a β-lactâmicos, macrolídeos e quinolonas foi reconstituído com 1 mL do solvente de reconstituição (65% de metanol em água), em seguida homogeneizado em agitador tipo vórtex, filtrado em filtros de fibra de vidro/nylon 0,2 μm e transferido para um frasco, para injeção no sistema de LC-MS/MS (ENGLERT; EPA, 2007).

O sistema de LC-MS/MS é composto de cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu Prominence (com os seguintes módulos: bomba quaternária LC-20AD, desgaseificador de membrana DGU-20A5, autoamostrador SIL-20AC,

forno de coluna CTO-20AC e controladora CBM-20A) e detector API5000 Applied Biosystems/MDS Sciex com fonte Turbo V[®] e sonda TurbolonSpray[®], controlado pelo software Analyst versão 1.4.2 do mesmo fabricante. Os antimicrobianos foram separados a 25 °C em coluna C18 (Pursuit[™] RS, 2,0 mm x 100 mm x 3 µm – Agilent), com coluna de guarda do mesmo tipo (2,0 mm x 3 µm). Foram utilizados para produzir um programa de eluição gradiente 0,1% v/v de ácido fórmico em água (fase móvel A), 0,1% v/v de ácido fórmico em acetonitrila (fase móvel B) e 0,1% v/v de ácido fórmico em metanol (fase móvel C).

4.3 Determinação dos níveis de metais traço por Espectrometria de Emissão Ótica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES)

Foram pesquisados 16 metais traço em todas as amostras de água: alumínio (Al), bário (Ba), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cobalto (Co), cobre (Cu), cromo (Cr), ferro (Fe), lítio (Li), manganês (Mn), mercúrio (Hg), níquel (Ni), prata (Ag), selênio (Se), urânio (U) e zinco (Zn). As soluções de calibração foram preparadas diariamente através de diluições em série da solução de padrões multi-elemento (1000 mg.L⁻¹ de cada padrão) para ICP-OES. As amostras foram diluídas 10 vezes com água desionizada. Todas as amostras foram analisadas com o ICP-OES, modelo Optima[®] 8300 (PerkinElmer, EUA), equipado com WinLab32[™] para o software ICP Versão 4.0 para a medição simultânea de todos os comprimentos de onda dos analíticos investigados.

4.4 Caracterização do metagenoma dos ambientes selecionados

4.4.1 Processamento das amostras para extração de DNA genômico e plasmidial

As amostras de água foram filtradas em membrana de acetato de celulose com porosidade de sistema 0,22 µm (Millipore, EUA), em condições assépticas. Os filtros saturados foram submetidos à extração de DNA genômico (gDNA) através do *PowerWater[®] DNA Isolation Kit* (Qiagen Science, EUA), conforme protocolo do fabricante. A extração de DNA plasmidial (pDNA) foi realizada através de lise

alcalina usando o *Plasmid Mini Kit* (Qiagen Science, EUA) conforme protocolo do fabricante. Em seguida, o produto da extração foi precipitado com isopropanol e lavado com etanol 70%. Para remover possíveis traços de gDNA o precipitado foi tratado com *ATPdependent Plasmid Safe DNase* (Epicentre, EUA), conforme instruções do fabricante (LI; LI; ZHANG, 2015).

Tanto o DNA genômico quanto o plasmidial foram quantificados através do equipamento Qubit 2.0 Fluorometer (ThermoFisher Scientific™, EUA) conforme o manual do fabricante.

4.4.2 Diversidade microbiana

Inicialmente, o gene *rrs* do 16S rRNA arqueano foi amplificado utilizando iniciadores específicos 21AF (5' - TTCCGGTTGATCCTGCCGGA - 3') e 1492ABr (5' - GGTTACCTTGTTACGACTT - 3'). Em seguida, a região V4 do gene *rrs* do 16S rRNA bacteriano e arqueano foi amplificada por PCR utilizando os iniciadores 16Sf (5' - GTGCCAGCMGCCGCGGTAA - 3') e 16Sr (5' - GGACTACHVGGGTWTCTAAT - 3') com os devidos *barcodes* e adaptadores que proporcionam a amplificação de um fragmento de 380 pb (KOZICH et al., 2013). A mistura de PCR foi composta por *AccuPrime™ Pfx SuperMix* (ThermoFisher Scientific™, EUA) e 2,0 µM de cada iniciador. A esta mistura foi adicionado aproximadamente 5,0 ng de gDNA a ser analisado e a amplificação foi realizada nas seguintes condições: etapa inicial 2 min a 95 °C, em seguida iniciaram-se as três etapas que foram repetidas por 25 vezes: 20 segundos a 95 °C; 50 °C por 15 segundos; e 5 minutos a 72 °C e alongamento por 10 min a 72 °C. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% (p/v); revelado com *GelRed™ 1X* (Biotium, EUA) e analisado pelo sistema de fotodocumentação L-PIX Touch (Loccus Biotechnology, Brasil). Após confirmar a amplificação, os produtos foram purificados utilizando-se kit *QIAquick® PCR Purification* (Qiagen Science, EUA) de acordo com o manual do fabricante e quantificados em equipamento Qubit® 2.0 *Fluorometer* (ThermoFisher Scientific™, EUA), conforme o manual do fabricante.

O sequenciamento massivo da região V4 do gene *rrs* do 16S rRNA foi realizado de acordo com o protocolo *Miseq Reagent Kit v.2* na plataforma MiSeq (Illumina®). A checagem da qualidade das sequências foi realizada utilizando-se o

programa *FastQC* (ANDREWS, 2010) e a filtragem de sequências com qualidade média igual ou superior a 20 foi realizada pelo programa *PRINSEQ* (SCHMIEDER; EDWARDS, 2012). A análise dos dados foi realizada através do software *QIIME* (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*) versão 1.9.1 (CAPORASO et al., 2010). Os dados foram comparados com o banco de dados *SILVA High Quality Ribosomal RNA Databases* (não-redundante) *release 132* (QUAST et al., 2013) com e-value máximo de 1e-5, mínima identidade de 97%, o que gerou uma tabela com grupos taxonômicos. As análises estatísticas como *Alpha* e *Beta* diversidade foram calculadas utilizando a plataforma web *MicrobiomeAnalyst* (DHARIWAL et al., 2017).

4.4.3 Plasmidoma

O pDNA foi preparado utilizando o *Illumina TruSeq DNA library preparation kit* seguindo as recomendações do fabricante. O sequenciamento foi realizado de acordo com o protocolo *Miseq Reagent Kit v.3* na plataforma *MiSeq®* (Illumina, EUA). A checagem da qualidade das sequências foi realizada utilizando o programa *FastQC* (ANDREWS, 2010) e a filtragem de sequências com qualidade média igual ou superior a 20 foi realizada pelo programa *PRINSEQ* (SCHMIEDER; EDWARDS, 2012). A montagem dos *contigs* foi realizada pelo programa *SPAdes* versão 3.13 (BANKEVICH et al., 2012; NURK et al., 2017), utilizando o *pipeline plasmidSPAdes*.

As sequências foram analisadas no programa MG-RAST (*Meta Genome - Rapid Annotation using Subsystem Technology*) (KEEGAN; GLASS; MEYER, 2016), onde a anotação pode ser visualizada em diversas categorias diferentes, entre elas a de subsistemas. Um subsistema pode ser entendido como um conjunto de papéis funcionais que implementam um determinado processo biológico ou estrutural (OVERBEEK et al., 2005). Os subsistemas são classificados em níveis hierárquicos, de maneira que no nível 1 são incluídas funções gerais tanto catabólicas quanto anabólicas (por exemplo, o metabolismo do DNA) e nos níveis 2 e 3 constam vias mais específicas como por exemplo, a resistência a antimicrobianos e outros compostos (DINSDALE et al., 2008).

Além disso, os genes de resistência anotados foram classificados de acordo com sua função e relacionados com resistência à antimicrobianos e metais traço pelos bancos de dados *CARD* (*Comprehensive Antibiotic Resistance Database*) (JIA

et al., 2017) e *BacMet* (*Antibacterial Biocide and Metal Resistance Genes Database*) (PAL *et al.*, 2014).

4.5 Detecção e quantificação de contaminação fecal pela qPCR

Os ensaios de qPCR baseados em *TaqMan* foram utilizados para quantificar o número de cópias dos genes *rrs* do 16S rRNA de *Bacteroidales* associado a suínos, *nifH* de *Methanobrevibacter smithii* associado a humanos e *Meth. ruminantium* associado a bovinos, e *mcrA* de *Meth. gottschalkii* associado a equinos. Os iniciadores de qPCR e as sondas de hibridização foram desenhados a partir de sequências publicadas dos genes alvo (CP000678; AB019137; EU919431; KM924826) usando o software *Oligo Architect Online™* (<http://www.oligoarchitect.com>) e baseados nas condições de qPCR do gene *nifH* descritas previamente (BIANCO *et al.*, 2015; JOHNSTON *et al.*, 2010) (Tabela 5). Os iniciadores foram desenhados com temperatura de *melting* (*Tm*) entre 58 e 60 °C, enquanto isso, as sondas com *Tm* de 7 a 10 °C maior que o dos iniciadores.

Tabela 5 - Oligonucleotídeos utilizados na qPCR.

Iniciadores	Sequências (5'-3')	Alvo	Tamanho do produto (pb)
qMnif12F qMnif143R qMnifProbe	CAGTGAAGAGGATATTATTGTA ACACCTAAGTTTTCAAGTC (FAM) AGCTACTATTACACCACGTC (BHQ-1)	<i>nifH</i> / <i>Meth. smithii</i>	131
qMr181-F qMr325-R qMr201-P	ATGTGTTGAAAGCGGAGGTC GCAGACCACATCCCCTAAAA (Cy5) CTGAACCTGGAGTGGGATGT (BHQ-2)	<i>nifH</i> / <i>Meth. ruminantium</i>	145
qPF191F qPF276R qPFProbe	CAGCAGTGAGGAATATTG GCAGTTTACAACCCATAG (TET) CACGCTACTTGGCTGGTTCA (BHQ-1)	<i>rrs</i> do 16S rRNA / Bacteroidales suínos	86
qGot23F qGot103R qGotProbe	GGTACTTATCCATGTAATTAC CACCACATTGATCTTGTA (Cy3.5) CGAAACCGTAGAAACCTAATCTGGAAT (BHQ-1)	<i>mcrA</i> / <i>Meth. gottschalkii</i>	80

Fonte: (Do autor, 2015).

Os conjuntos de iniciadores e sondas foram testados frente ao DNA de linhagens de referência das coleções de bactérias e arqueas de referência em vigilância sanitária do INCQS para garantir que não houve reação cruzada entre

organismos geneticamente similares ou não. Foram elas: *Bacteroides fragilis* CBRVS 068 (ATCC 25285), *E. coli* CBRVS 043 (ATCC 23229), *Klebsiella pneumoniae* CBRVS 0629 (ATCC BAA-1706), *Neisseria gonorrhoeae* CBRVS 0604 (IAL1894 (OMS-D)), *Pantoea agglomerans* CBRVS 0721 (ATCC 33243), *Haloferax volcanii* CARVS 10001 (DSM 3757), *Halococcus morrhuae* CARVS 10012 (DSM 1307), *Meth. arboriphilicus* CARVS 10032 (DSM 1125), *Meth. wolinii* CARVS 10033 (DSM 11976), *Meth. woesei* CARVS 10034 (DSM 11979), *Meth. thaueri* CARVS 10035 (DSM 11995), *Meth. ruminantium* CARVS 10036 (DSM 1093), *Meth. oralis* CARVS 10037 (DSM 7256), *Meth. olleyae* CARVS 10038 (DSM 16632), *Meth. millerae* CARVS 10039 (DSM 16643), *Meth. acidurans* CARVS 10043 (DSM 15163), *Meth. smithii* CARVS 10044, 10045, 10046, 10047, 10048 (DSM 11975, 2374, 2375 e 861) e *Meth. gottschalkii* CARVS 10049 (DSM 11977). Também foram adicionadas amostras de controle com a entrada de esgoto conhecida de duas estações de tratamento de efluentes hospitalares e um esgoto animal sem material fecal humana. Adicionalmente, os conjuntos foram também testados frente a amostras fecais de humanos (n=15), equinos (n=15), suínos (n=11), caprinos (n=13), aves (n=13) e bovinos (n=12). Além disso, também foi adicionada uma alíquota de água ultrapura para avaliar a ausência de DNA contaminante na mistura da PCR.

As reações de qPCR foram otimizadas para atingir uma eficiência entre 90 e 110% e a reação padronizada para um volume final de 20 μ L. A mistura da reação de qPCR teve o volume final 20 μ L, contendo 0,25 μ M de cada iniciador e 0,20 μ M de sonda. Também compôs a mistura: MasterMix *QuantiNova Probe* 1X (Qiagen Science, EUA), cerca de 20 ng de DNA da amostra e água ultrapura completando o volume nas seguintes condições: 5 minutos a 95 °C, 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C e 40 segundos a 60 °C. A amplificação foi realizada em termociclador *Rotor-Gene Q 5Plex HRM Plataform* (Qiagen Science, EUA). Para visualização dos resultados e análises dos parâmetros das reações, como *Threshold Cycle* (Ct) e ΔRn foi utilizado o software *Rotor-Gene ScreenClust HRM Software v.2.1* fornecido pelo fabricante.

Sete a oito pontos de diluições decimais seriadas de cada DNA foram utilizados na construção de suas respectivas curvas-padrão. As concentrações de DNA total das amostras foram determinadas pelo *Qubit® 2.0 Fluorometer quantitates* (ThermoFisher Scientific™, EUA). As curvas padrão foram construídas para determinar o número de cópias amplificadas do gene marcador de cada alvo. O

número de cópias foi calculado conforme manual do equipamento. Todas as reações foram realizadas em triplicata. O menor número de cópias gênicas detectadas nas curvas-padrão foi considerado o limite de quantificação (LoQ).

Foi utilizado também o kit *Exogenous Internal Positive Control TaqMan®* (IPC) (ThermoFisher Scientific™, EUA) para verificar a presença de inibidores nas amostras, de acordo com instruções do fabricante. Após a construção da curva do IPC, foram realizadas reações com o kit do IPC com uma mistura do DNA das amostras e uma concentração conhecida de IPC. A diferença entre a média de CT nas amostras de controle e nas amostras de água foi utilizada para estimar o grau de inibição da PCR e para corrigir os valores encontrados. O valor de $\Delta\Delta CT$ foi calculado subtraindo o valor médio de CT do IPC controle, sem inibição, do CT das IPC com amostras. O valor $\Delta\Delta CT$ é aplicado na equação $2^{-\Delta\Delta CT}$, este cálculo fornece uma estimativa para cada amostra da constante pela qual a estimativa-alvo correspondente deve ser multiplicada de modo a refletir o número real de cópias que teria sido obtido se não houvesse inibição (RAO *et al.*, 2013).

4.6 Processamento das amostras para isolamento bacteriano

As amostras foram concentradas por filtração em membrana de acetato de celulose com porosidade de sistema 0,22 μm (Millipore, EUA). Dois filtros saturados de cada ponto de coleta foram transferidos para tubos *Falcon* contendo 5 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) e homogeneizados em agitador do tipo vórtex. Em seguida foram semeados 0,1 mL em caldo nutriente (Difco, EUA) acrescido de diferentes concentrações de diferentes metais: arsênio 2,0; 5,0; 10,0; 15,0 mM; cobalto e cobre 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 mM; cromo e urânio 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 mM; mercúrio 0,01; 0,02; 0,03; 0,04 mM; chumbo 1,0; 2,0; 5,0; 10,0 mM; zinco 2,0; 4,0; 8,0; 16,0 mM e incubadas a 37°C durante 24-48 horas. Após o período de incubação, alíquotas dos tubos com caldo nutriente que apresentaram crescimento na maior concentração de cada metal foram semeadas em ágar nutriente em placas de Petri, acrescido da mesma concentração de metal do caldo de origem, seguida de incubação a 37 °C durante 24-48 horas. Em seguida foram selecionadas colônias das placas e as características morfo-tintórias foram analisadas pela coloração de Gram (DUQUE, 2012; WHITMAN *et al.*, 2015). Para verificar a viabilidade dos meios

de cultura foram utilizados microrganismos de referência tolerantes a metais (Tabela 6).

Tabela 6 - Microrganismos de referência tolerantes a metais traço.

Microrganismo	Origem	Metal tolerante	Gene que confere a tolerância
<i>Acinetobacter baumannii</i>	CBRVS 143 ATCC 19606	As, Hg	<i>acr3, merAC</i>
<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	CBRVS 765 ATCC 19194	Cr	<i>chrB</i>
<i>Brevundimonas diminuta</i>	CBRVS 070 ATCC 11568	Cu, Hg	<i>Operon cop, merAT</i>
<i>Burkholderia cepacia</i>	CBRVS 438 ATCC 25416	As, Cd, Co, Cu, Zn	<i>arsCR, copCD, czc</i>
<i>Cronobacter sakazakii</i>	CBRVS 583 ATCC BAA-894	As, Cu	<i>arsA, pcoA, copA</i>
<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i>	CBRVS 074 ATCC 13047	As, Cu, Hg	<i>Operons ars e pco</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	CBRVS 154 ATCC 19433	Cu	<i>tcrB</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	CBRVS 653 ATCC 51559	Cu	<i>tcrB</i>
<i>Escherichia coli</i>	CBRVS 325 ATCC 25218	Hg	<i>merA</i>
<i>Haloarcula marismortui</i>	CARVS 10009 DSM 3752	Cu	<i>copB</i>
<i>Micrococcus luteus</i>	CBRVS 356 ATCC 4698	Cd, Zn, Co	<i>czc</i>
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	CBRVS 766 ATCC 17588	As, Cu, Zn	<i>arsB, czcABC, copAB, pcoB, merADEPRT</i>
<i>Serratia marcescens</i>	CBRVS 100 ATCC 13880	U	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	CBRVS 016 ATCC 12228	As, Cu	<i>arsC, copA</i>
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i>	CBRVS 233 ATCC 15305	As, Cd, Cu	<i>arsC, cadA, copA</i>

Fonte: (Do autor, 2015).

4.7 Identificação dos isolados tolerantes a metais traço

A identificação dos isolados foi realizada através do sequenciamento do gene *rrs* do 16S rRNA. A extração do gDNA foi realizada utilizando o kit *Dnaeasy® Blood & Tissue kit* (Qiagen Science, EUA). Foram utilizados os iniciadores 27BF (5' - AGAGTTTGATCATGGCTCAG - 3') e 1492ABr (5' - GGTTACCTTGTTACGACTT -

3') que proporcionam a amplificação de um fragmento de 1465 pb (LANE *et. al.*, 1991). A mistura da PCR foi composta por água deionizada; 1X PCR MasterMix (Promega, EUA) e 15 pmol de cada iniciador. A esta mistura foram adicionados aproximadamente 10 ng do gDNA a ser analisado e a amplificação foi realizada nas seguintes condições: desnaturação a 95 °C por 1 minuto; anelamento a 55 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto por 35 ciclos, com uma extensão adicional a 72 °C por 15 minutos. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, a 1,5% (p/v); revelado com *GelRed™* 1X (Biotium, EUA) e analisado pelo sistema de fotodocumentação L-PIX Touch (Loccus Biotechnology, Brasil). Após confirmar a amplificação, os produtos foram purificados utilizando kit *QIAquick® PCR Purification* (Qiagen Science, EUA) de acordo com o manual do fabricante.

Os fragmentos foram sequenciados tanto no sentido "*forward*" como no "*reverse*" e em duplicatas utilizando o kit *Big Dye Terminator* por eletroforese capilar em aparelho ABI 3730 DNA Analyzer (ThermoFisher Scientific™, EUA), na Plataforma de sequenciamento PDTIS na FIOCRUZ. A qualidade dos cromatogramas obtidos foi analisada através do software *Sequencher 5.0* (*Gene Codes Corporation*, EUA). A análise de similaridade das sequências foi realizada pelos programas BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), no GenBank (*National Center for Biotechnology Information* - NCBI) e EzTaxon (<http://www.ezbiocloud.net/>) (KIM *et al.*, 2012).

Logo após a identificação, os isolados foram preservados por liofilização e depositados na Coleção de Microrganismos Clínicos e Ambientais (CMAC) do INCQS na FIOCRUZ com a seguinte identificação P4535 - P4603, P4605 - P4614, P4668 - P4700, P4728 - P4772, P4802 - P4833, P4904 - P4966, P4971 - P4983, P5196 - P5311, P5341 - P5477.

4.8 Determinação do perfil de susceptibilidade aos metais traço

Os isolados foram inicialmente semeados em caldo BHI por 24 h a 37°C e o crescimento microbiano suspenso em solução salina estéril (NaCl 0,85%) para a obtenção do padrão de turbidez 0,5 na escala de McFarland. A suspensão foi semeada, com o auxílio de um *swab*, em ágar Müeller-Hinton contendo diferentes

metais e concentrações (As 2,0; 5,0; 10,0; 15,0 mM; Co, Cu 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 mM; Cr e U 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 mM; Hg 0,01; 0,02; 0,03; 0,04 mM; Pb 1,0; 2,0; 5,0; 10,0 mM; Zn 2,0; 4,0; 8,0; 16,0 mM) e incubadas a 37°C durante 24-48 horas. Foi considerada a concentração máxima tolerável (*Maximum Tolerable Concentration* - MTC) a maior concentração de metal traço que inibiu completamente o crescimento visível dos isolados (KACAR, 2015; MATYAR; KAYA; DINÇER, 2008). Os isolados foram considerados tolerantes quando os valores de CMT excederam os valores da cepa controle *E. coli* INCQS 0031/ATCC 10536 (RAFIQ *et al.*, 2017). Além disso, os isolados foram classificados de acordo com o perfil de susceptibilidade aos metais traço, non-MMT (*non Multimetal-tolerant*) quando apresentaram tolerância a três ou menos metais testados; MMT (*Multimetal-tolerant*) tolerância até quatro metais; XMT (*Extensively Metal-tolerant*) tolerância até seis metais e PMT (*Panmetal-tolerant*) tolerância a todos os metais testados.

4.9 Determinação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos

A susceptibilidade aos antimicrobianos foi determinada pela técnica de disco-difusão (método de Kirby-Bauer), segundo os critérios estabelecidos pelo *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST, 2016). Os isolados foram inicialmente semeados em ágar BHI por 24 h a 37 °C e o crescimento microbiano suspenso em solução salina estéril (NaCl 0,85%) para a obtenção do padrão de turbidez 0,5 na escala de McFarland. A suspensão foi semeada, com o auxílio de um *swab*, em ágar Müller-Hinton onde foram depositados os discos de onze antimicrobianos selecionados (azitromicina (15 µg); aztreonam (30 µg), cefepima (30 µg), ceftazidima (10 µg), ciprofloxacina (5 µg) gentamicina (10 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg), piperacillina/tazobactam (30/6 µg); tetraciclina (30 µg); sulfametoxazol-trimetoprim (23,75/1,25 µg). A leitura dos halos de inibição foi efetuada após a incubação a 37°C por 16-18 horas.

Os isolados que apresentaram resistência a no máximo um antimicrobiano foram classificados non-MDR (*non Multidrug-resistant*), resistência a pelo menos um antimicrobiano de três classes distintas como MDR (*Multidrug-resistant*), resistência a pelo menos um antimicrobiano em todas as classes, exceto ≤ 2 como XDR (*Extensively drug-resistant*) e resistência a todos os antimicrobianos testados como

PDR (*Pandrug-resistant*). Além disso, os isolados que apresentaram resistência à ceftazidima e cefepima foram classificados como possíveis produtores de ESBL (*Extended spectrum β -lactamases*), aqueles resistentes a imipenem ou meropenem como possíveis KPC (*Klebsiella pneumoniae Carbapenemase*) e à ceftazidima e imipenem ou meropenem como possíveis MBLs (*Metallo- β -lactamases*).

4.10 Avaliação dos efeitos da presença de metais traço no perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos

O perfil dos isolados susceptíveis a todos os antimicrobianos foi novamente avaliado, desta vez, na presença de cobre (1,0 e 2,0 mM) e zinco (2,0 e 4,0 mM) com a finalidade de avaliar o efeito destes metais no perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos.

4.11 Avaliação da atividade de efluxo induzida pelos metais traço

O método *Cartwheel* permite a detecção da atividade de efluxo, utilizando o Brometo de Etídio (*EtBr*) como substrato inespecífico de bombas de efluxo. Quanto maior for a concentração de *EtBr* necessária para produzir fluorescência bacteriana num determinado isolado, maior será a atividade de efluxo do mesmo (MARTINS *et al.*, 2011, 2013). Os isolados foram inicialmente semeados em ágar BHI por 24 h a 37 °C e o crescimento microbiano suspenso em solução salina estéril (NaCl 0,85%) para a obtenção do padrão de turbidez 0,5 na escala de McFarland. A suspensão foi semeada em ágar Müeller-Hinton contendo diferentes concentrações de *EtBr* (0 a 3,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) com intervalos de 0,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. As linhagens de referência *Acinetobacter haemolyticus* CBRVS 0765 (ATCC 19194), *Pseudomonas stutzeri* CBRVS 0766 (ATCC 27853), *Serratia marcescens* CBRVS 0100 (ATCC 13880) foram incluídas em todos os ensaios como controles positivos e a linhagem *A. baumannii* CBRVS 0143 (ATCC 19606) como controle negativo. As placas foram incubadas a 37 °C durante 24 horas, ao abrigo da luz, e fotografadas pelo sistema de fotodocumentação L-PIX Touch (Loccus Biotechnologia, Brasil). A menor concentração capaz de produzir fluorescência bacteriana foi determinada como a Concentração Mínima de *EtBr* (*Minimum Concentration of EtBr* - MC_{EtBr}) capaz de

produzir fluorescência bacteriana para cada isolado. Após a determinação da MC_{EtBr} , a atividade de efluxo dos isolados foi novamente avaliada, frente a presença de cobre (2,0 mM) e zinco (4,0 mM).

4.12 Caracterização de agrupamentos genéticos dos isolados

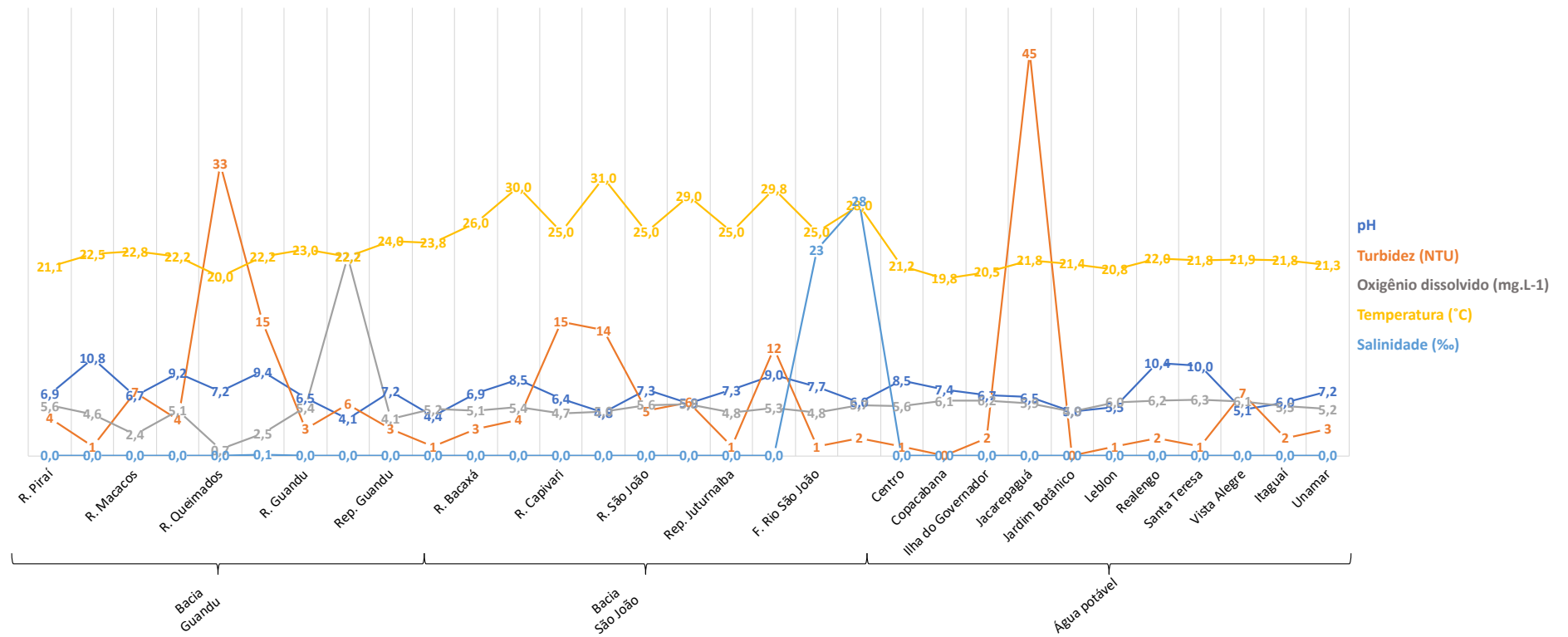
A análise foi realizada através da *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus - Polymerase Chain Reaction* (ERIC-PCR). Foi utilizado o iniciador ERIC-2 (5' - AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG - 3') com protocolo previamente descrito (VERSALOVIC; KOEUTH; LUPSKI, 1991). Os produtos da amplificação foram submetidos à electroforese em gel de 2% de agarose ultrapura (ThermoFisher Scientific™, EUA) em tampão TAE 1X por 30 minutos a 55 V e 1 hora e 45 minutos a 75 V, e em seguida corados com *GelRed*™ 1X (Biotium, EUA). O gel foi fotografado pelo sistema de fotodocumentação L-PIX Touch (Loccus Biotechnology, Brasil), os padrões de bandas foram analisados através do programa *BioNumerics* 6.6 (Applied Maths, Bélgica) e o dendograma foi construído com a utilização do índice de *Dice* e o método *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average* (UPGMA) (VAN BELKUM *et al.*, 2007). Os isolados que apresentaram perfis de bandas com similaridade $\geq 80\%$ foram classificados no mesmo grupo genético (KHALIL; ELGAML; EL-MOWAFY, 2017).

5 RESULTADOS

5.1 Dosagem de parâmetros abióticos e microbiológicos

O pH das amostras de água não tratada da bacia do Guandu apresentou menor valor no rio Guandu (4,1) e maior valor no rio Pirai (10,8). As amostras da bacia do São João apresentaram maior valor na Represa Juturnaíba com 9,0 e menor valor no rio Capivarí com 4,8. O pH das amostras de água potável variou entre 5,0 e 10,4 no Jardim Botânico e em Realengo, respectivamente. Em relação à turbidez, o maior valor encontrado na bacia do Guandu foi no rio Queimados (33 UNT) e o menor valor no rio Pirai e na Represa Guandu, ambos com 1 UNT. Duas amostras de água potável, Vista Alegre e Jacarepaguá, apresentaram valores acima do preconizado pela legislação (1 UNT). Seis amostras da bacia do Guandu apresentaram níveis de oxigênio dissolvido abaixo do preconizado variando entre 0,7 no rio Queimados a 4,6 mg.L⁻¹ no rio Pirai, além disso, cinco amostras da mesma bacia apresentaram valores próximos ao preconizado (5,0 mg.L⁻¹). Na bacia do São João, três amostras, Represa Juturnaíba, rio Capivarí e foz do rio São João, apresentaram níveis de oxigênio dissolvido abaixo do preconizado, entretanto, o restante das amostras apresentou valores próximos ao preconizado. Nas amostras de água potável, os níveis variaram entre 4,9 e 6,3 mg.L⁻¹ no Jardim Botânico e Santa Teresa, respectivamente. As temperaturas das amostras de ambas as bacias variaram entre 20 e 31 °C no rio Queimados e no rio Capivari, respectivamente. Por outro lado, nas amostras de água potável variou entre 19,8 em Copacabana e 22 °C Realengo (Figura 4).

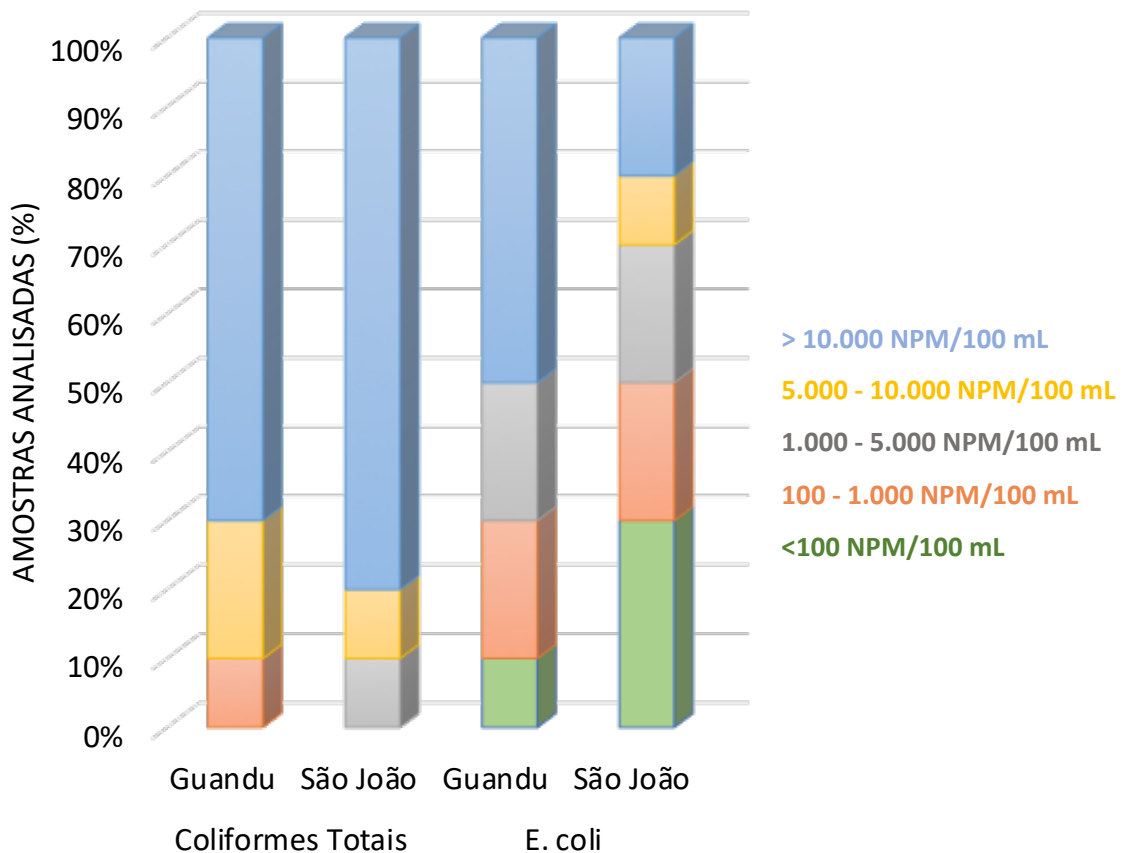
Figura 4 - Parâmetros abióticos dos pontos de coleta de amostras de água não tratada e potável.



Fonte: (Do autor, 2019).

Os níveis de coliformes totais foram considerados elevados na maioria das amostras destinadas ao abastecimento, com exceção da Represa Guandu com 228 NMP/100mL. Os níveis de *E. coli* também foram considerados elevados na maioria dos pontos variando entre 1500 e 24196 NMP/100mL na bacia do Guandu, 2130 e 24196 NMP/100mL na bacia do São João. Todas as amostras de água potável apresentaram ausência de coliformes totais e *E. coli* (Figura 5).

Figura 5 - Frequência de detecção e níveis de concentração de coliformes totais e *E. coli* em amostras de água não tratada e potável.



Fonte: (Do autor, 2019).

5.2 Detecção de antimicrobianos nas amostras de água

O limite de quantificação (LQ) da curva de quantificação de antimicrobianos foi de 25 ng.L⁻¹. Os valores abaixo do LQ foram considerados valores estimativos, já que a equação da curva foi capaz de mensurar. Nas amostras de água potável do Centro, Santa Teresa, Ilha do Governador, Vista Alegre, Jacarepaguá, Realengo e

Jardim Botânico, e rio Bacaxá não foi possível detectar nenhum dos antimicrobianos pesquisados.

Claritromicina foi o antimicrobiano detectado mais frequentemente (52%, 16/31), em concentrações inferiores a 10 ng.L^{-1} em ambas as coletas nos rios Guandu e Capivari e na Foz do rio São João. Foi também detectada na 2ª coleta nos rios Piraí e Macacos, e nas amostras de água potável do Leblon, Copacabana, Itaguaí e Unamar. Enquanto isso, concentrações entre 53,6 e 185 ng.L^{-1} foram reveladas na 1ª coleta nos rios Queimados e Macacos e na Represa Guandu, respectivamente.

Na 1ª coleta na Foz do rio São João foram encontradas concentrações $>500 \text{ ng.L}^{-1}$ de cefoperazona. Também na 1ª coleta nas Represas Guandu e Juturnaíba e nos rios Queimados, Macacos, São João, Capivari e Guandu foram revelados níveis $<10 \text{ ng.L}^{-1}$ deste antimicrobiano. A concentração de sulfametoxazol, pertencente à classe das sulfonamidas, variou entre 47,4 e $340,5 \text{ ng.L}^{-1}$ na 2ª coleta nos rios Macacos e Queimados, respectivamente. A amostra de água potável de Unamar apresentou $12,5 \text{ ng.L}^{-1}$ desse antimicrobiano. Já na 1ª coleta nos rios Capivari, Guandu, Macacos, na Represa Guandu e na Foz do rio São João este antimicrobiano foi detectado em níveis $<10 \text{ ng.L}^{-1}$.

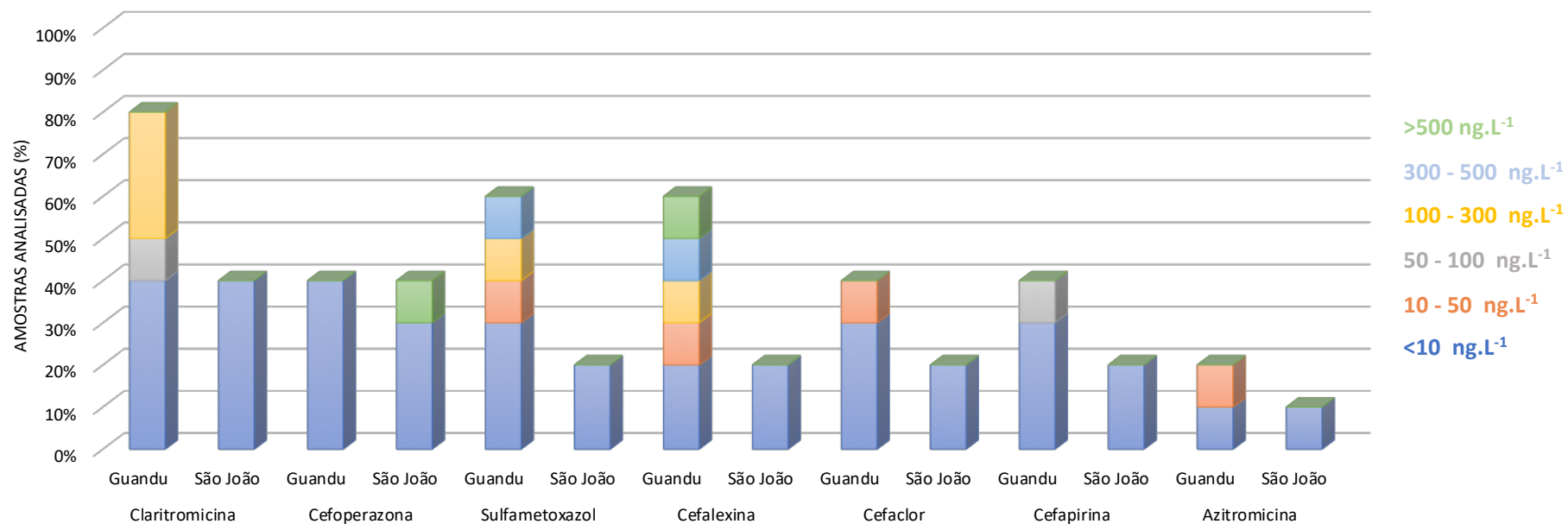
Níveis $<10 \text{ ng.L}^{-1}$ de cefalexina, cefalosporina de 1ª geração, foram observados na 1ª coleta nos rios Guandu, Capivari, na Represa Guandu, e na Foz do rio São João. Concentrações acima de 300 e 500 ng.L^{-1} foram reveladas na 1ª coleta nos rios Macacos e Queimados, respectivamente. Já na segunda coleta dos rios Piraí e Macacos foram observadas concentrações acima de 10 e 100 ng.L^{-1} , respectivamente.

Em relação a cefaclor este foi quantificado na 2ª coleta no rio Queimados com valor igual a 23 ng.L^{-1} e detectado na 1ª coleta nos rios Macacos, Queimados, Guandu, Capivari, na Represa Guandu e na Foz do rio São João em níveis inferiores a 10 ng.L^{-1} . O antimicrobiano cefapirina, cefalosporina de 1ª geração, foi detectado em níveis inferiores a 10 ng.L^{-1} na 1ª coleta nos rios Macacos, Guandu, Capivari, na Represa Guandu, e na Foz do rio São João; na 2ª coleta do rio Queimados apresentou valor igual a 116 ng.L^{-1} .

Azitromicina foi encontrado na amostra de água potável de Itaguaí, no rio Macacos e na Foz do rio São João em concentração abaixo de 10 ng.L^{-1} , e 49,9

ng.L⁻¹ na 2ª coleta no rio Queimados. Troleandomicina e roxitromicina foram detectadas apenas na amostra de água potável do Leblon em concentrações <10 ng.L⁻¹ (Figura 6).

Figura 6 - Frequência de detecção e níveis de concentração de antimicrobianos em amostras de água não tratada e potável.



Fonte: (Do autor, 2019).

5.3 Determinação dos níveis de metais traço nas amostras de água

Ag, As e Co não foram detectados em nenhuma amostra. Os valores de Ba ficaram entre 0,05 mg.L⁻¹ no rio Bacaxá e 0,14 mg.L⁻¹ no rio Capivari, todos os pontos ficaram abaixo do limite preconizado. Em relação ao Cd, este metal foi detectado apenas no rio Queimados (0,007 mg.L⁻¹) em concentração maior do que o limite preconizado. O Cu foi detectado na foz do rio São João, rio Bacaxá, Capivari, São João e Represa Juturnaíba com valor igual a 0,07 mg.L⁻¹, valor acima do recomendado pela legislação. Ba, Cd e Cu não foram detectados em nenhuma das amostras de água potável. Hg foi detectado apenas no rio Bacaxá com valores iguais a 0,0005 mg.L⁻¹ em ambas as coletas. Os rios Queimados, Macacos e Bacaxá, e a água potável de Jacarepaguá apresentaram valores acima do preconizado para Mn. Os níveis de Li variaram de 0,06 a 0,13 mg.L⁻¹, dentro do padrão preconizado pela legislação, enquanto a amostra da foz do rio São João apresentou valor igual a 0,48 mg.L⁻¹, entretanto, não há concentrações determinadas para este metal em águas salobras classe I (Tabela 7).

Tabela 7 - Teor de metais nas amostras de água não tratada e potável (continua)

Elemento	Ba	Cd	Cr	Cu	Hg	Mn	Li	Pb	Zn
Padrão CONAMA 357/05 classe II Águas Doces	0,70	0,001	0,05	0,009	0,0002	0,10	2,5	0,01	0,18
R. Pirai	0,08 <LQ	<LQ <LQ	<LQ <LQ	<LQ <LQ	<LQ <LQ	<LQ <LQ	0,12 0,07	<LQ <LQ	<LQ <LQ
R. Macacos	0,09 <LQ	<LQ <LQ	<LQ <LQ	<LQ <LQ	<LQ <LQ	<LQ 0,37	0,13 0,07	<LQ <LQ	<LQ <LQ
R. Queimados	0,09 0,06	0,007 <LQ	<LQ <LQ	<LQ <LQ	<LQ <LQ	<LQ 0,23	0,13 0,07	<LQ <LQ	<LQ <LQ
R. Guandu	0,06 <LQ	<LQ <LQ	<LQ <LQ	<LQ <LQ	<LQ <LQ	<LQ <LQ	0,12 0,06	<LQ <LQ	<LQ <LQ
Rep. Guandu	<LQ <LQ	<LQ <LQ	<LQ <LQ	<LQ <LQ	<LQ <LQ	<LQ <LQ	0,12 0,06	<LQ <LQ	<LQ <LQ
R. Bacaxá	0,047 0,10	<LQ <LQ	0,07 <LQ	<LQ <LQ	0,0005 0,0005	0,21 <LQ	<LQ 0,13	0,001 <LQ	<LQ <LQ
R. Capivari	0,06 0,14	<LQ <LQ	0,07 <LQ	<LQ <LQ	<LQ <LQ	0,06 <LQ	<LQ 0,12	<LQ <LQ	<LQ <LQ
R. São João	<LQ <LQ	<LQ <LQ	0,07 <LQ	<LQ <LQ	<LQ <LQ	0,03 <LQ	<LQ 0,13	<LQ <LQ	<LQ <LQ
Rep. Juturnaíba	0,02 0,06	<LQ <LQ	0,07 <LQ	<LQ <LQ	<LQ <LQ	<LQ <LQ	<LQ 0,12	<LQ <LQ	<LQ <LQ

Tabela 8 - Teor de metais nas amostras de água não tratada e potável (conclusão)

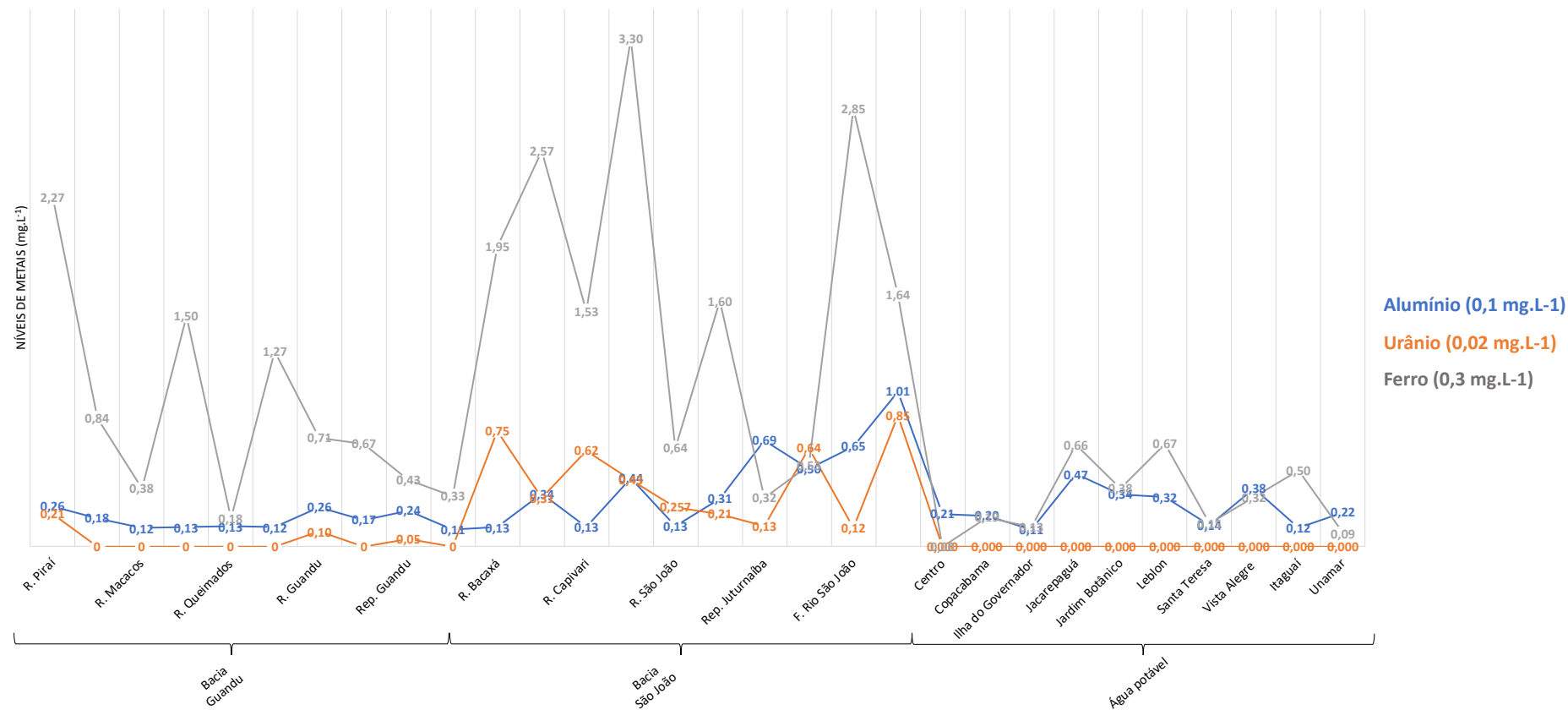
Padrão CONAMA 357/05 classe I Águas Salobras	1,0	0,005	0,05	0,005	0,0002	0,10		0,01	0,09
F. Rio São João	<LQ	<LQ	<LQ	0,06	<LQ	<LQ	0,48	<LQ	<LQ
	<LQ	<LQ	0,07	1,43	<LQ	0,05	0,12	0,001	<LQ
Portaria de consolidação nº 05/17	0,70	0,005	0,05	2,0	0,001	0,10	-	0,01	5,0
Centro	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Copacabama	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,07	<LQ	<LQ
Ilha do Governador	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Jacarepaguá	<LQ	<LQ	<LQ	0,77	<LQ	0,28	0,07	<LQ	1,23
Jardim Botânico	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,06	<LQ	<LQ	<LQ
Leblon	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,07	<LQ	<LQ
Santa Teresa	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Vista Alegre	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,08	<LQ	<LQ
Itaguaí	<LQ	<LQ	<LQ	0,06	<LQ	<LQ	0,06	<LQ	<LQ
Cabo Frio	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,12

<LQ: Abaixo do limite de quantificação; Vermelho: Fora do preconizado pela legislação.

Fonte: (CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE, 2005; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

A concentração de Al ficou no limite ou acima do preconizado pela legislação, variando de 0,11 mg.L⁻¹ na Represa Guandu (2ª coleta) 1,01 mg.L⁻¹ na foz do rio de São João (2ª coleta). Apenas as amostras de água potável de Itaguaí, Santa Teresa e Ilha do Governador apresentaram níveis dentro do limite. Os níveis de Fe apresentaram-se em sua maioria acima do limite preconizado pela legislação, com exceção do rio Queimados (1ª coleta), variando de 0,32 mg.L⁻¹ na Represa Juturbaíba a 3,3 mg.L⁻¹ no rio Capivari. As amostras de água potável Itaguaí, Jacarepaguá, Leblon, Jardim Botânico e Vista Alegre apresentaram valores acima do preconizado. Nos rios Macacos e Queimados, e nas amostras de água potável o U não foi detectado, enquanto isso, na foz do rio São João o valor de 0,12 mg.L⁻¹ foi considerado dentro do preconizado. As concentrações nas outras amostras foram acima do limite preconizado variando entre 0,05 e 0,85 mg.L⁻¹, na Represa Guandu e na foz do rio São João, respectivamente. Na amostra de água potável de Realengo não foram detectados metais traço (Figura 7).

Figura 7 - Teor de alumínio, urânio e ferro nas amostras de água não tratada e potável.



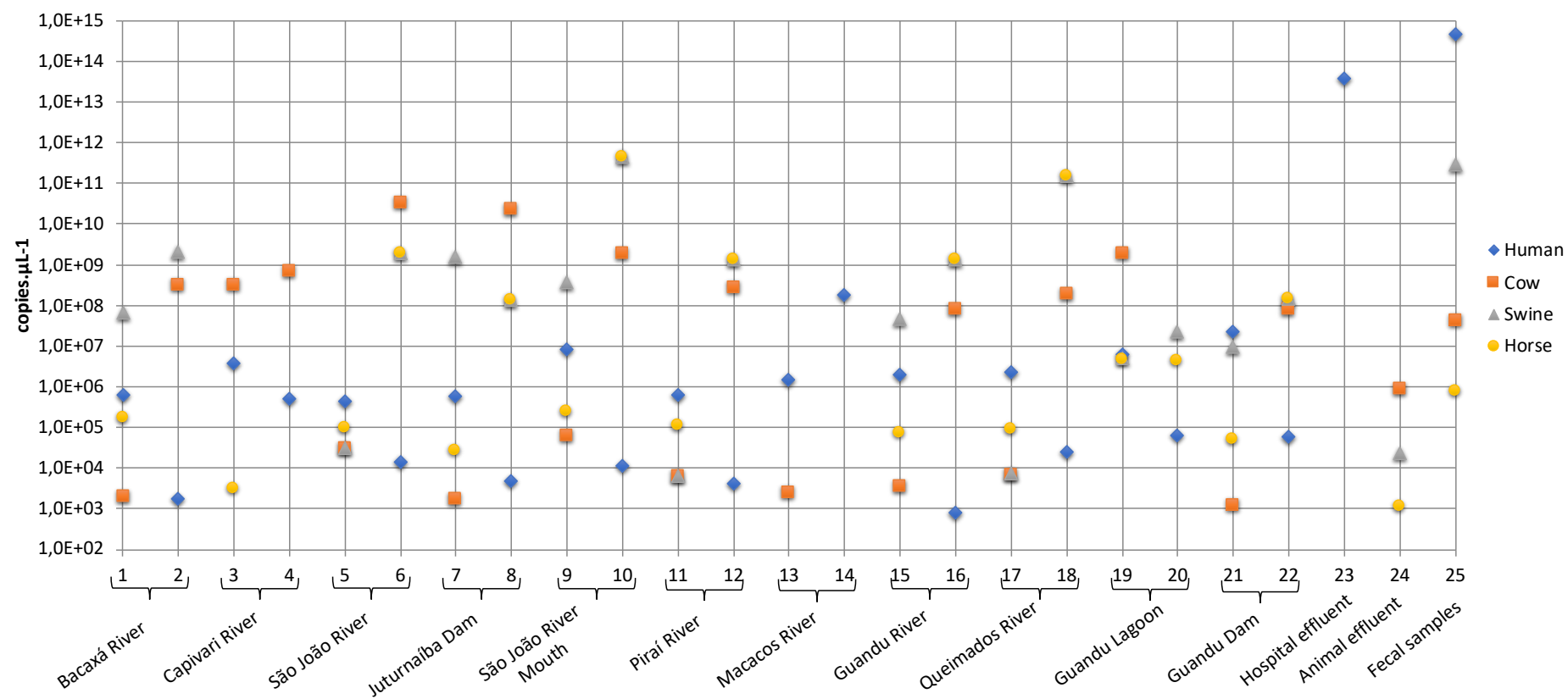
Fonte: (Do autor, 2019).

5.4 Detecção e quantificação de contaminação fecal pela qPCR

Os limites de quantificação do gene *nifH* de *Meth. smithii* e *Meth. ruminantium* foram $1,5 \times 10^3$ e $4,0 \times 10^2$ cópias. μL^{-1} , respectivamente. O gene *mcrA* de *Meth. gottschalkii* apresentou valores de $2,3 \times 10^3$ cópias. μL^{-1} e o gene *16S rRNA* de *Bacteroidales* associado a suínos foi quantificado até $1,2 \times 10^3$ cópias. μL^{-1} . O coeficiente de correlação para todos os ensaios de qPCR foi sempre maior que 0,99, com eficiências entre 98% e 109%. A inclinação das curvas variou de -3,19 a -3,37. Como esperado, o IPC indicou inibição para a maioria das amostras de água; assim, os valores foram ajustados por um fator de correção para calcular o número real de cópias. μL^{-1} de amostras. Além disso, não houve reação cruzada em amostras de efluentes hospitalares e animais.

Amostras coletadas nas bacias São João e Guandu demonstraram contaminação crônica por fezes humanas, suínas e bovinas. O gene *nifH* de *Meth. smithii* das fezes humanas apresentaram valores aproximados de $2,0 \times 10^{14}$ cópias. μL^{-1} , e foi detectado em todas as amostras de água, oscilando de $8,6 \times 10^2$ a $1,9 \times 10^8$ cópias. μL^{-1} , nos rios Guandu e Queimados, respectivamente. O gene *nifH* de *Meth. ruminantium* exibiu $4,4 \times 10^7$ cópias. μL^{-1} em fezes bovinas e em 90% (18/20) de amostras de água, variando de $1,8 \times 10^3$ cópias. μL^{-1} na Represa Juturnaíba a $3,5 \times 10^{10}$ cópias. μL^{-1} no rio São João. As fezes de suínos apresentaram $3,1 \times 10^{11}$ cópias. μL^{-1} do gene *rrs* do 16S rRNA específico para *Bacteroidales* suínos. Este marcador bacteriano foi quantificado em 90% (18/20) das amostras de água, variando de $6,5 \times 10^3$ a $4,6 \times 10^{11}$ cópias. μL^{-1} no rio Pirai e na foz do rio São João, respectivamente. O gene *mcrA* de *Meth. gottschalkii*, marcador de contaminação fecal de cavalo resultou em $7,8 \times 10^5$ cópias. μL^{-1} em fezes de cavalo e foi detectado em 85% (17/20) das amostras, variando de $2,8 \times 10^4$ cópias. μL^{-1} no rio Macacos para $4,6 \times 10^{11}$ cópias. μL^{-1} na foz do rio São João (Figura 8). Como esperado, o marcador *nifH* de *Meth. smithii* associado ao homem foi detectado no efluente hospitalar e não no efluente animal. Os genes *rrs* de *Bacteroidales* associado a suínos, *nifH* marcador de *Meth. ruminantium* e *mcrA* de *Meth. gottschalkii* foram detectados no efluente animal e não foram detectados no efluente hospitalar, confirmando a especificidade desses marcadores. Os marcadores de contaminação fecal hospedeiro-específico não foram encontrados nas amostras de água potável.

Figura 8 - Quantificação de contaminação fecal hospedeiro-específico, através de qPCR nas amostras de água não tratada e fezes dos hospedeiros-alvo.



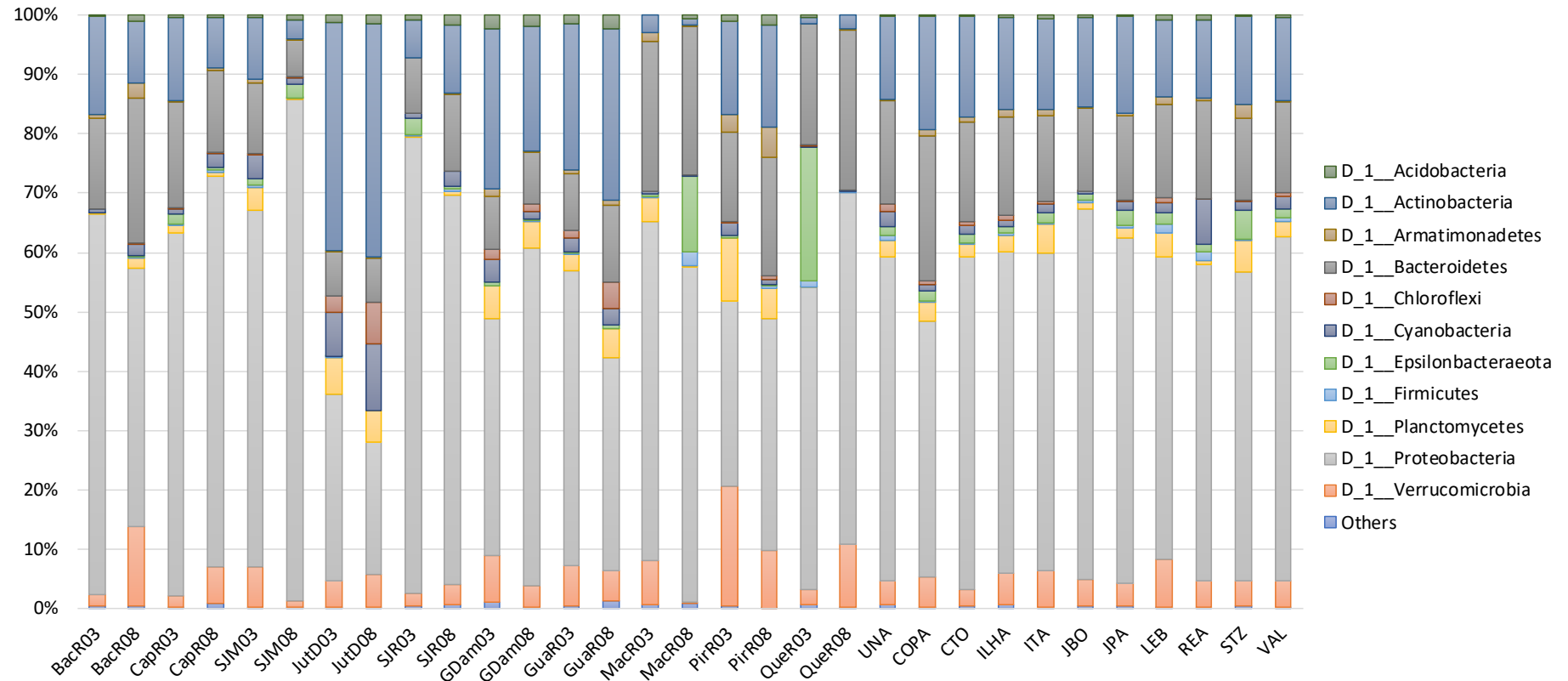
Fonte: (Do autor, 2019).

5.5 Caracterização do metagenoma dos ambientes selecionados

5.5.1 Diversidade microbiana

A análise metagenômica da comunidade microbiana revelou que os ambientes são dominados por organismos dos domínios Bacteria (92,6 a 95,9%), Archaea (0,3 a 2,6%) e microrganismos não identificados (3,4 a 5,5%). Foram observados nove filos bacterianos, sendo *Proteobacteria* predominante em 93,5% (29/31) das amostras, seguido por *Actinobacteria* e *Bacteroidetes* (Figura 9). Foram observados nove filos arqueanos, com predominância de *Euryarchaeota* e *Thaumarchaeota* em 55% (17/31) e 45% (14/31) das amostras, respectivamente (Figura 10).

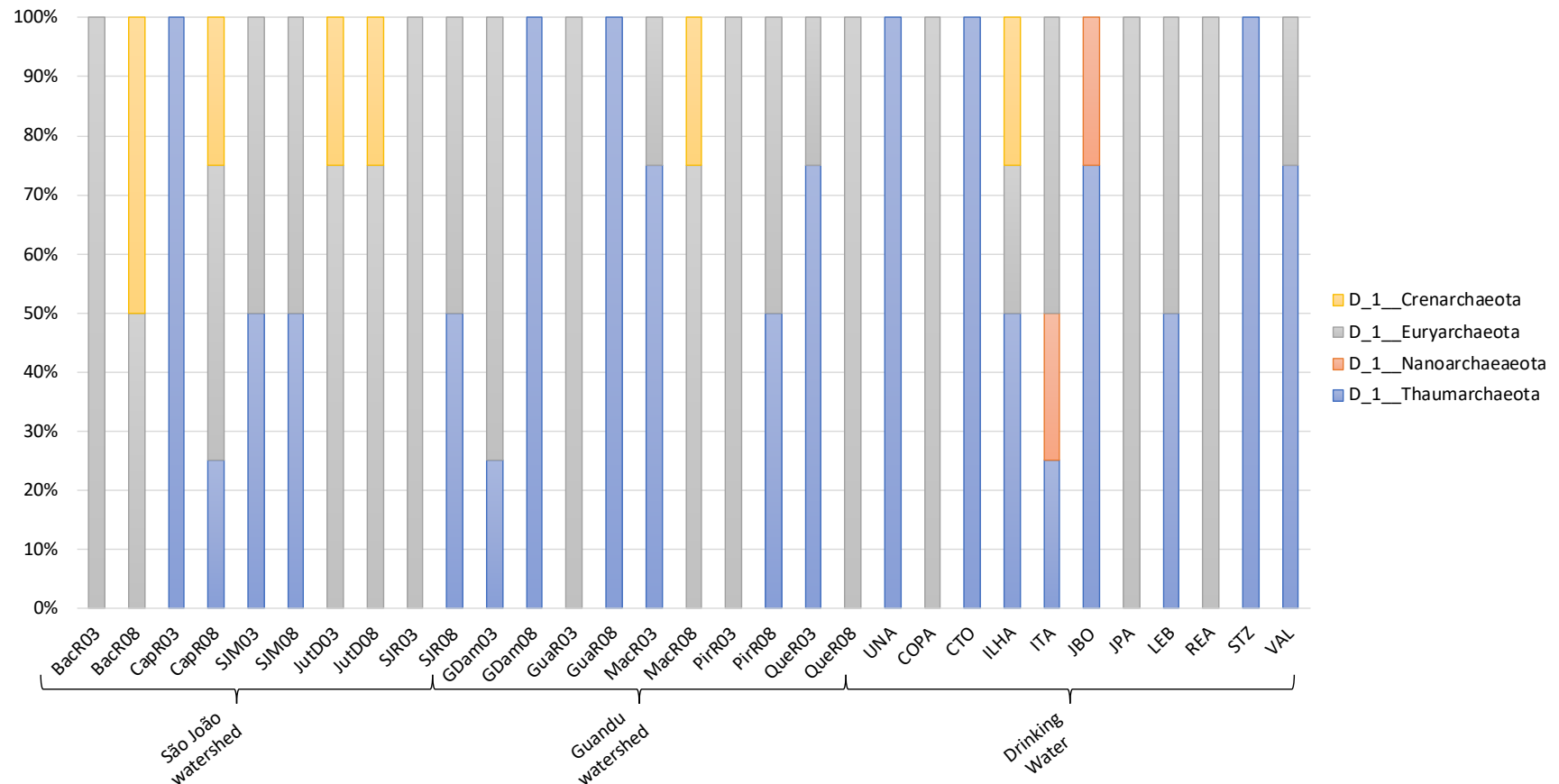
Figura 9 - Abundância relativa da composição bacteriana no nível de filo nas amostras de água não tratada e potável.



BacR03 - Rio Bacaxá Março/2015; **BacR06** - Rio Bacaxá Junho/2015; **CapR03** - Rio Capivari Março/2015; **CapR06** - Rio Capivaria Junho/2015; **SJM03** - Foz do Rio São João Março/2015; **SJM06** - Foz do Rio São João Junho/2015; **JutD03** - Represa Juturnaíba Março/2015; **JutD06** - Represa Juturnaíba Junho/2015; **SJR03** - Rio São João Março/2015; **SJR06** - Rio São João Junho/2015; **GDam03** - Represa Guandu Março/2015; **GDam06** - Represa Guandu Junho/2015; **GuaR03** - Rio Guandu Março/2015; **GuaR06** - Rio Guandu Junho/2015; **MacR03** - Rio Macacos Março/2015; **MacR06** - Rio Macacos Junho/2015; **PirR03** - Rio Pirai Março/2015; **PirR06** - Rio Pirai Junho/2015; **QueR03** - Rio Queimados Março/2015; **QueR06** - Rio Queimados Junho/2015; **UNA** - Unamar; **COPA** - Copacabana; **CTO** - Centro; **ILHA** - Ilha do Governo; **ITA** - Itaguaí; **JBO** - Jardim Botânico; **JPA** - Jacarepaguá; **LEB** - Leblon; **REA** - Realengo; **STZ** - Santa Tereza; **VAL** - Vista Alegre. Os filos microbianos foram indicados por cores diferentes, "Others" apresenta filos com abundância relativa inferior a 1%.

Fonte: (Do autor, 2019).

Figura 10 - Abundância relativa da composição arqueana no nível de filo nas amostras de águas analisadas.

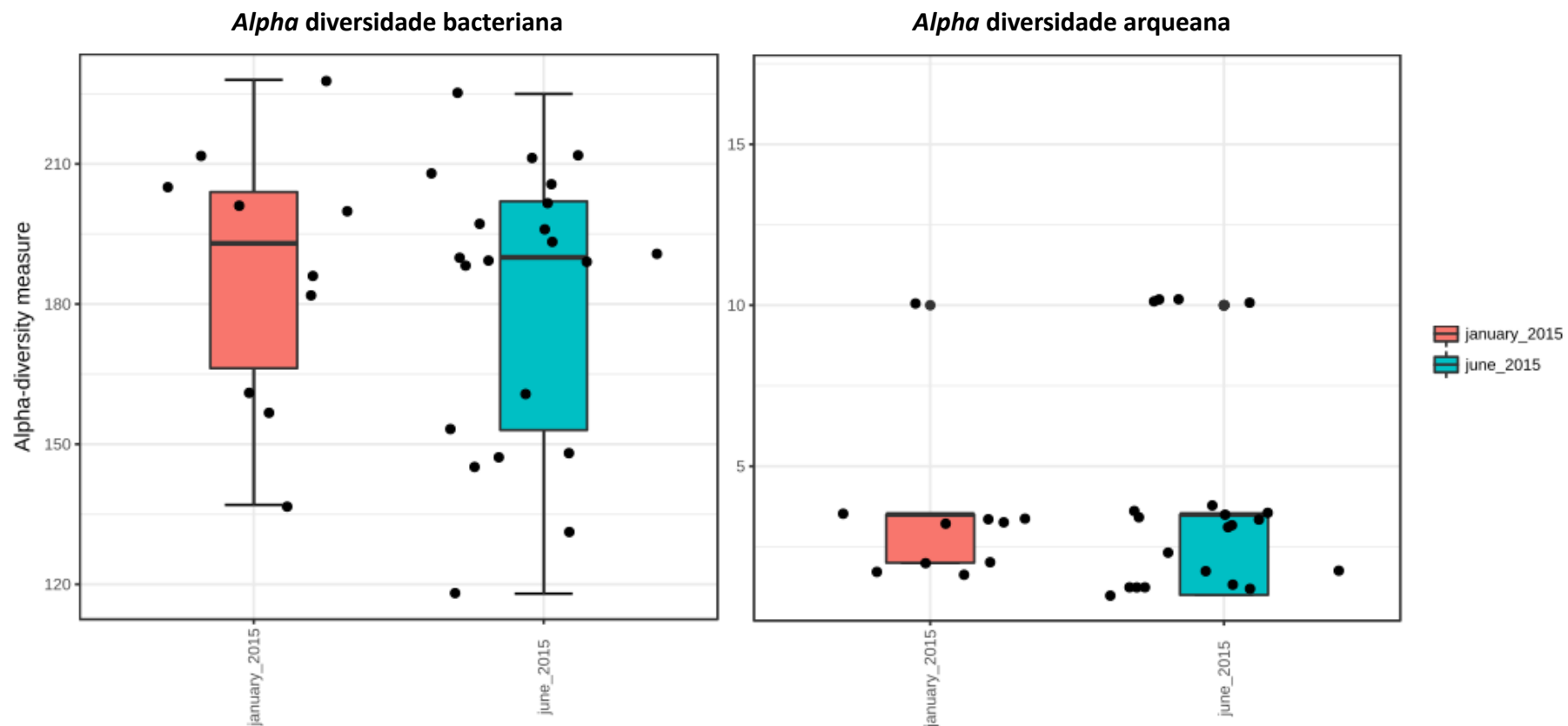


Bacr03 - Rio Bacaxá Março/2015; **Bacr06** - Rio Bacaxá Junho/2015; **CapR03** - Rio Capivari Março/2015; **CapR06** - Rio Capivaria Junho/2015; **SJM03** - Foz do Rio São João Março/2015; **SJM06** - Foz do Rio São João Junho/2015; **JutD03** - Represa Juturnaíba Março/2015; **JutD06** - Represa Juturnaíba Junho/2015; **SJR03** - Rio São João Março/2015; **SJR06** - Rio São João Junho/2015; **GDam03** - Represa Guandu Março/2015; **GDam06** - Represa Guandu Junho/2015; **GuaR03** - Rio Guandu Março/2015; **GuaR06** - Rio Guandu Junho/2015; **MacR03** - Rio Macacos Março/2015; **MacR06** - Rio Macacos Junho/2015; **PirR03** - Rio Pirai Março/2015; **PirR06** - Rio Pirai Junho/2015; **QueR03** - Rio Queimados Março/2015; **QueR06** - Rio Queimados Junho/2015; **UNA** - Unamar; **COPA** - Copacabana; **CTO** - Centro; **ILHA** - Ilha do Governo; **ITA** - Itaguaí; **JBO** - Jardim Botânico; **JPA** - Jacarepaguá; **LEB** - Leblon; **REA** - Realengo; **STZ** - Santa Tereza; **VAL** - Vista Alegre. Os filios microbianos foram indicados por cores diferentes, "Others" apresenta filios com abundância relativa inferior a 1%.

Fonte: (Do autor, 2019).

Não foram observadas diferenças significantes ($p > 0,05$) na *alpha* diversidade das comunidades microbianas em relação a sazonalidade da coleta das amostras (Figura 11). Sendo assim, as amostras foram agrupadas em São João *watershed*, Guandu *watershed* e *Drinking water*.

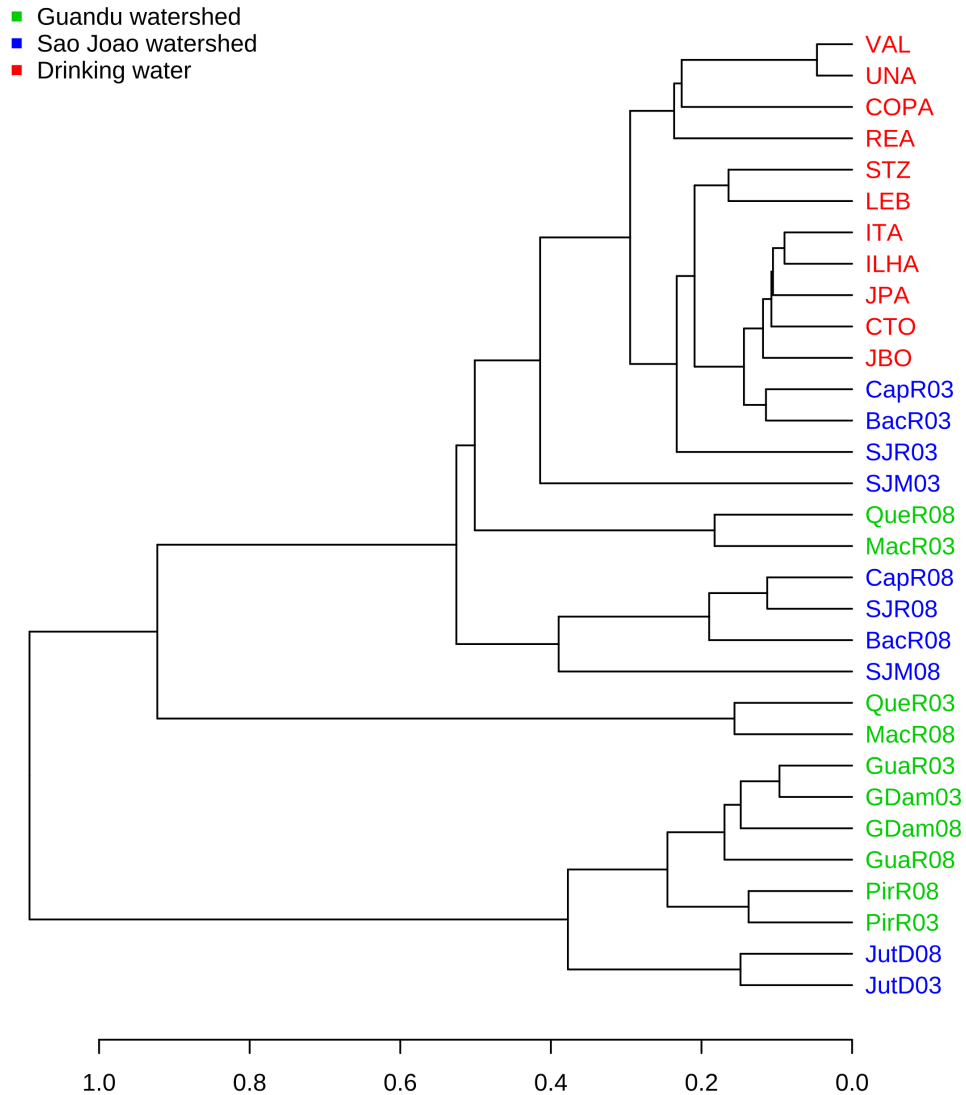
Figura 11 - Comparação da *alpha* diversidade de *Operational taxonomic unit* (OTUs) entre as coletas de amostras de água não tratada. Análise de cobertura de *Chao1*.



Fonte: (Do autor, 2019).

O método de agrupamento ponderado foi utilizado para calcular a similaridade ou dissimilaridade das sequências obtidas entre diferentes amostras. Com base na abundância de *Operational taxonomic unit* (OTUs), as comunidades bacterianas das 31 amostras puderam ser agrupadas em cinco grandes grupos. As amostras de água potável apresentaram comunidades bacterianas mais similares, formando um agrupamento bem evidente no dendrograma. Nota-se a alta similaridade (>90%) entre as amostras VAL (Vista Alegre) e UNA (Unamar) (Figura 12).

Figura 12 - Dendrograma de similaridade das comunidades bacterianas nas amostras de água analisadas. Agrupamento realizado utilizando a matriz de distância *Jensen-Shannon Divergence*, *strains/OTU-levels* e algoritmo de clusterização *Ward*. Os grupos de amostras foram indicados por cores diferentes.

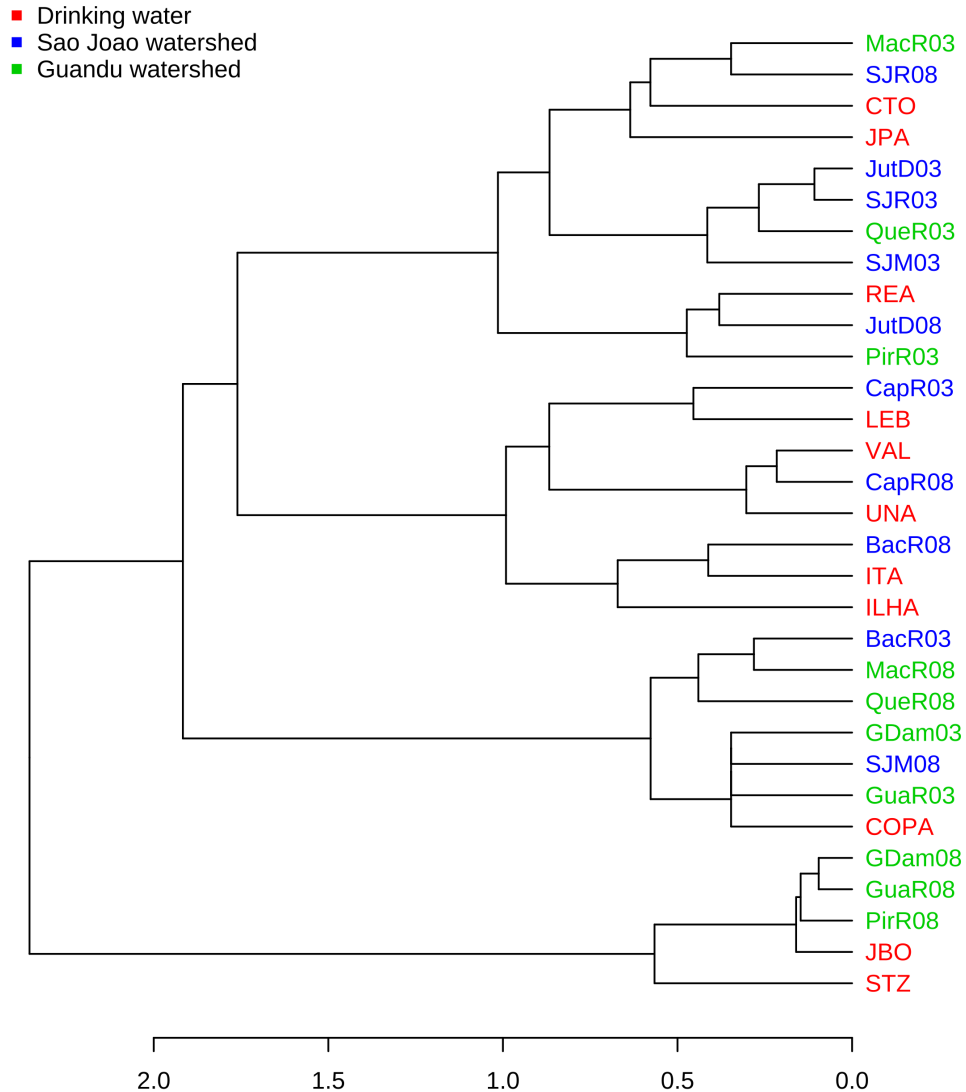


BacR03 - Rio Bacaxá Março/2015; **BacR06** - Rio Bacaxá Junho/2015; **CapR03** - Rio Capivari Março/2015; **CapR06** - Rio Capivaria Junho/2015; **SJM03** - Foz do Rio São João Março/2015; **SJM06** - Foz do Rio São João Junho/2015; **JutD03** - Represa Juturnaíba Março/2015; **JutD06** - Represa Juturnaíba Junho/2015; **SJR03** - Rio São João Março/2015; **SJR06** - Rio São João Junho/2015; **GDam03** - Represa Guandu Março/2015; **GDam06** - Represa Guandu Junho/2015; **GuaR03** - Rio Guandu Março/2015; **GuaR06** - Rio Guandu Junho/2015; **MacR03** - Rio Macacos Março/2015; **MacR06** - Rio Macacos Junho/2015; **PirR03** - Rio Pirai Março/2015; **PirR06** - Rio Pirai Junho/2015; **QueR03** - Rio Queimados Março/2015; **QueiR06** - Rio Queimados Junho/2015; **UNA** - Unamar; **COPA** - Copacabana; **CTO** - Centro; **ILHA** - Ilha do Governo; **ITA** - Itaguaí; **JBO** - Jardim Botânico; **JPA** - Jacarepaguá; **LEB** - Leblon; **REA** - Realengo; **STZ** - Santa Tereza; **VAL** - Vista Alegre.

Fonte: (Do autor, 2019).

Com base na abundância de OTUs, as comunidades arqueanas das 31 amostras puderam ser agrupadas em seis grandes grupos (Figura 13).

Figura 13 - Dendrograma de similaridade das comunidades arqueanas nas amostras de água analisadas. Agrupamento realizado utilizando a matriz de distância *Jensen-Shannon Divergence*, *strains/OTU-levels* e algoritmo de clusterização *Ward*. Os grupos de amostras foram por cores diferentes.

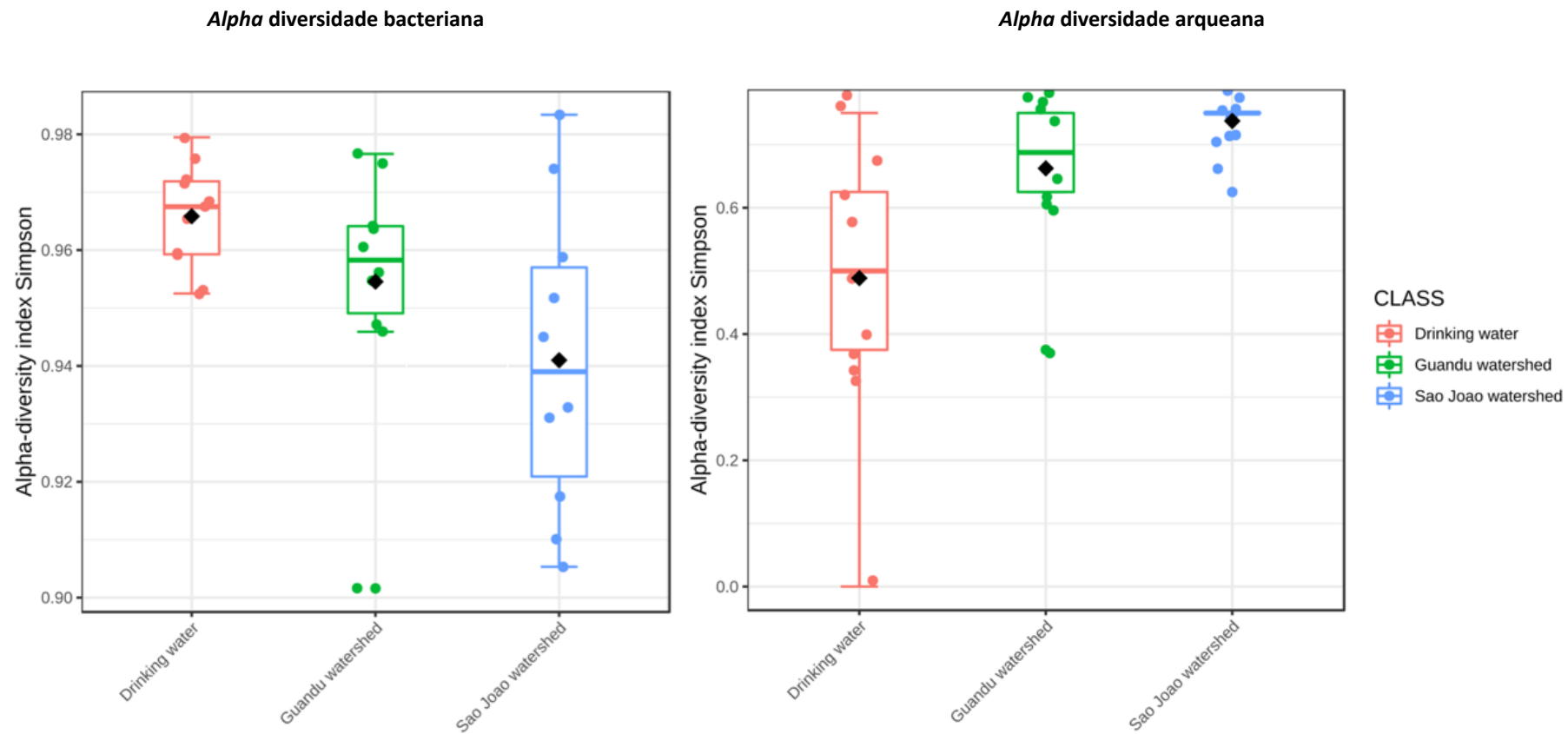


BacR03 - Rio Bacaxá Março/2015; **BacR06** - Rio Bacaxá Junho/2015; **CapR03** - Rio Capivari Março/2015; **CapR06** - Rio Capivari Junho/2015; **SJM03** - Foz do Rio São João Março/2015; **SJM06** - Foz do Rio São João Junho/2015; **JutD03** - Represa Juturnaíba Março/2015; **JutD06** - Represa Juturnaíba Junho/2015; **SJR03** - Rio São João Março/2015; **SJR06** - Rio São João Junho/2015; **GDam03** - Represa Guandu Março/2015; **GDam06** - Represa Guandu Junho/2015; **GuaR03** - Rio Guandu Março/2015; **GuaR06** - Rio Guandu Junho/2015; **MacR03** - Rio Macacos Março/2015; **MacR06** - Rio Macacos Junho/2015; **PirR03** - Rio Pirai Março/2015; **PirR06** - Rio Pirai Junho/2015; **QueR03** - Rio Queimados Março/2015; **QueiR06** - Rio Queimados Junho/2015; **UNA** - Unamar;

COPA - Copacabana; **CTO** - Centro; **ILHA** - Ilha do Governo; **ITA** - Itaguai; **JBO** - Jardim Botânico; **JPA** - Jacarepaguá; **LEB** - Leblon; **REA** - Realengo; **STZ** - Santa Tereza; **VAL** - Vista Alegre.
Fonte: (Do autor, 2019).

O efeito do tipo de amostra na *alpha* diversidade bacteriana foi avaliado com base na riqueza de OTUs (com base no número absoluto de taxa), diversidade e uniformidade. As comunidades bacterianas das amostras de água potável apresentaram menor diversidade, em relação as amostras de água não tratadas das bacias ($p < 0,02$). As comunidades arqueanas das amostras de água potável e não tratadas da bacia do São João foram mais homogêneas. Assim como nas comunidades bacterianas, as comunidades arqueanas foram reduzidas nas amostras de água potável ($p < 0,002$) (Figura 14).

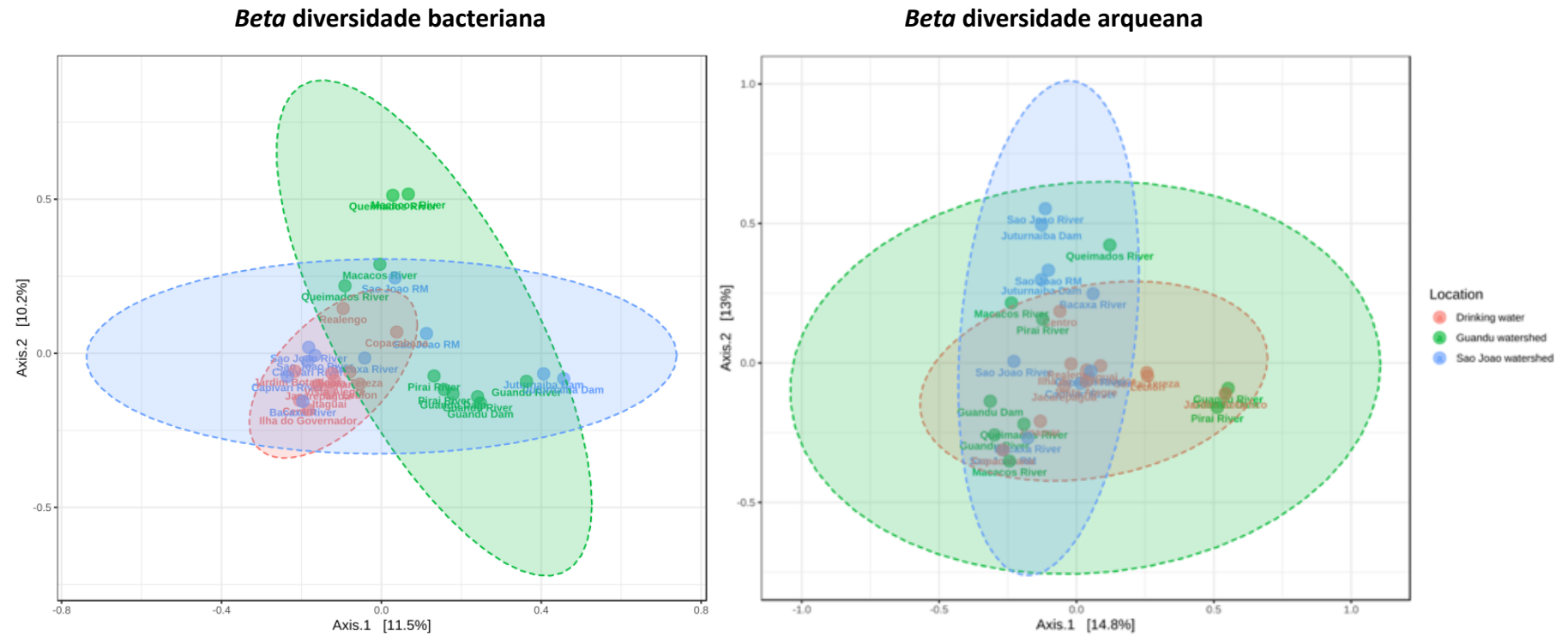
Figura 14 - Comparação da *alpha* diversidade de OTUs bacterianas e arqueanas entre as amostras de água analisadas. Análise de cobertura de *Simpson*. Mediana (linha contínua) e amostras (círculos).



Fonte: (Do autor, 2019).

As amostras apresentaram variações significativas ($p < 0,001$) em relação a *Beta* diversidade das comunidades bacterianas. Enquanto isso, as amostras não apresentaram variações significativas ($p < 0,103$) em relação a *Beta* diversidade das comunidades arqueas (Figura 15).

Figura 15 - Análise de coordenadas principais (PCoA) entre comunidades bacterianas e arqueanas presentes na bacia do Guandu (verde), na bacia do São João (azuis) e na água potável (vermelho).

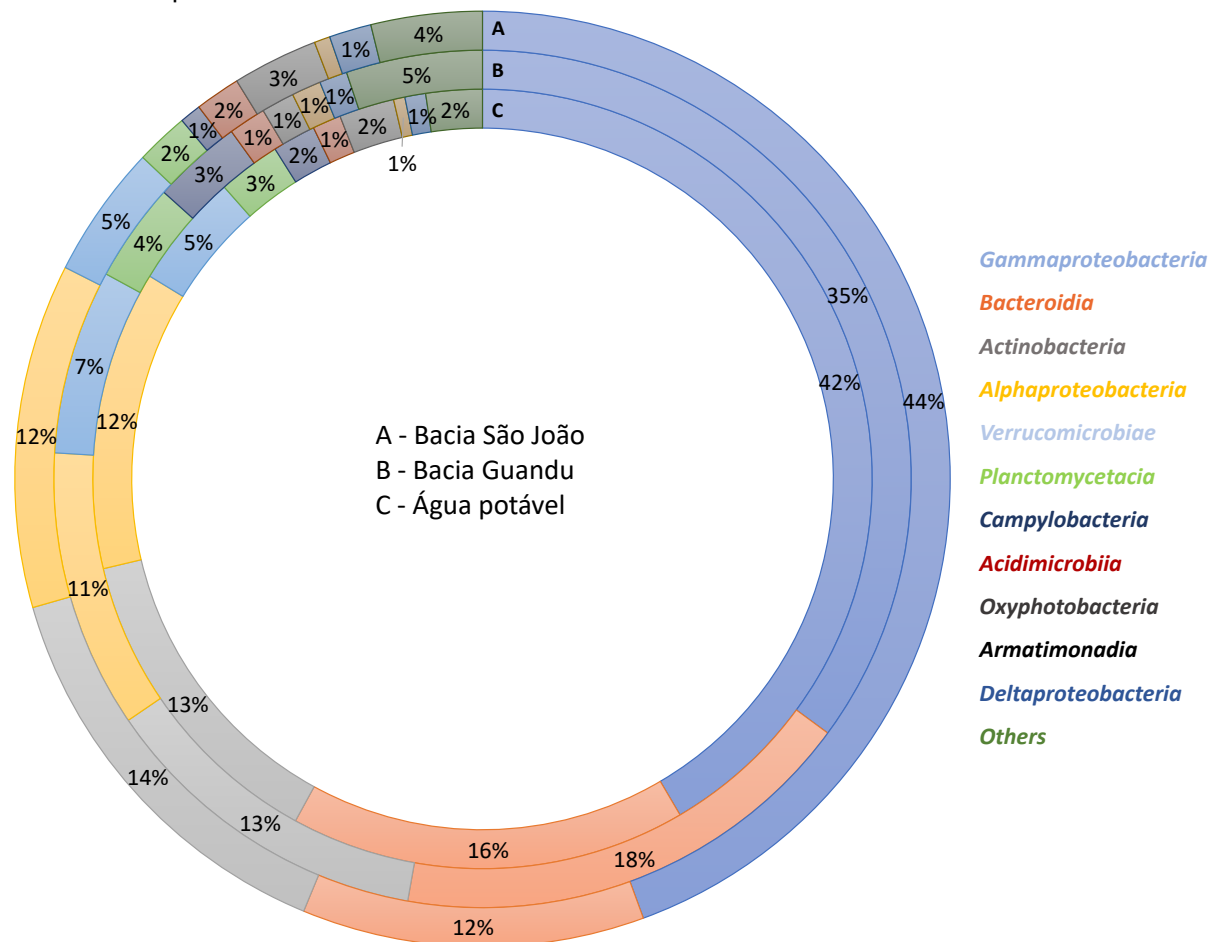


Matriz de distância construída a partir do método de Jaccard com PERMANOVA e utilizando as OTUs bacterianas.

Fonte: (Do autor, 2019).

Dentro do filo *Proteobacteria*, a classe predominante foi *Gammaproteobacteria* (36 a 46%), seguida de *Alphaproteobacteria* (11 a 13%). No filo *Bacteroidetes* a classe *Bacteroidia* foi a mais abundante (12 a 17%). No filo *Actinobacteria* a classe *Actinobacteria* foi a mais abundante (12 a 14%) (Figura 16).

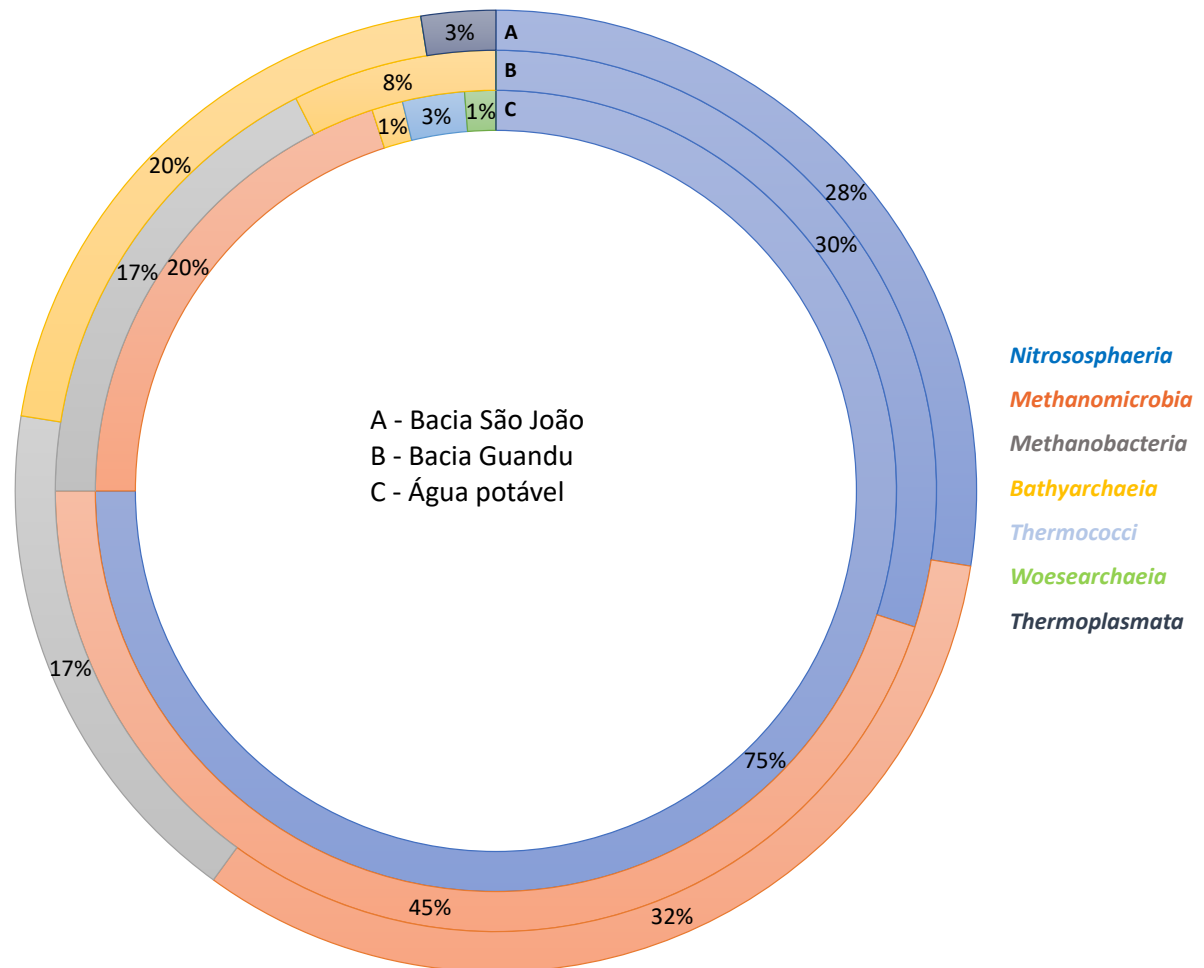
Figura 16 - Abundância relativa da composição bacteriana no nível de classe nas amostras de água não tratada e potável.



Fonte: (Do autor, 2019).

A diversidade arqueana foi muito menor comparada à bacteriana. As amostras de água potável apresentaram predominância de membros da classe *Nitrososphaeria*, pertencente ao filo *Thaumarchaeota*. As outras amostras apresentaram predominância da classe *Methanomicrobia* (28% São João; 30% Guandu), do filo *Euryarchaeota*. A classe *Methanobacteria* não foi observada nas amostras de água potável (Figura 17).

Figura 17 - Abundância relativa da composição arqueana a nível de classe nas amostras de água não tratada e potável.



Fonte: (Do autor, 2019).

5.5.2 Plasmidoma

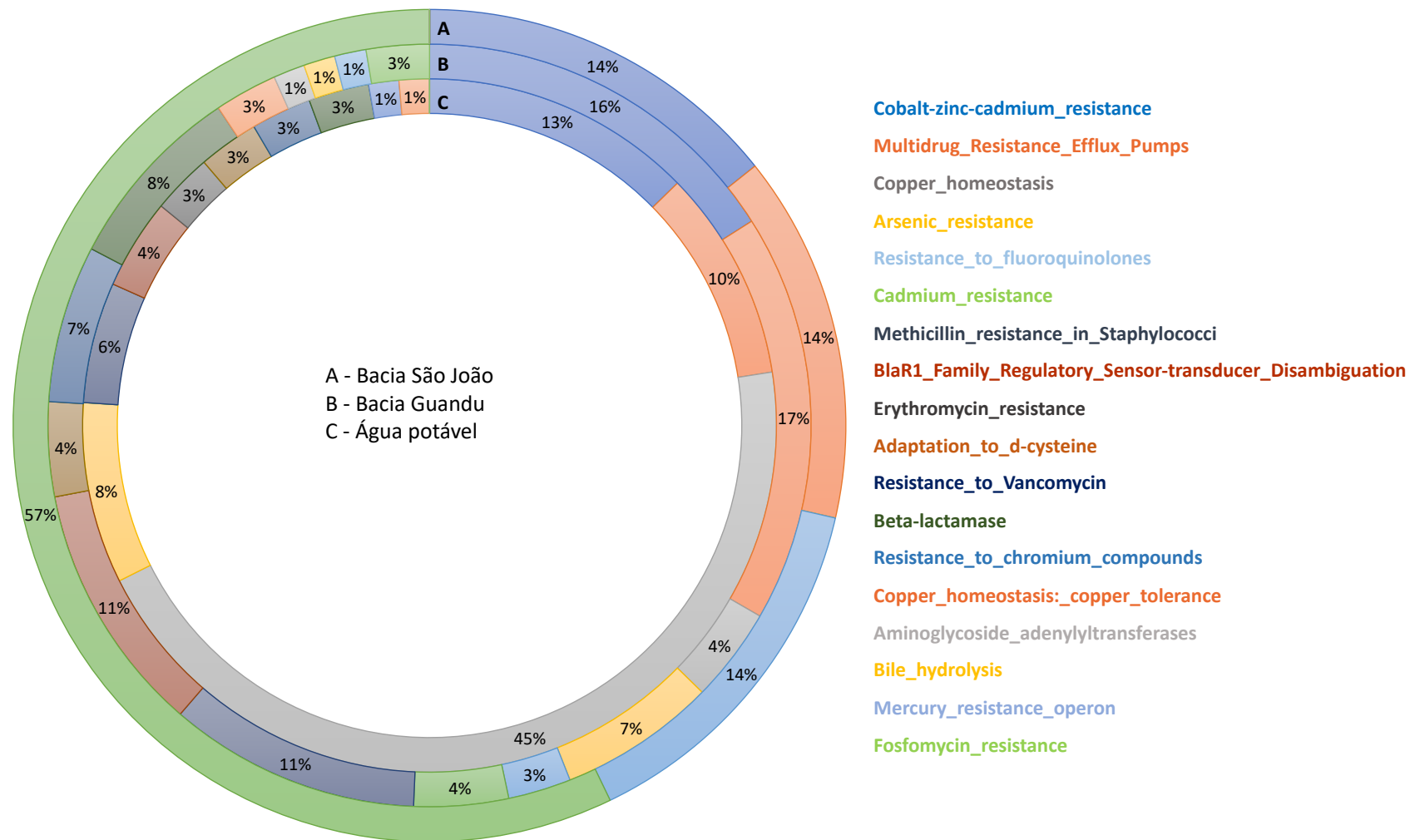
As 10 amostras da bacia São João, 10 da bacia Guandu e 11 de água potável foram reunidas em três grupos, respectivamente. Esses grupos foram designados em São João *watershed* (A), Guandu *watershed* (B) e *Drinking water* (C). Dezoito subsistemas distintos, contendo genes atribuídos à resistência e adaptação aos antimicrobianos, metais e outras poluentes ambientais, foram distribuídos entre todas as amostras, conforme análises do banco de dados do MG-RAST. Enquanto a bacia do Guandu apresentou maior diversidade de subsistemas ($n = 16$), o São João exibiu a menor diversidade ($n = 4$) e amostras de água potável revelaram 12 subsistemas.

Cinquenta e sete por cento de sequências do São João *watershed* e 4% das sequências do Guandu foram atribuídas a *Cadmium_resistance*; esse sistema não foi encontrado nas amostras de água potável. O subsistema *Cobalt-zinc-cadmium_resistance*, incluindo sistemas de efluxo de zinco, cobalto e cádmio codificados, principalmente, pelo gene *cusA* e pelo *operon czc*, foi encontrado em 14% das sequências de São João *watershed*, 16% Guandu *watershed* e 13% *Drinking water*.

Também foi revelada a presença de determinantes genéticos do subsistema *Multidrug_Resistance_Efflux_Pumps* nos três grupos de amostras (14% São João *watershed*, 17% Guandu *watershed*, 10% *Drinking water*) majoritariamente composto por membros da família de bombas de efluxo multi-antimicrobiana *Multidrug And Toxic compound Extrusion* (MATE) nas amostras São João e Guandu *watersheds* (>90%). Enquanto no grupo *Drinking water* foram encontradas a família MATE (37,5%); a superfamília bombas de efluxo de resistência-nodulação-divisão celular (RND) codificada pelo gene *cmeA* (12,5%); e o sistema de efluxo de macrolídeos *macA/macB* (25%).

Foi verificada a presença do subsistema *Resistance_to_fluoroquinolones*, associado a mutações nos genes *gyrA* e *gyrB*, encontrado em maior abundância na São João *watershed* (14%) seguido do Guandu *watershed* (3%), e ausente no grupo *Drinking water* (Figura 18).

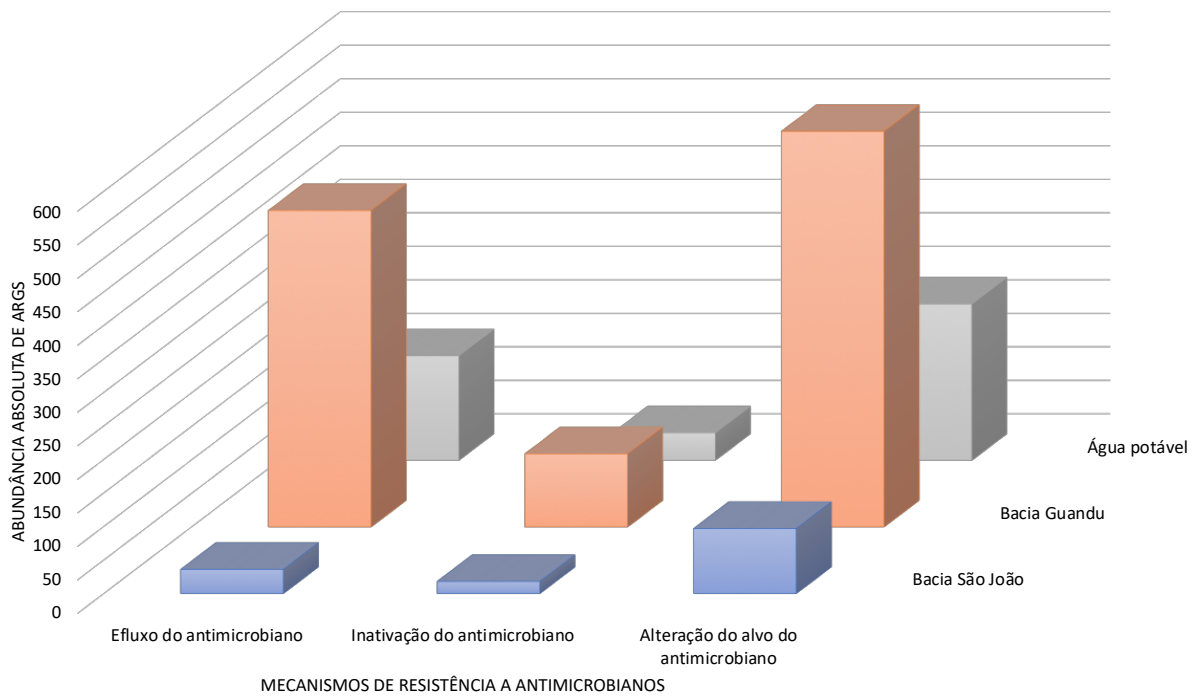
Figura 18 - Abundância relativa das sequências relacionadas aos subsistemas de resistência aos antimicrobianos e compostos tóxicos nas amostras de água não tratada e potável.



Fonte: (Do autor, 2019).

Através do bando de dados CARD foram anotadas 1171 sequências de resistência a antimicrobianos no grupo da bacia Guandu, 151 da bacia São João e 430 no grupo de água potável (Figura 19).

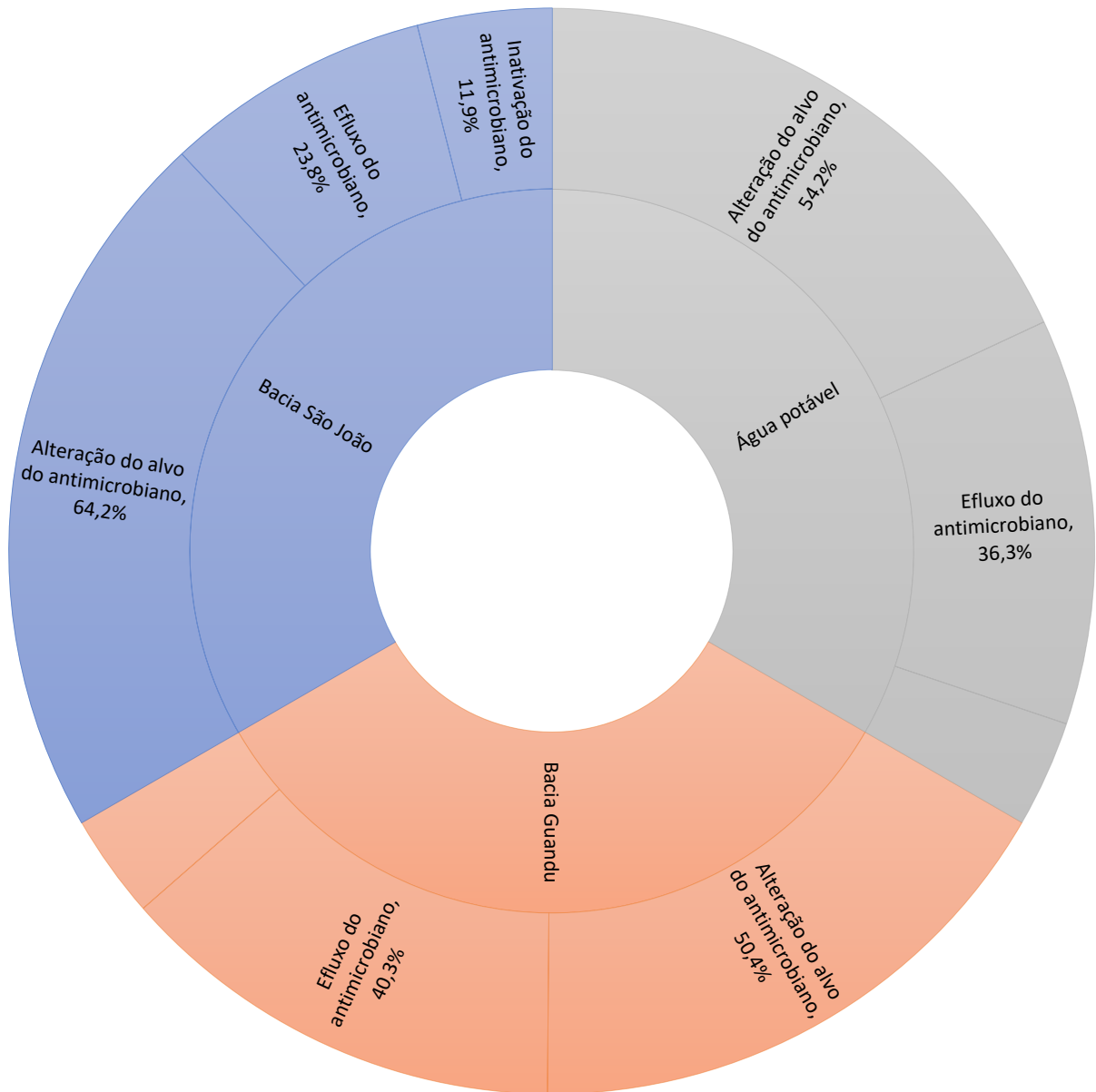
Figura 19 - Abundância absoluta de ARGs em relação aos mecanismos de resistência, nos três grupos de amostras.



Fonte: (Do autor, 2019).

Esta análise revelou a prevalência de três tipos de mecanismos de resistência: alteração do sitio alvo, efluxo e inativação de antimicrobiano, distribuídos uniformemente entre as amostras (Figura 20).

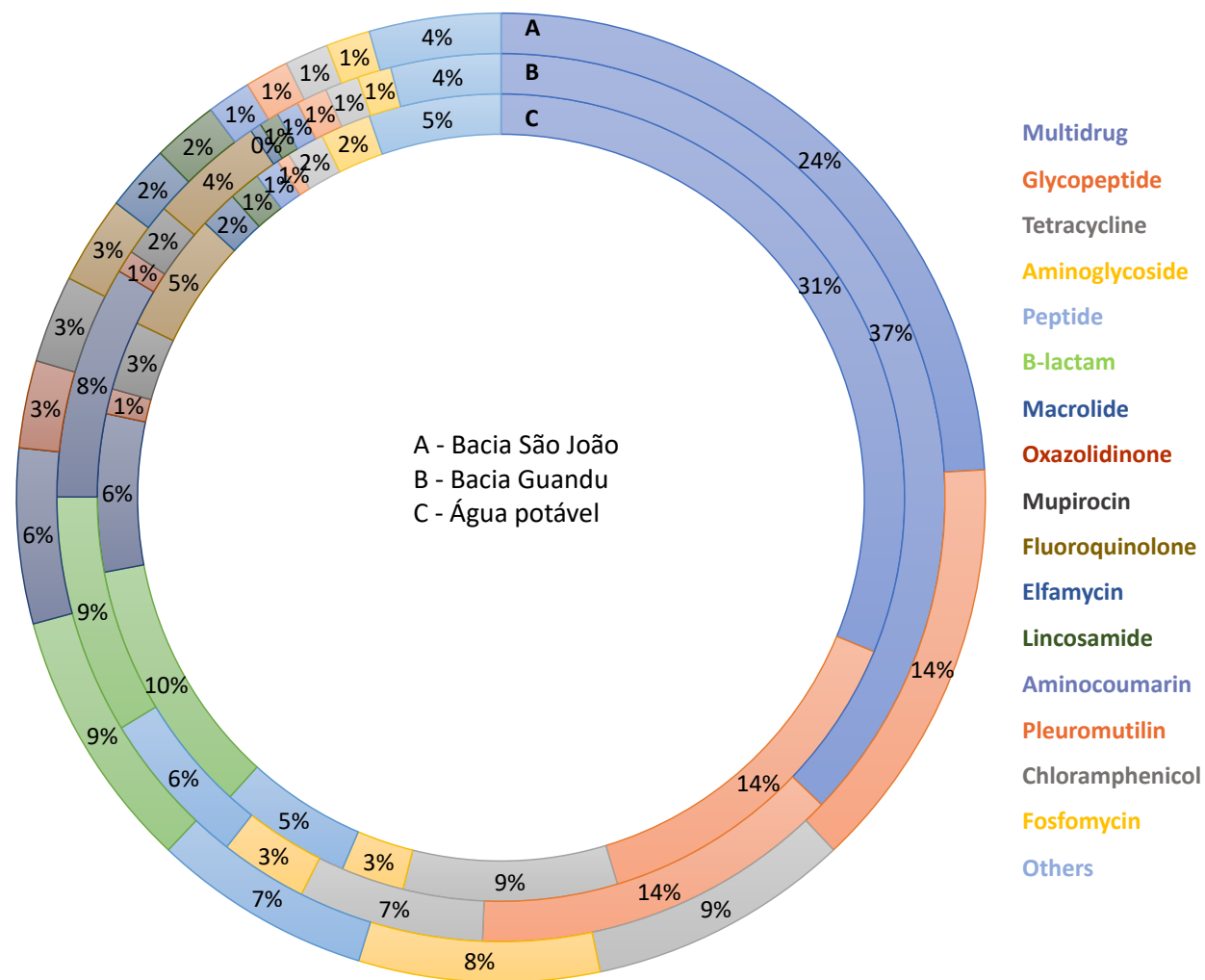
Figura 20 - Abundância relativa de ARGs em relação aos mecanismos de resistência, nos três grupos de amostras.



Fonte: (Do autor, 2019).

Em geral, os ARGs presentes nos grupos podem codificar muitos tipos de proteínas e enzimas capazes de conferir resistência a antimicrobianos (11 tipos). Genes de resistência a múltiplos antimicrobianos foram prevalentes em todas as amostras (33% São João, 47% Guandú, e 39% drinking water). Seguidos de genes de resistência a glicopeptídeos, macrolídeos, β -lactâmicos, tetraciclina e peptídeos (Figura 21).

Figura 21 - Abundância relativa de ARGs em relação as classes de antimicrobianos, nos três grupos de amostras.



As classes de genes foram indicadas por cores diferentes, "Others" apresenta classes com abundância relativa inferior a 1%.
Fonte: (Do autor, 2019).

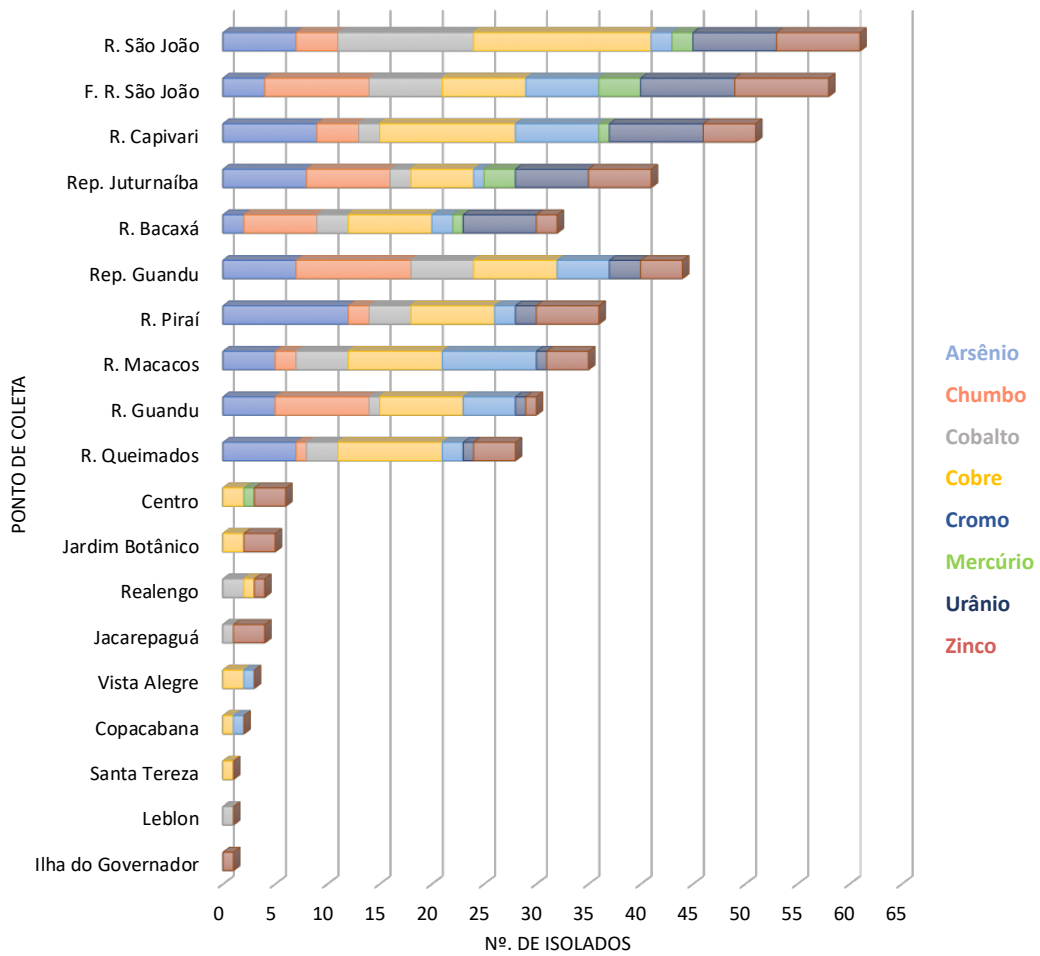
Foram identificados 295 diferentes ARGs no grupo de amostras do Guandu, 103 no São João e 197 na água potável. Os genes mais abundantes tanto nas bacias quanto na água potável foram *evgS* e *evgA*, ambos associados a sistemas de efluxo.

Vale destacar a presença de genes que codificam enzimas metalo- β -lactamases (CAU-1; CPS-1; FEZ-1; GOB-18; LRA-8, 12 e 17; IMP-12; SPG-1; SBM-1 (Guandu); FEZ-1; LRA-17 (São João); AIM-1; BJP-1; LRA-2, 8 e 12; MSI-1 (água potável)), carbapenemases (ESP-1; PEDO-1 e 2; SHV-96 (Guandu)), e que conferem resistência a polimixina (MCR-4 (água potável)), considerados, atualmente, um sério problema de saúde pública. A listam completa de genes foi incluída no Apendice A.

5.6 Isolamento e identificação de microrganismos tolerantes a metais traço

Foram obtidos 443 isolados, destes 15% (66/443) provenientes de meios acrescidos de As, 11% (50/443) de Co, 10% (45/443) de Cr, 23% (104/443) de Cu, 3% (12/443) de Hg, 13% (58/443) de Pb, 11% (48/443) de U e 14% (60/443) de Zn (Figura 22).

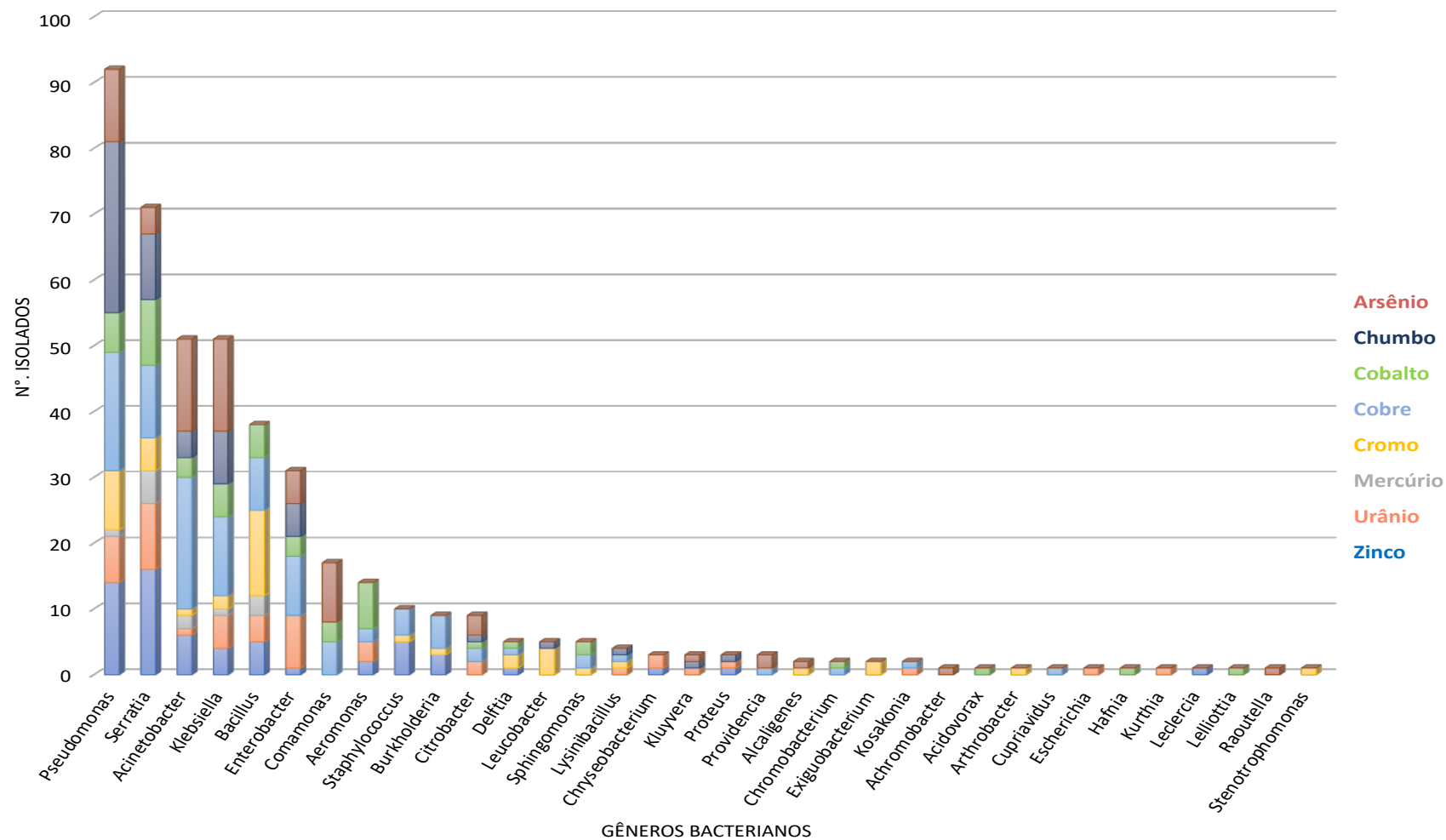
Figura 22 - Número de isolados em relação ao metal e local de coleta de água.



Fonte: (Do autor, 2019).

Nota-se que a bacia do São João apresentou o maior número de isolados tolerantes a metais pesados. Os microrganismos isolados foram identificados com base no sequenciamento do gene *rrs* do 16S rRNA, foi possível identificar até espécie ou somente em gênero (Figura 23).

Figura 23 - Gêneros bacterianos identificados em águas em relação aos metais utilizados no isolamento.



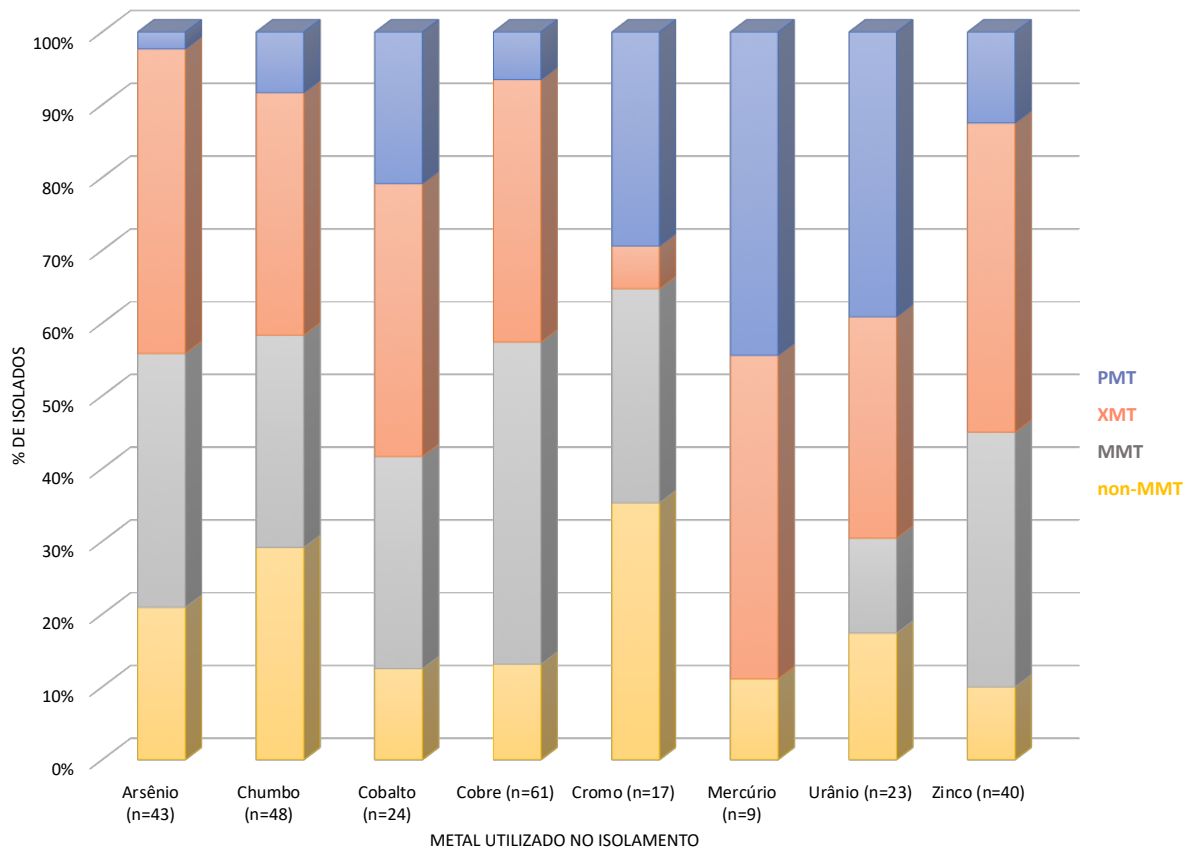
Fonte: (Do autor, 2019).

Após a identificação, quatro gêneros bacterianos, *Pseudomonas* spp., *Serratia* spp., *Acinetobacter* spp. e *Klebsiella* spp. foram selecionados para a determinação do perfil de susceptibilidade aos metais traço e antimicrobianos.

5.7 Determinação do perfil de susceptibilidade aos metais traço

Foram avaliados os perfis de susceptibilidade aos metais traço (As, Co, Cr, Cu, Hg, Pb, U, Zn) de 261 isolados (88 *Pseudomonas* spp., 71 *Serratia* spp., 51 *Acinetobacter* spp. e 51 *Klebsiella* spp.) recuperados de águas não tratadas e quatro isolados de *Pseudomonas* spp. recuperados de água potável. O perfil non-MMT foi encontrado em todos os metais (As 21%; Co 13%; Cr 35%; Cu 13%; Hg 11%; Pb 29%; U 17% e Zn 10% dos isolados). O perfil MMT foi observado em sete metais com exceção do mercúrio (As 35%; Co 29%; Cr 29%; Cu 44%; Pb 29%; U 13% e Zn 35%). O perfil XMT (As 42%; Co 38%; Cr 6%; Cu 36%; Hg 44%; Pb 33%; U 30% e Zn 43%). O perfil PMT foi observado em isolados recuperados de todos os metais (As 2%; Co 21%; Cr 29%; Cu 7%; Hg 44%; Pb 8%; U 39% e Zn 13%) (Figura 24).

Figura 24 - Perfil de susceptibilidade aos metais traço dos isolados em relação ao metal utilizado no isolamento.

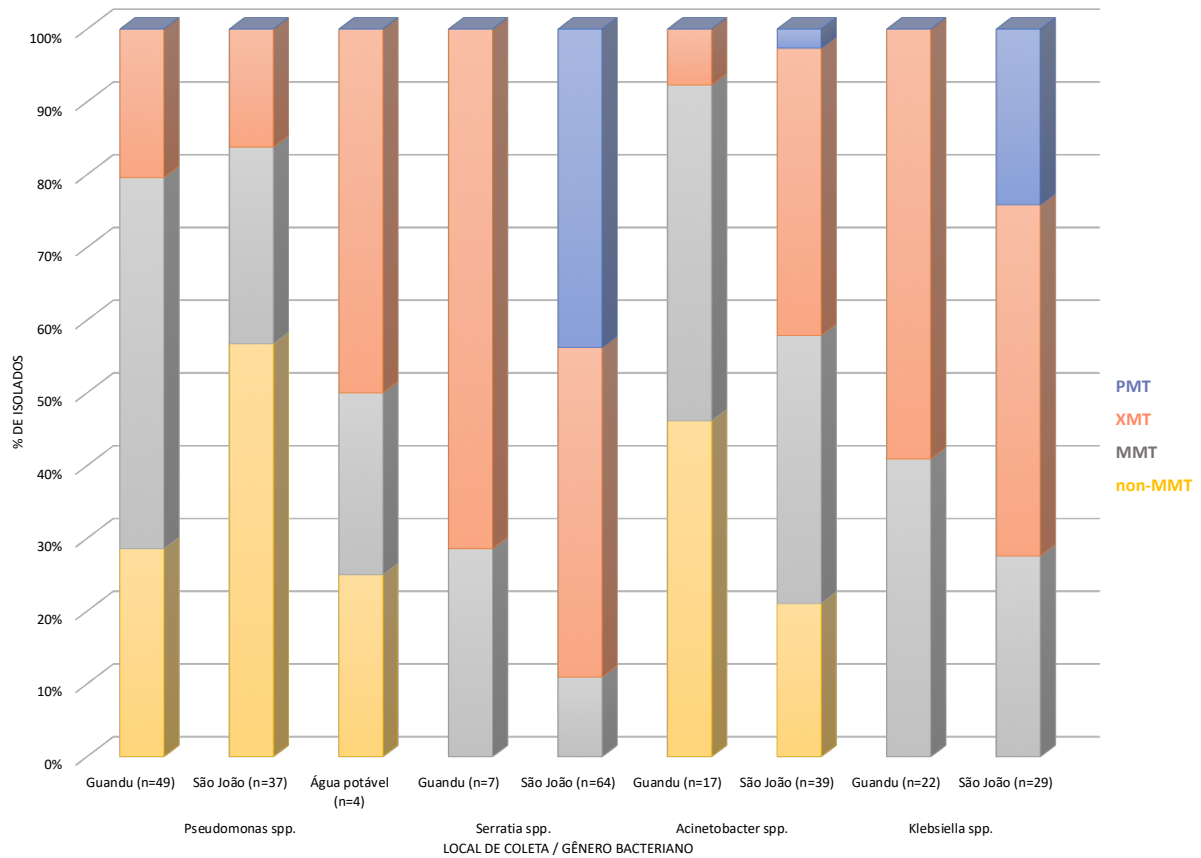


Fonte: (Do autor, 2019).

Os perfis de susceptibilidade aos metais traço foram correlacionados as bacias estudadas, 25% (1/4) dos isolados de água potável, 22% (20/91) da bacia do Guandu e 16% (28/170) da bacia do São João apresentaram perfil non-MMT. O perfil MMT foi encontrado em 46% (42/91) e 25% (46/170) nas bacias do Guandu e São João, respectivamente. Trinta e dois por cento (29/91) dos isolados da Bacia do Guandu e 37% (63/170) da bacia São João apresentaram perfil XMT. O perfil PMT foi observado apenas em isolados da bacia do São João (22% 37/170).

Em relação ao gênero bacteriano, 39% (28/71) dos isolados de *Serratia* spp., 14% (7/51) de *Klebsiella* spp., 2% (1/51) de *Acinetobacter* spp. e 1% (1/92) *Pseudomonas* spp. apresentaram perfil PMT. Enquanto isso, 38% (35/92) dos isolados de *Pseudomonas* spp. e 27% (14/51) de *Acinetobacter* spp. apresentaram perfil non-MMT, entretanto, *Serratia* spp. e *Klebsiella* spp. não apresentaram esse perfil. O perfil XMT foi mais prevalente em isolados de *Serratia* spp. (71% 5/7) e *Klebsiella* spp. (59% 13/22) isolados da bacia do Guandu (Figura 25).

Figura 25 - Perfil de tolerância dos gêneros bacterianos isolados frente aos metais traço em relação ao local de isolamento.

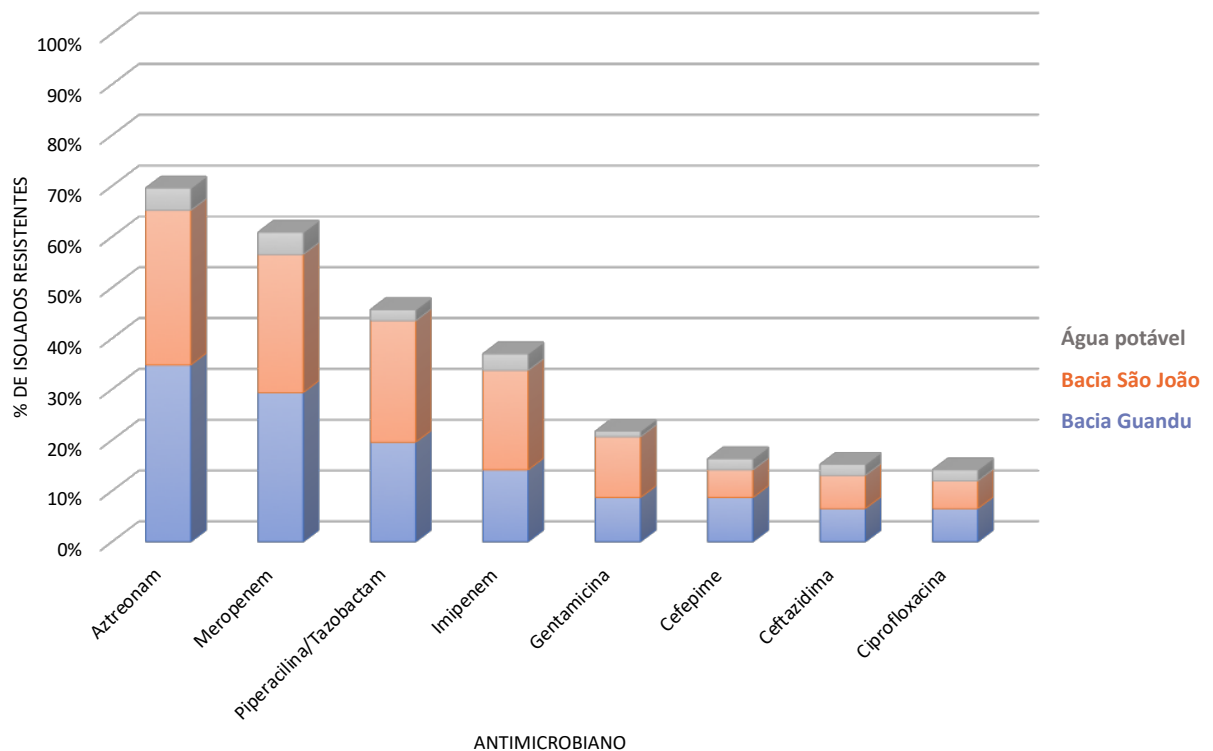


Fonte: (Do autor, 2019).

5.8 Determinação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos

Após a determinação do perfil de susceptibilidade aos metais traço foram determinados os perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados. Os 92 isolados de *Pseudomonas* spp. apresentaram maior percentual de resistência ao aztreonam (70%, 64/92) seguido por meropenem (61%, 56/92), piperacilina/tazobactam (46%, 42/92), imipenem (37%, 34/92), gentamicina (22%, 29/92), cefepime (16%, 15/92), ceftazidima (15%, 14/92) e ciprofloxacina (14%, 13/92). Onze (12%) isolados apresentaram fenótipo de produtores de ESBL, 56 (61%) de KPC e 12 (13%) de MBL (Figura 26). Vale destacar que *Pseudomonas* spp. foi o único gênero bacteriano isolado tanto de amostras de água não tratada quanto nas amostras de água potável.

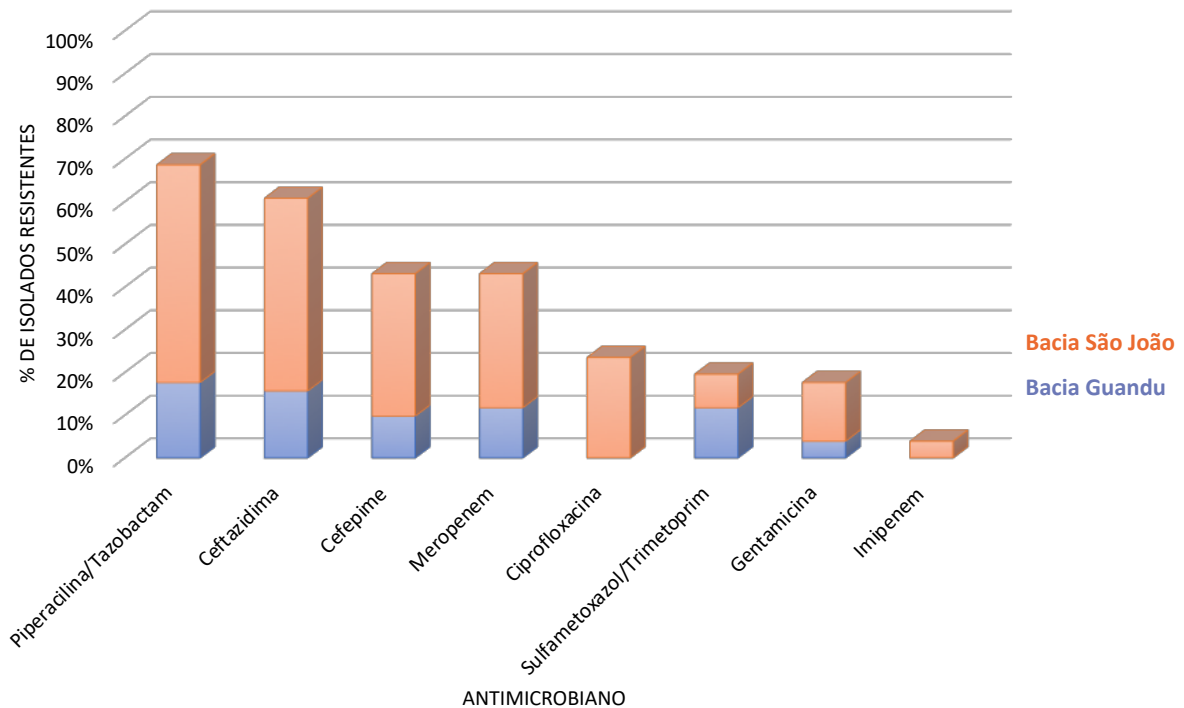
Figura 26 - Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados de *Pseudomonas* spp. recuperados de água destinadas ao tratamento e potável.



Fonte: (Do autor, 2019).

Os isolados de *Acinetobacter* spp. apresentaram maior percentual de resistência à piperacilina/tazobactam (69%, 35/51) seguido por ceftazidima (61%, 31/51), cefepime (43%, 22/51), meropenem (43%, 22/51), ciprofloxacina (24%, 12/51), sulfametaxazol/trimetoprim (20%, 10/51), gentamicina (18%, 9/51) e imipenem (4%, 2/51). Dezoito (35%) isolados apresentaram fenótipo de produtores de ESBL, 24 (47%) de KPC e 17 (33%) de MBL (Figura 27).

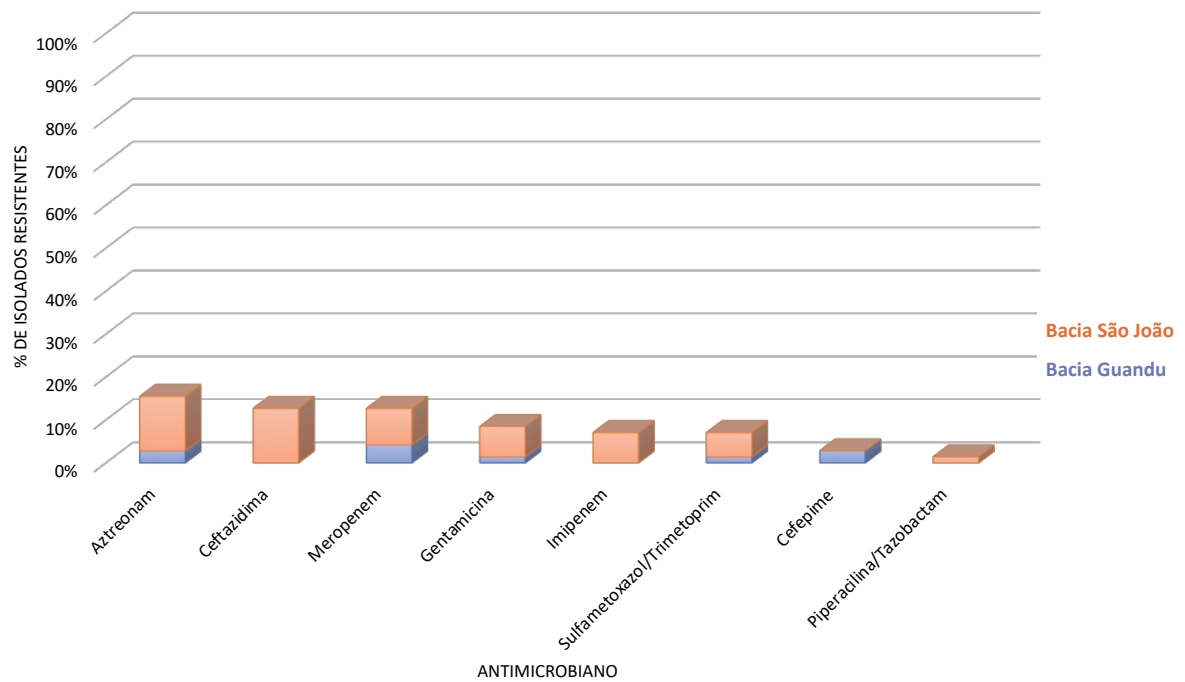
Figura 27 - Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados de *Acinetobacter* spp. recuperados de água destinadas ao tratamento.



Fonte: (Do autor, 2019).

Enquanto isso, os isolados de *Serratia* spp. apresentaram maior percentual de resistência ao aztreonam (15%, 11/71), ceftazidima (13%, 9/71), meropenem (13%, 9/71), gentamicina (8%, 6/71), imipenem (7%, 5/71), sulfametaxazol/trimetoprim (7%, 5/71), cefepime (3%, 2/71) e piperacilina/tazobactam (1%, 1/71), além disso, todos os isolados foram sensíveis a ciprofloxacina. Doze (17%) isolados apresentaram o fenótipo de produtores de KPC, 3 (4%) de MBL e nenhum isolado apresentou fenótipo de ESBL (Figura 28).

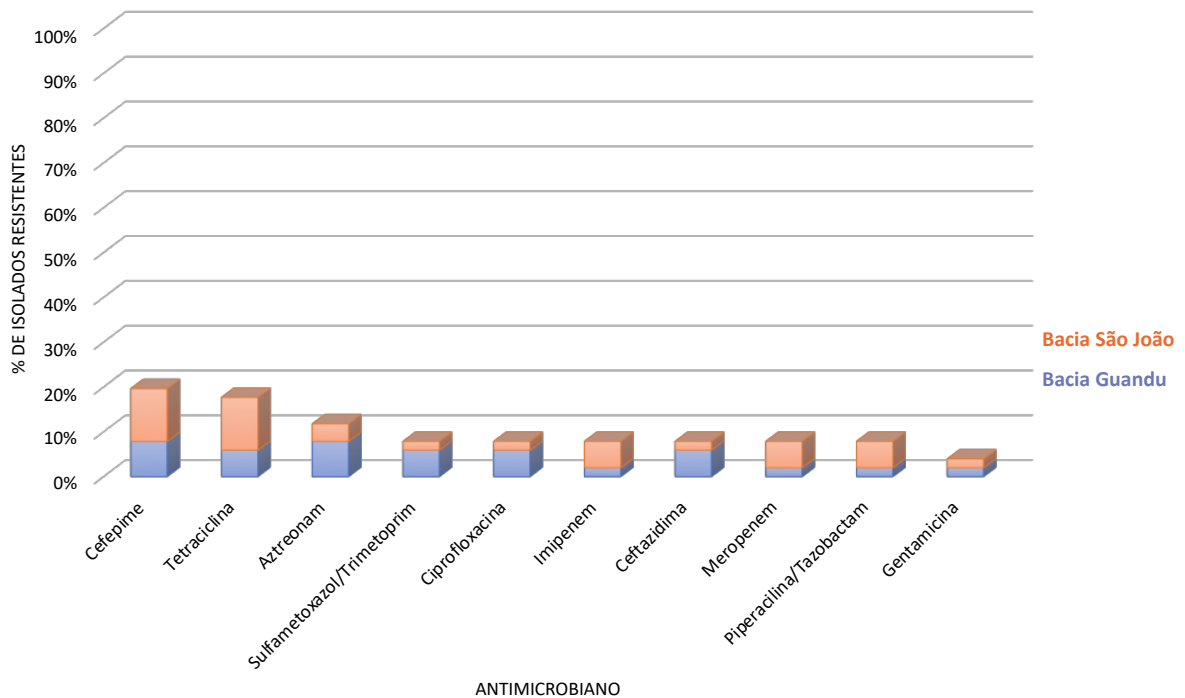
Figura 28 - Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados de *Serratia* spp. recuperados de água destinadas ao tratamento.



Fonte: (Do autor, 2019).

Os isolados de *Klebsiella* spp. apresentaram maior percentual de resistência para cefepime (20%, 10/51), tetraciclina (18%, 9/51), aztreonam (12%, 6/51), sulfametaxazol/trimetoprim (8%, 4/51), ciprofloxacina (8%, 4/51), imipenem (8%, 4/51), ceftazidima (8%, 4/51), meropenem (8%, 4/51), piperacilina/tazobactam (8%, 4/51) e gentamicina (4%, 2/51). Dois (4%) isolados apresentaram o fenótipo de produtoras de ESBL, cinco (10%) isolados de KPC e um (2%) isolado de MBL (Figura 29).

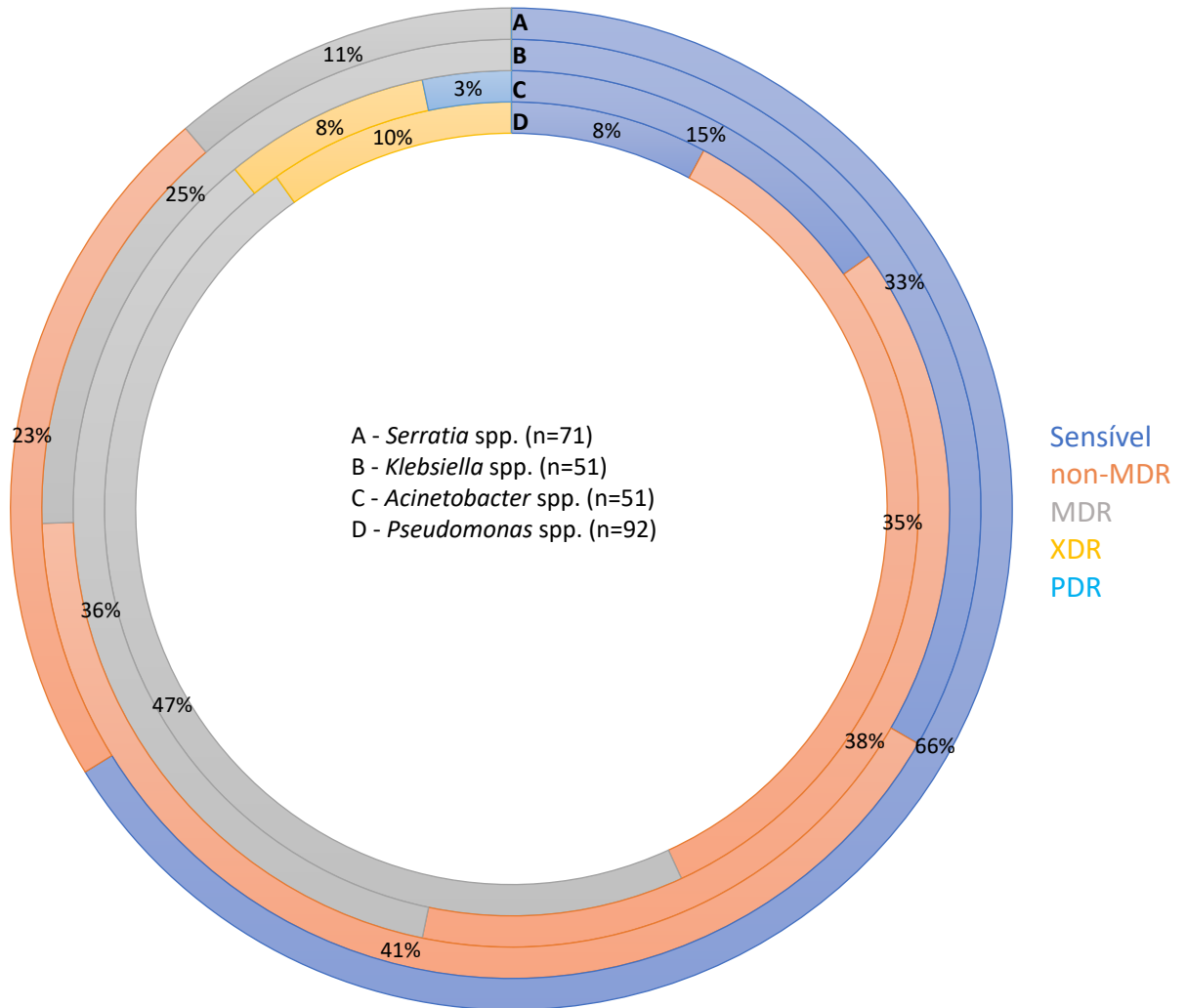
Figura 29 - Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados de *Klebsiella* spp. recuperados de água destinadas ao tratamento.



Fonte: (Do autor, 2019).

Sessenta e seis por cento (47/71) de *Serratia* spp., 33% (17/51) de *Klebsiella* spp., 15% (14/92) *Pseudomonas* spp. e 8% (4/51) *Acinetobacter* spp. foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados. O perfil *non-MDR* foi observado em 23% (16/71) dos isolados de *Serratia* spp., 35% (18/51) de *Acinetobacter* spp., 38% (35/92) de *Pseudomonas* spp. e 41% (21/51) de *Klebsiella* spp. Enquanto isso, o perfil MDR foi observado 47% (24/51) dos isolados de *Acinetobacter* spp., 36% (33/92) de *Pseudomonas* spp., 25% (13/51) de *Klebsiella* spp. e 11% (8/71) de *Serratia* spp. Vale ressaltar que, o perfil XDR foi observado apenas em isolados de *Acinetobacter* spp. (10%, 5/51 XDR) e *Pseudomonas* spp. (8%, 7/92 XDR), já o perfil PDR apenas em *Pseudomonas* spp. (3%, 3/92 PDR) (Figura 30).

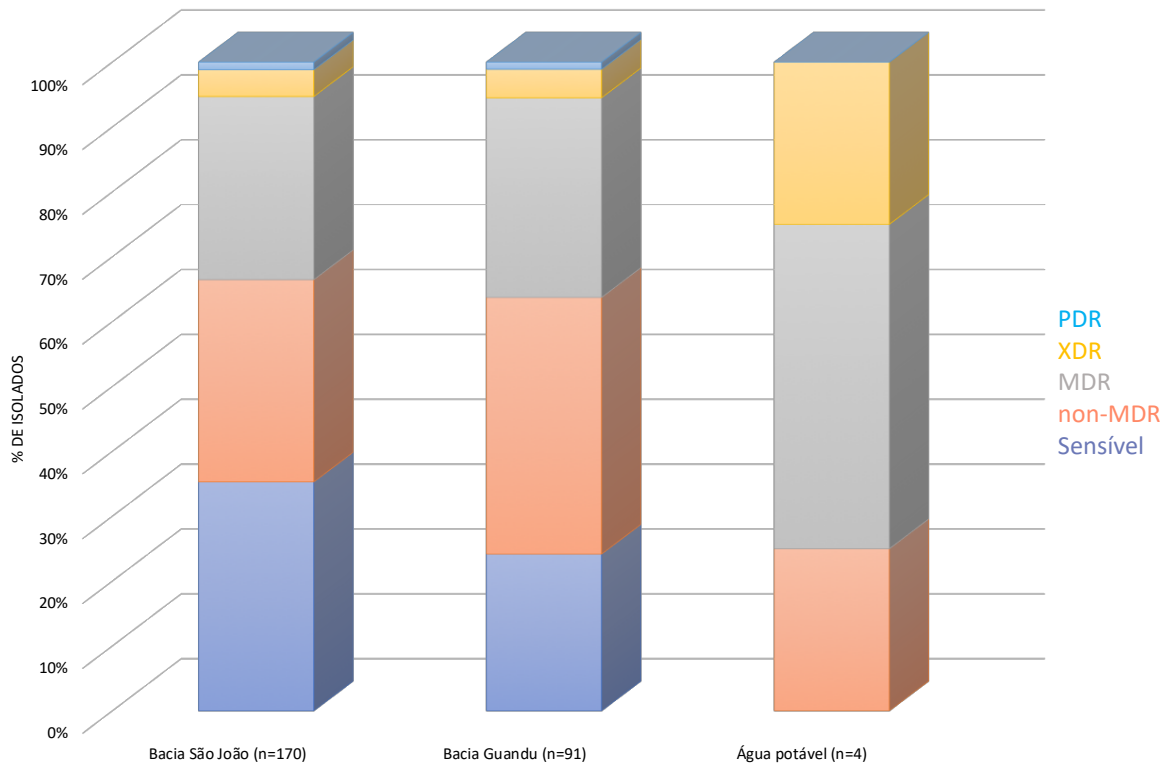
Figura 30 - Classificação dos perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos em relação aos gêneros avaliados.



Fonte: (Do autor, 2019).

Os perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos foram relacionados às bacias estudadas. Trinta e cinco por cento (60/170) dos isolados da bacia do São João e 24% (22/91) do Guandu foram sensíveis a todos os antimicrobianos. Todos os isolados de água potável foram resistentes pelo menos a um antimicrobiano. O perfil non-MDR foi encontrado em 40% (36/91) e 31% (53/170) nas bacias do Guandu e São João, respectivamente. Trinta e um por cento (28/91) dos isolados da Bacia do Guandu e 28% (48/170) da bacia São João apresentaram perfil MDR. Os perfis XDR e PDR foram os menos prevalentes em ambas as bacias (4% 7/170; 4/91 XDR e 1% PDR 2/170; 1/91) (Figura 31).

Figura 31 - Classificação dos perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos em relação aos locais de isolamento.

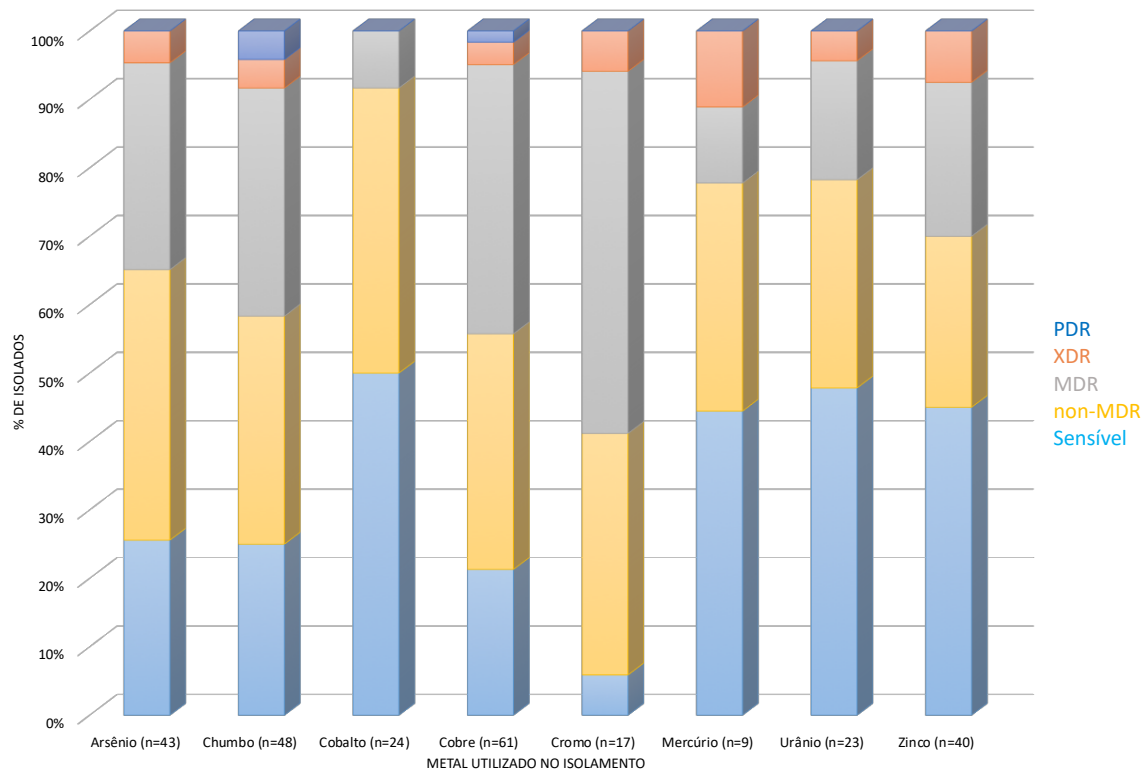


Fonte: (Do autor, 2019).

5.9 Associação entre os perfis de tolerância aos metais traço e resistência aos antimicrobianos

Os perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos dos 265 isolados (92 *Pseudomonas* spp., 71 *Serratia* spp., 51 *Acinetobacter* spp. e 51 *Klebsiella* spp.) foram correlacionados com os metais utilizados no meio de cultura para o isolamento. Os perfis PDR foram encontrados apenas em isolados recuperados de cobre e chumbo, já o perfil XDR só não foi observado em isolados recuperados do cobalto (Figura 32).

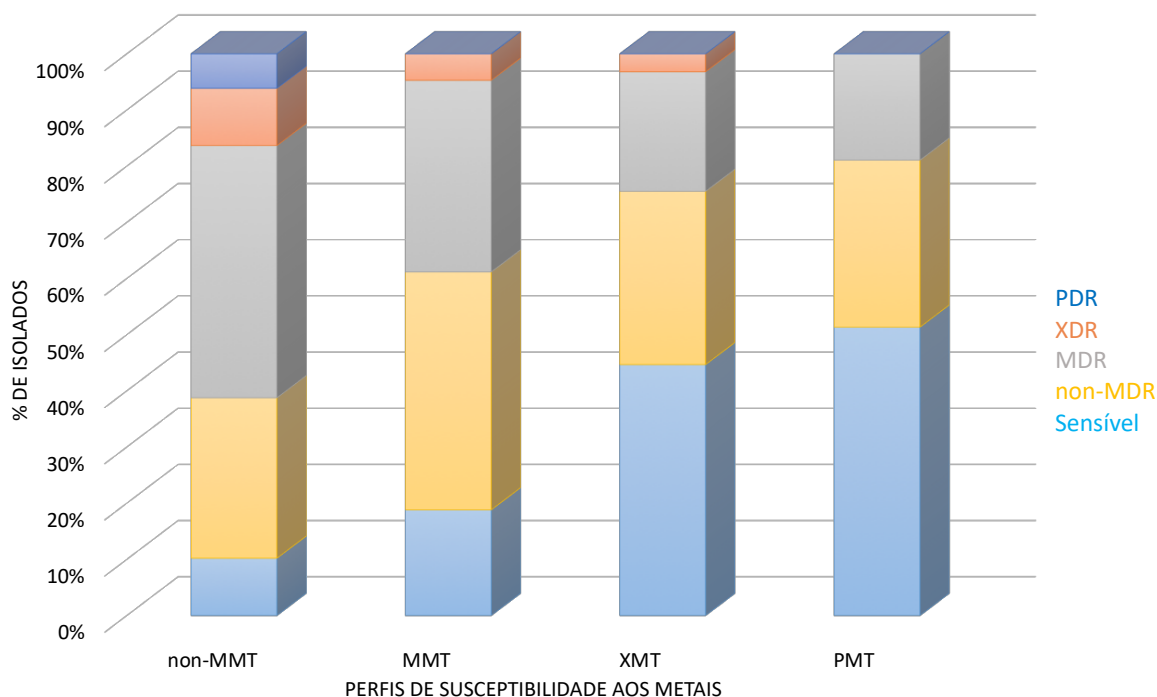
Figura 32 - Associação entre os perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos e o metal traço utilizado no isolamento.



Fonte: (Do autor, 2019).

Em seguida, os perfis de susceptibilidade aos metais traço e antimicrobianos dos isolados foram correlacionados. Não foram observados perfis XDR e PDR em isolados com perfis PMT. O perfil XDR foi observado nos perfis non-MMT, MMT e XMT. Foi observada uma relação inversa entre os perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos e metais traço (Figura 33).

Figura 33 - Associação entre os perfis de susceptibilidade aos metais traço e antimicrobianos.

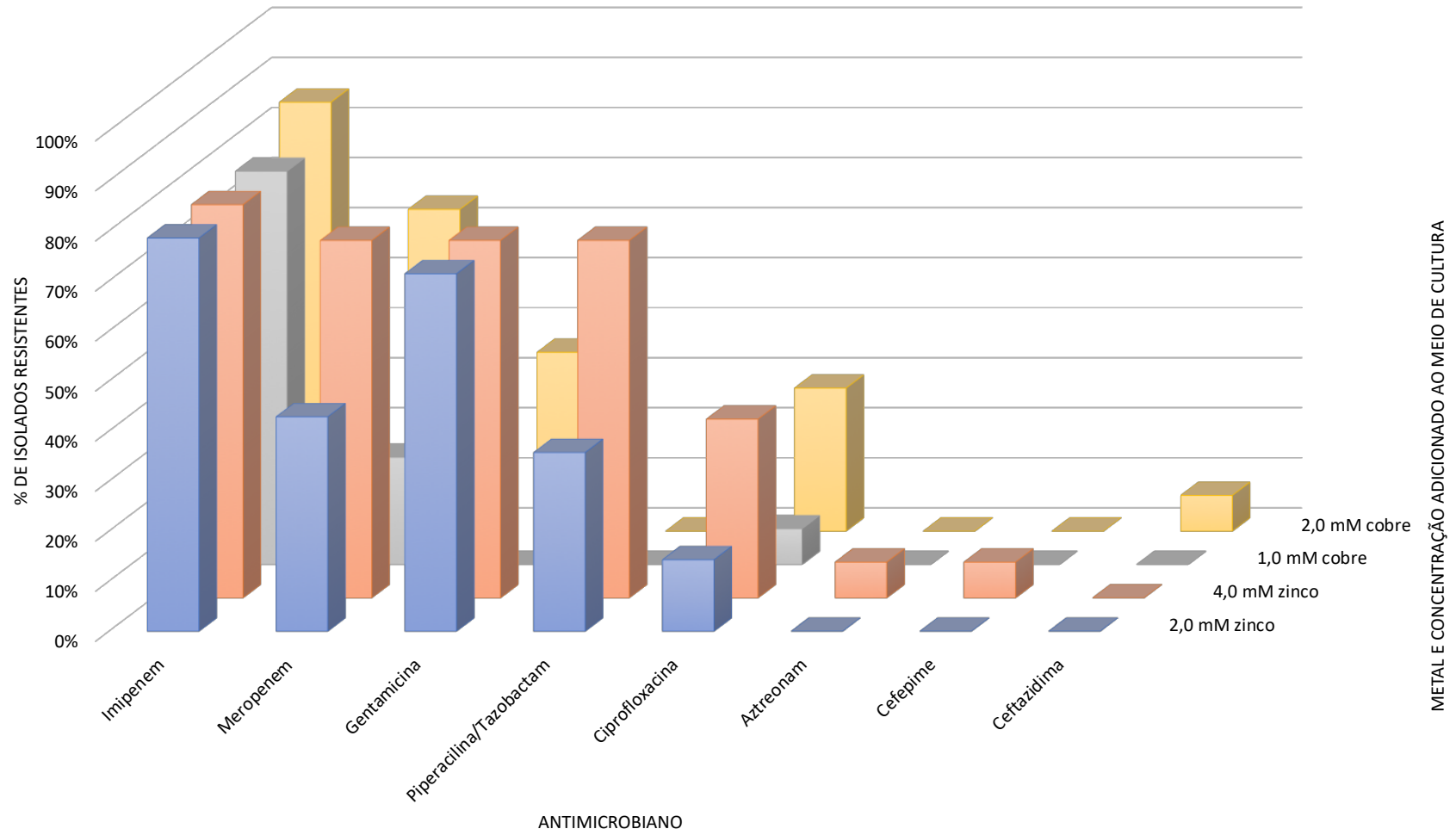


Fonte: (Do autor, 2019).

5.10 Avaliação do impacto dos metais traço no perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos

Os isolados que foram sensíveis a todos os antimicrobianos tiveram seus perfis de susceptibilidade novamente avaliados na presença de zinco e cobre em duas concentrações distintas (2 e 4mM de zinco). Esses metais foram selecionados com base no alto percentual de resistência observados nos isolados. Foram avaliados os 14 isolados de *Pseudomonas* spp. sensíveis a todos os antimicrobianos, na presença de zinco estes apresentaram maior percentual de resistência ao imipenem (79%, 11/14) nas 2 concentrações testadas, seguido por meropenem (43%, 6/14 e 71%, 10/14), gentamicina (71%, 10/14) para as 2 concentrações, piperacilina/tazobactam (36%, 5/14 e 71%, 10/14), ciprofloxacina (14%, 2/14 e 36%, 5/14), aztreonam (7%, 1/14) e cefepime (7%, 1/14) para as 2 concentrações. Enquanto isso, na presença de cobre, estes isolados apresentaram maior resistência ao imipenem (79%, 11/14 e 86%, 12/14) seguido por meropenem (21%, 3/14 e 64%, 9/14), gentamicina (36%, 5/14), ciprofloxacina (7%, 1/14 e 29%, 4/14) e ceftazidima (7%, 1/14) nas 2 concentrações (Figura 34).

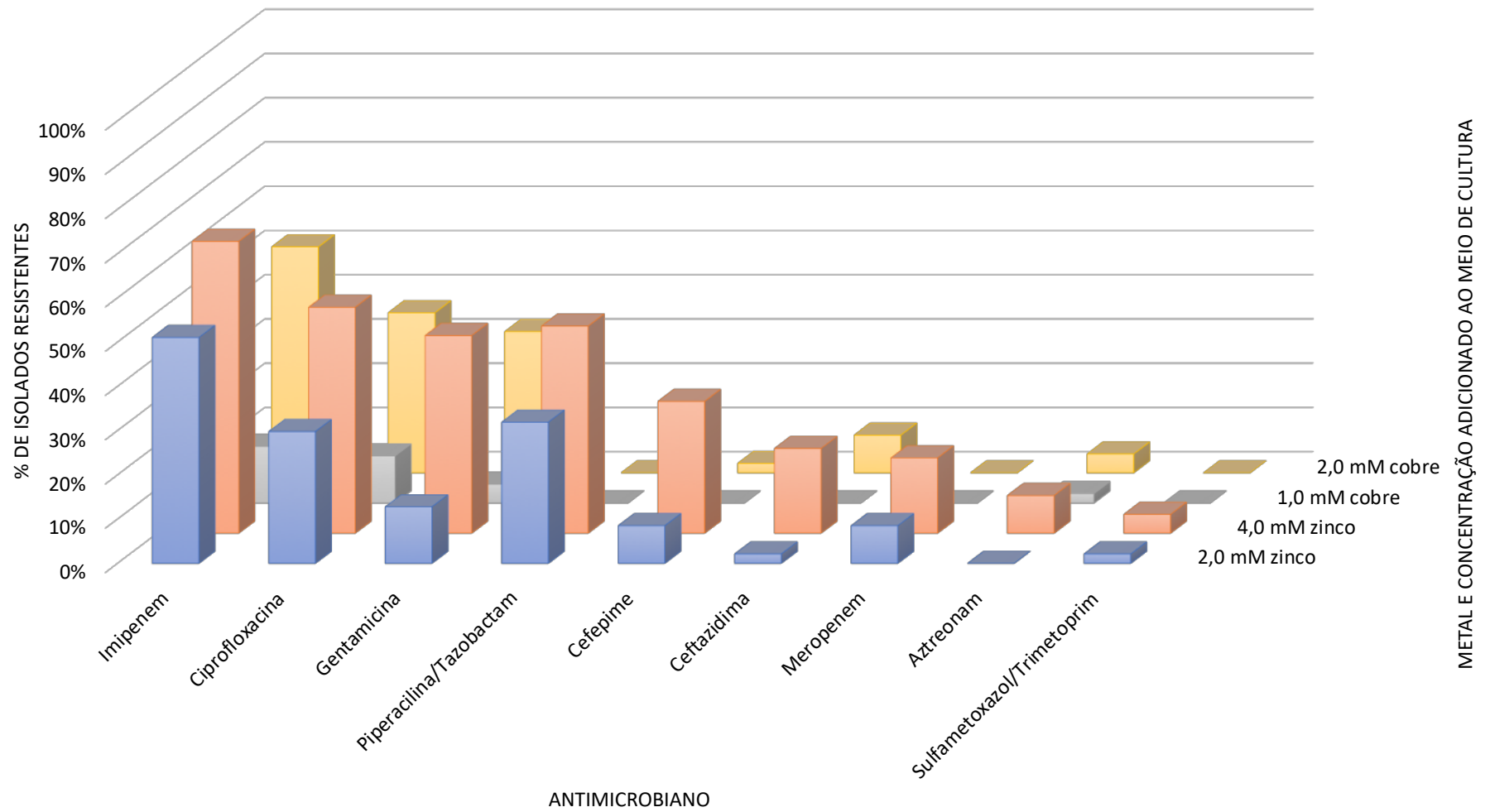
Figura 34 - Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados de *Pseudomonas* spp. recuperados de água não tratada na presença de zinco e cobre.



Fonte: (Do autor, 2019).

Foram selecionados 47 isolados de *Serratia* spp., na presença de zinco estes apresentaram maior resistência ao imipenem nas 2 concentrações testadas (2 e 4 mM) (51%, 24/47 e 66%, 31/47) seguido por ciprofloxacina (30%, 14/47 e 51%, 24/47), gentamicina (13%, 6/47 e 45%, 21/47), piperacilina/tazobactam (32%, 15/47 e 46%, 22/47), cefepime (9%, 4/47 e 30%, 14/47), ceftazidima (2%, 4/47 e 19%, 8/47), meropenem (9%, 4/47 e 17%, 8/47), aztreonam (9%, 4/47), sulfametoxazol/trimetoprim (2%, 1/47 e 4%, 2/47). Enquanto isso, na presença de cobre estes apresentaram maior resistência ao imipenem (13%, 6/47 e 51%, 24/47) seguido por ciprofloxacina (11%, 5/47 e 17%, 17/47), gentamicina (4%, 2/47 e 32%, 15/47), cefepime (2%, 2/47), ceftazidima (9%, 4/47), aztreonam (2%, 1/47 e 4%, 2/47) (Figura 35).

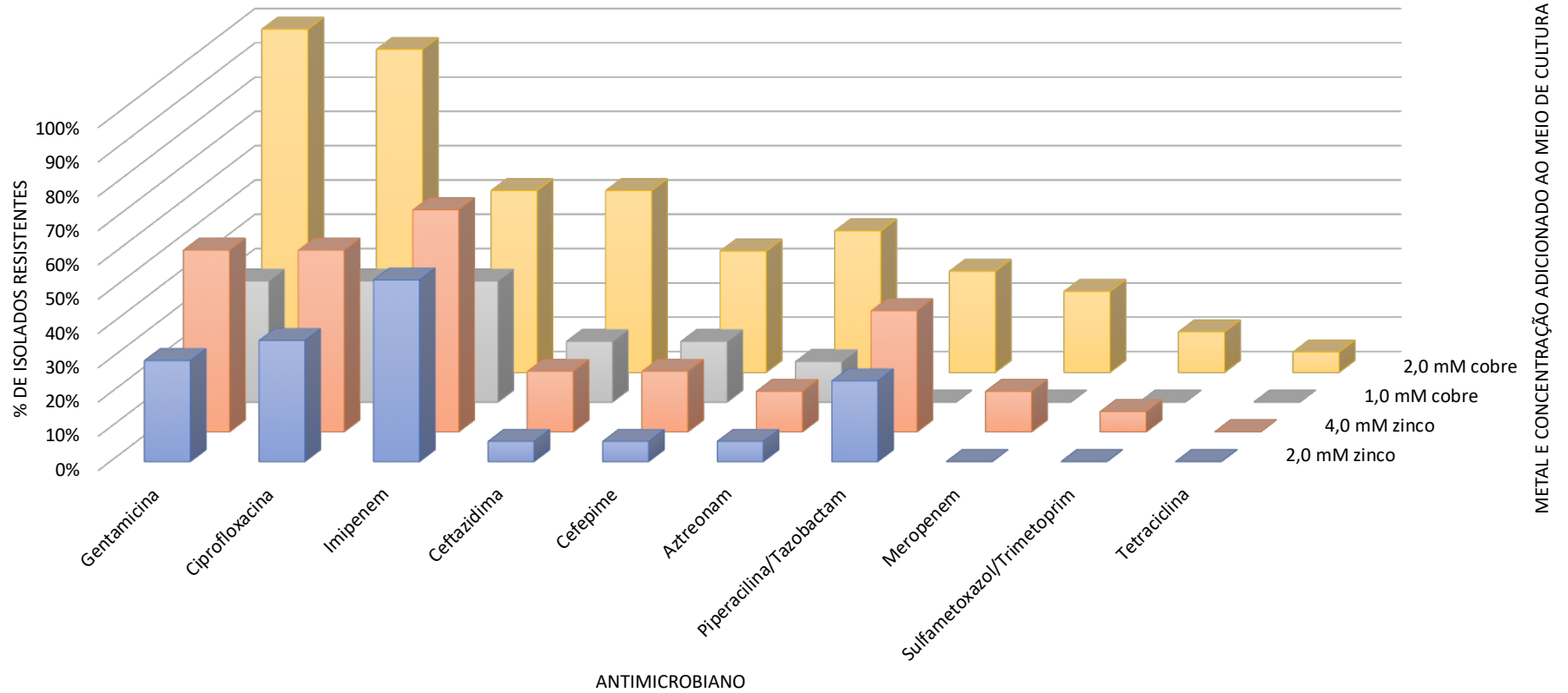
Figura 35- Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados de *Serratia* spp. recuperados de água não tratada na presença de zinco e cobre.



Fonte: (Do autor, 2019).

Foram selecionados 17 isolados de *Klebsiella* spp. Na presença de zinco apresentaram maior resistência a imipenem (53%, 9/17 e 65%, 11/17) seguido por ciprofloxacina (35%, 5/17 e 53%, 9/17), gentamicina (29%, 5/17 e 53%, 9/17), piperacilina/tazobactam (2%, 4/17 e 35%, 6/17), ceftazidima (6%, 1/17 e 18%, 3/17), cefepime (6%, 1/17 e 18%, 3/17), aztreonam (6%, 1/17 e 12%, 2/17), meropenem (12%, 2/17), sulfametoxazol/trimetoprim (6%, 1/17). Na presença de cobre estes apresentaram maior de resistência à gentamicina (35%, 6/17 e 100%, 17/17) seguido por ciprofloxacina (35%, 6/17 e 94%, 16/17), imipenem (35%, 6/17 e 53%, 9/17), ceftazidima (18%, 3/17 e 53%, 9/17), cefepime (18%, 3/17 e 35%, 6/17), aztreonam (12%, 2/17 e 41%, 7/17), piperacilina/tazobactam (29%, 5/17), meropenem (24%, 4/17), sulfametoxazol/trimetoprim (12%, 2/17) e tetraciclina (6%, 1/17) (Figura 36).

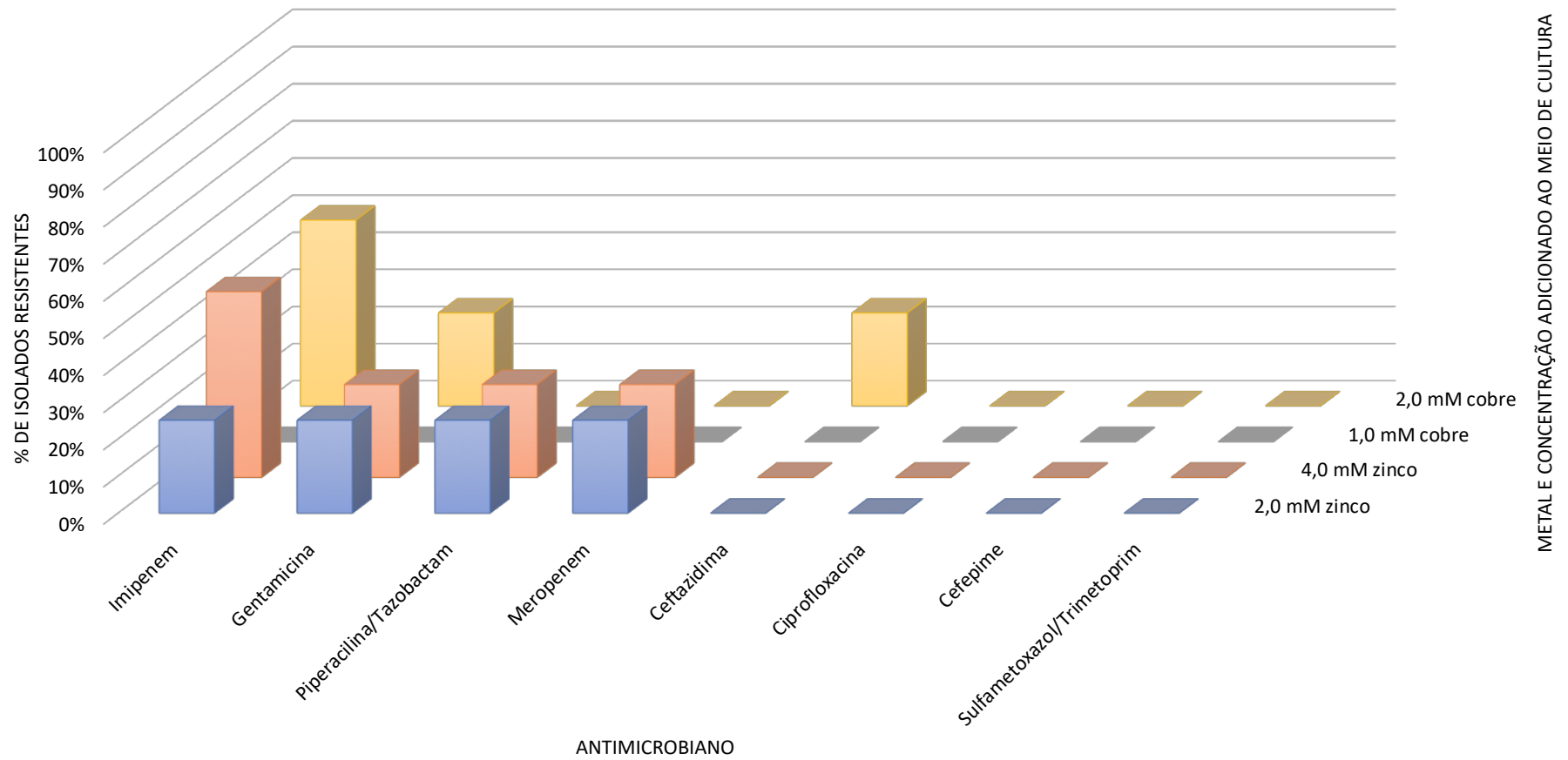
Figura 36 - Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados de *Klebsiella* spp. recuperados de água não tratada na presença de zinco e cobre.



Fonte: (Do autor, 2019).

Foram selecionados quatro isolados de *Acinetobacter* spp.; que na presença de zinco apresentaram maior de resistência ao imipenem (25%, 1/4 e 50%, 2/4) seguido por gentamicina (25%, 1/4 e 25%, 1/4), piperacilina/tazobactam (25%, 1/4 e 25%, 1/4), meropenem (25%, 1/4 e 25%, 1/4). Na presença de cobre estes apresentaram maior de resistência ao imipenem (50%, 2/4), gentamicina (25%, 1/4) e ceftazidima (25%, 1/4). Todos os isolados permaneceram sensíveis a ciprofloxacina, tetraciclina e sulfametoxazol/trimetoprim (Figura 37).

Figura 37 - Perfil de susceptibilidade ao antimicrobianos dos isolados de *Acinetobacter* spp. recuperados de água não tratada na presença de zinco e cobre.



Fonte: (Do autor, 2019).

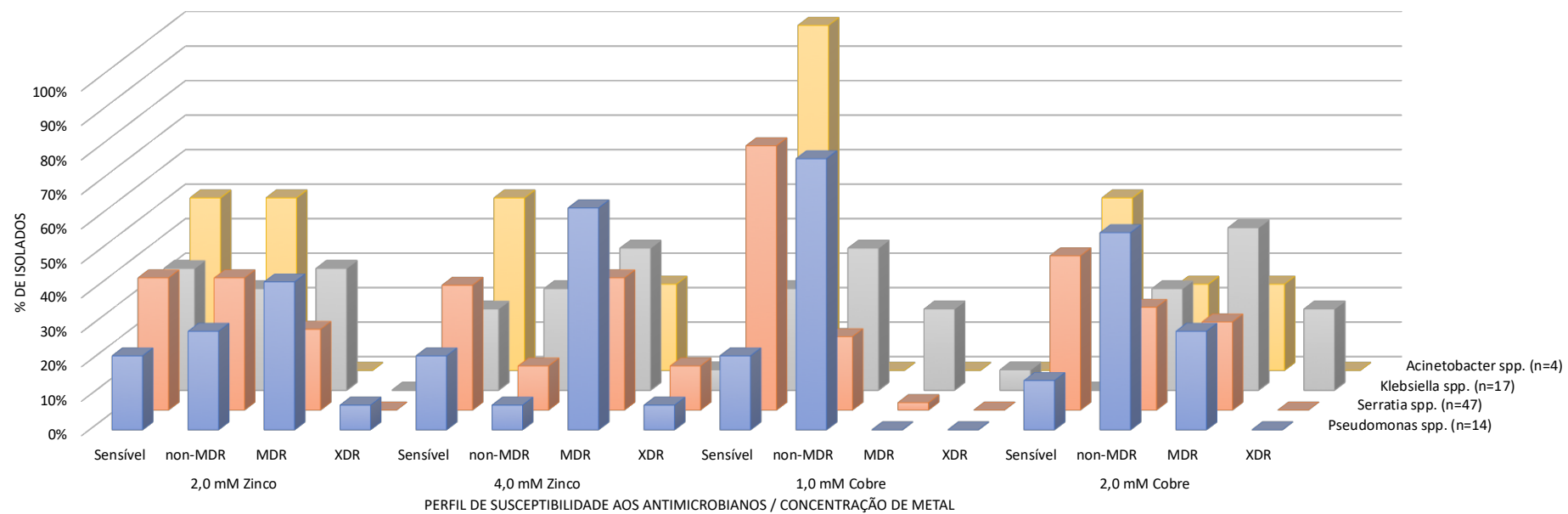
Em relação aos perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos 14% (2/14) dos isolados de *Pseudomonas* spp. em 2 mM de cobre e 21% (3/14) nas concentrações de 2 e 4 mM de zinco, e 1 mM de cobre permaneceram sensíveis a todos os antimicrobianos testados. O perfil *non-MDR* foi observado em 29% (4/14), 7% (1/14), 79% (11/14), 57% (8/14) destes isolados nas concentrações de 2 e 4 mM de zinco e 1 e 2 mM de cobre, respectivamente. Enquanto isso, 43% (6/14), 64% (9/14) e 29% (4/14) apresentaram perfil MDR nas concentrações de 2 e 4 mM de zinco e 2 mM de cobre. O perfil XDR foi observado em 7% (1/14) apenas nas concentrações de zinco.

Trinta e oito por cento (18/47) e 36% (17/47) (2 e 4 mM de zinco); 77% (36/47) e 45% (21/47) (1 e 2 mM de cobre) dos isolados de *Serratia* spp. Permaneceram sensíveis aos antimicrobianos. O perfil *non-MDR* foi observado em 38% (18/47), 13% (6/47), 21% (10/47), 30% (14/47) destes isolados nas concentrações de 2 e 4 mM de zinco e 1 e 2 mM de cobre, respectivamente. O perfil MDR foi demonstrado em 23% (11/47) e 38% (18/47) (2 e 4 mM de zinco); 2% (1/47) e 26% (12/47) (1 e 2 mM de cobre). O perfil XDR foi observado em 13% (6/47) dos isolados apenas na concentração de 4 mM de zinco.

Todos os isolados de *Klebsiella* spp. (17/17) apresentaram resistência a pelo menos um antimicrobiano na presença de 2 mM de cobre, enquanto 35% (6/17), 24% (4/17) e 29% (5/17) permaneceram sensíveis aos antimicrobianos nas concentrações de 1 e 2 mM de zinco e 1 mM de cobre, respectivamente. Vinte e nove por cento (5/17) apresentaram perfil *non-MDR* nas concentrações de 2 e 4 mM de zinco, e 2 mM de cobre e 41% (7/17) em 2 mM de cobre. Trinta e cinco por cento 35% (6/17), 41% (7/17), 24% (4/17) e 47% (8/17) apresentaram perfil MDR nas concentrações de 2 e 4 mM de zinco e 1 e 2 mM de cobre, respectivamente. O perfil XDR foi observado em 6% (1/17), 6% (1/17) e 24% (4/17) dos isolados nas concentrações de 4 mM de zinco e 1 e 2 mM de cobre.

Nenhum isolado de *Acinetobacter* spp. apresentou perfil XDR nas concentrações testadas. A concentração de 1 mM de cobre não alterou os perfis, sendo assim os isolados permaneceram sensíveis. Concentrações de 4 mM de zinco e 2 mM de cobre resultaram em perfis *non-MDR* e MDR em 25% dos isolados (1/4), respectivamente. O perfil PDR não foi observado em nenhum isolado dos quatro gêneros avaliados nas concentrações utilizadas (Figura 38).

Figura 38 - Classificação dos perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos em relação à concentração de metal traço utilizada.



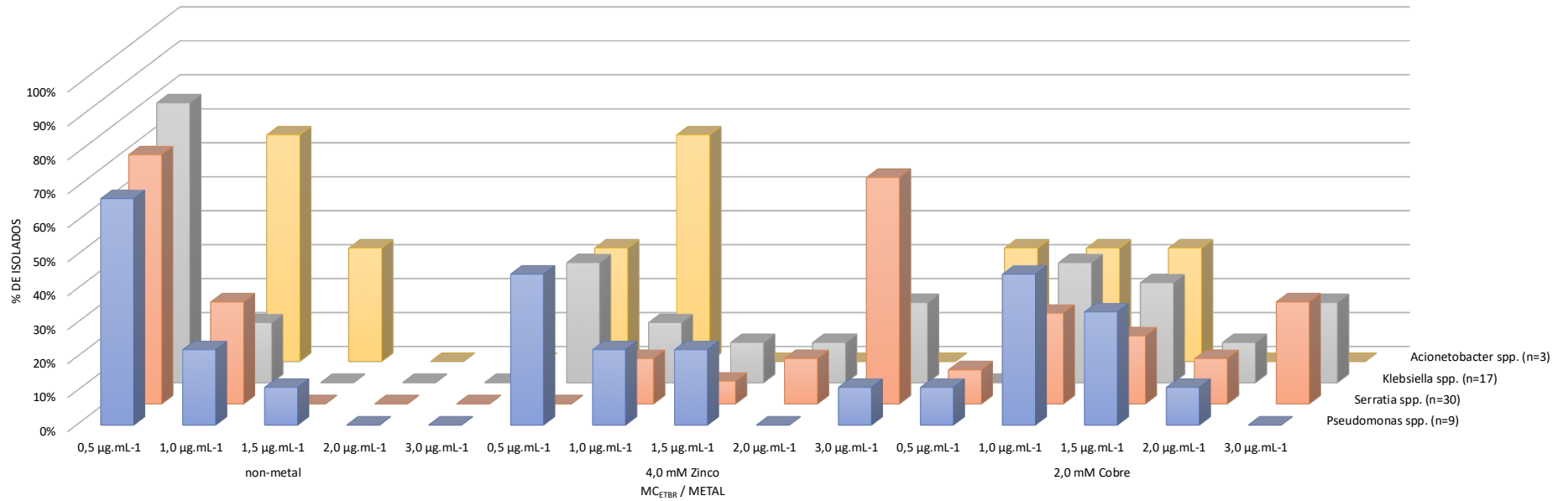
Fonte: (Do autor, 2019).

5.11 Determinação da atividade de efluxo induzida pelos metais traço

Após a determinação dos perfis de susceptibilidade a metais traço e antimicrobianos foram avaliadas as atividades de efluxo induzidas pelos metais traços. Inicialmente foi determinada a MC_{EtBr} de 62 isolados (3 *Acinetobacter* spp., 17 *Klebsiella* spp., 12 *Pseudomonas* spp. e 30 *Serratia* spp.) que apresentaram alteração nos perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos na presença de zinco e cobre. Três isolados de *Pseudomonas* spp. apresentaram MC_{EtBr} maior que $3,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e não foram utilizados nos ensaios com a presença de zinco e cobre. Oitenta e dois por cento (14/17) dos isolados de *Klebsiella* spp., 71% (22/30) de *Serratia* spp. e 67% (6/9) de *Pseudomonas* spp. apresentaram MC_{EtBr} igual a $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Vinte e dois por cento (2/9) de *Pseudomonas* spp., 29% (9/30) de *Serratia* spp., 18% (3/17) de *Klebsiella* sp. e 67% (2/3) de *Acinetobacter* spp. demonstraram MC_{EtBr} de $1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Onze por cento (1/9) dos isolados de *Pseudomonas* spp. e 33% (1/3) de *Acinetobacter* spp. apresentaram MC_{EtBr} igual a $1,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Na presença de zinco 33% (3/9) dos isolados de *Pseudomonas* spp., 87% (26/30) de *Serratia* spp., 65% (11/17) de *Klebsiella* spp. e 33% (1/3) *Acinetobacter* spp. apresentaram aumento na atividade de efluxo. Enquanto isso, 89% (8/9) de *Pseudomonas* spp., 90% (27/30) de *Serratia* spp., 100% (17/17) de *Klebsiella* spp. e 33% (1/3) *Acinetobacter* spp. apresentaram aumento na atividade de efluxo na presença de cobre (Figura 39).

Figura 39 - Caracterização da atividade de efluxo na ausência e presença de zinco e cobre.

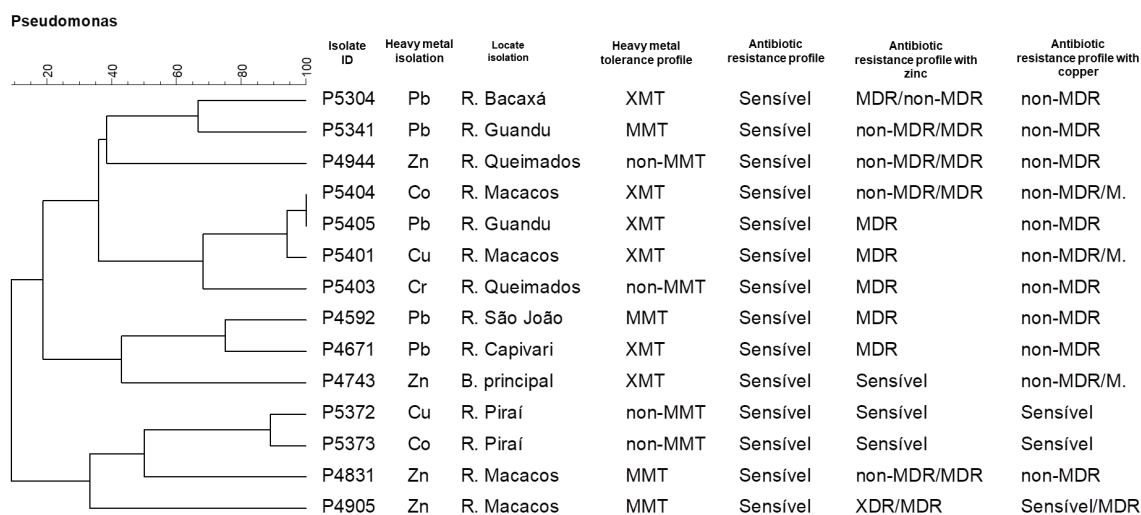


Fonte: (Do autor, 2019).

5.12 Agrupamentos genéticos dos isolados

A variabilidade genética de 261 linhagens (88 *Pseudomonas* spp., 71 *Serratia* spp., 51 *Acinetobacter* spp. e 51 *Klebsiella* spp.) recuperados de águas não tratadas e de quatro *Pseudomonas* spp. recuperadas de água potável foi analisada e mostrou alta diversidade (<80% de similaridade). Nenhum isolado recuperado de amostras de água potável foi associado a isolados recuperados de amostras de água destinadas ao tratamento (Apendice B). Foram selecionadas 14 cepas de *Pseudomonas* spp. sensíveis a todos os antimicrobianos que apresentaram 13 perfis distintos (Figura 40).

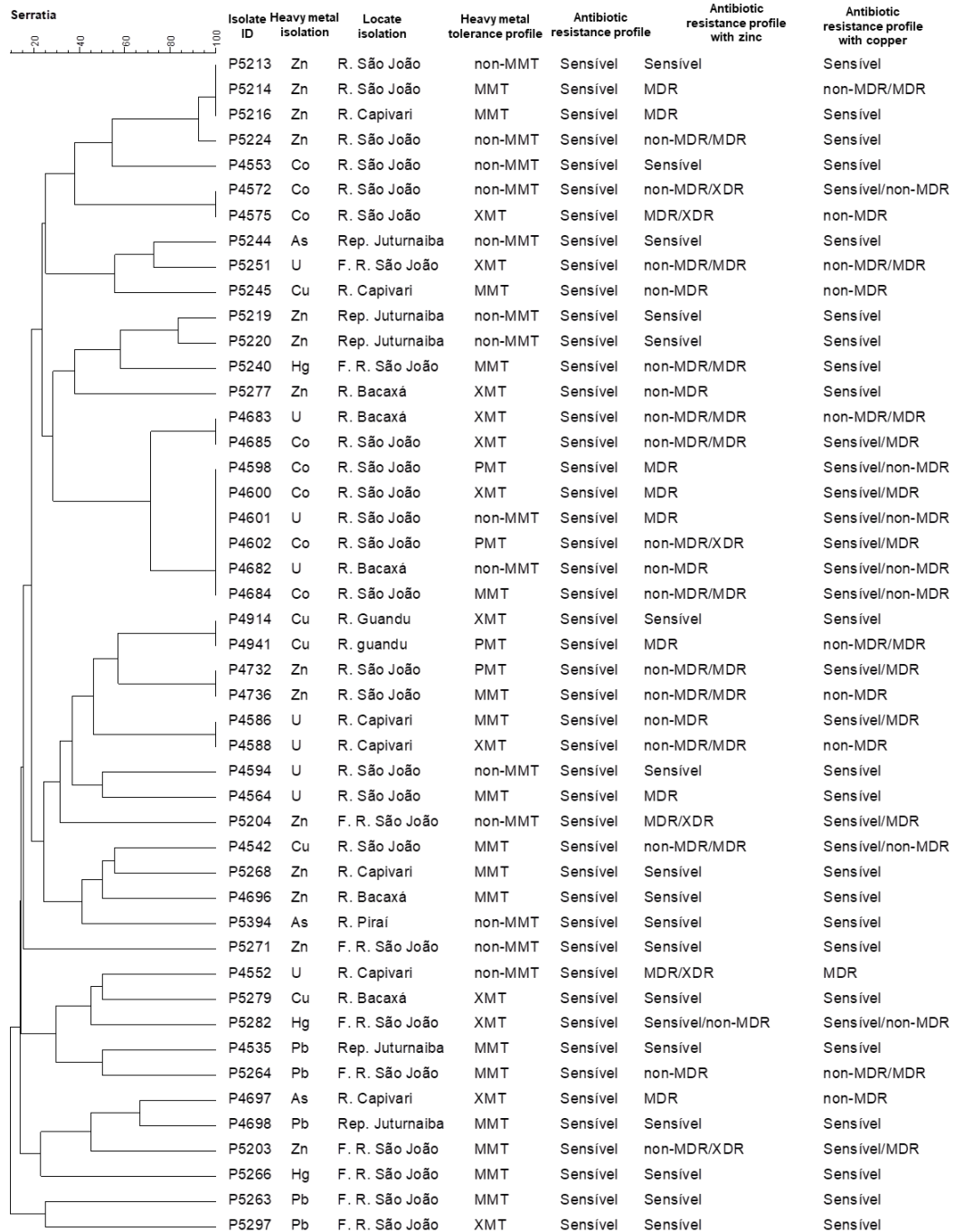
Figura 40 - Dendrograma representativo de similaridade do perfil de banda das 14 linhagens de *Pseudomonas* spp. sensíveis a todos os antimicrobianos.



Fonte: (Do autor, 2019).

Entre as 71 cepas de *Serratia* spp. foram observados 51 perfis distintos. Vale destacar que um isolado da Represa Juturnaíba apresentou perfil similar a isolados do Rio Guandu e Represa Guandu (Apendice B). As 47 linhagens sensíveis a todos os antimicrobianos apresentaram 35 perfis distintos (Figura 41).

Figura 41 - Dendrograma representativo de similaridade dos perfis de bandas dos isolados de *Serratia* spp.

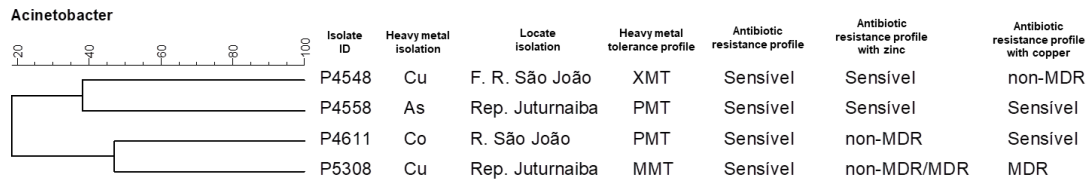


Fonte: (Do autor, 2019).

Entre as 51 cepas de *Acinetobacter* spp. foram observados 47 perfis distintos, entretanto, isolados com o mesmo perfil de banda apresentaram diferentes perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos e metais traço (Apendice B). As quatro

linhagens sensíveis foram selecionadas e apresentaram quatro perfis distintos (Figura 42).

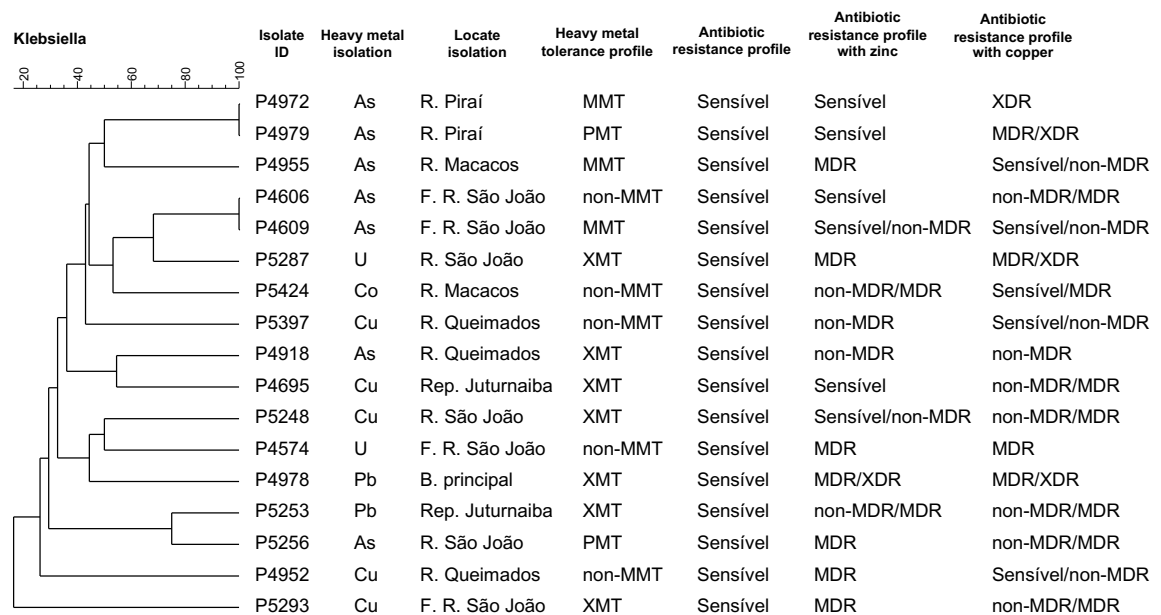
Figura 42 - Dendrograma representativo de similaridade dos perfis de bandas dos isolados de *Acinetobacter* spp.



Fonte: (Do autor, 2019).

Entre as 51 cepas de *Klebsiella* spp. foram observados 42 perfis distintos. Além disso, isolados com o mesmo perfil de banda apresentaram diferentes perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos e metais traço (Apendice B). As 17 linhagens sensíveis a todos os antimicrobianos apresentaram 15 perfis distintos (Figura 43).

Figura 43 - Dendrograma representativo de similaridade dos perfis de bandas dos isolados de *Klebsiella* spp.



Fonte: (Do autor, 2019).

6 DISCUSSÃO

O uso excessivo e insustentável, bem como, intensivas atividades humanas seguidas pelo descarte descontrolado de resíduos estão reduzindo o suprimento de água disponível (LAWFORD *et al.*, 2013). Independente da fonte (superficial ou subterrânea) a água pode servir de veículo para vários agentes biológicos e químicos, desta forma é necessário um monitoramento acurado de sua qualidade a fim de evitar impactos negativos à saúde da população (CUNHA *et al.*, 2012). A falta de estrutura sanitária e principalmente o manejo inadequado de dejetos humanos e de outros animais são os fatores mais importantes de contaminação dos recursos hídricos (NOGUEIRA *et al.*, 2003).

As águas da bacia do São João e do Guandu são, frequentemente, impactadas com níveis elevados de poluição química e fecal, devido a falta de tratamento do esgoto nas cidades ao entorno. Sendo assim, este estudo teve como objetivo determinar a presença de poluentes químicos e biológicos nos recursos hídricos e estudar seus possíveis impactos na diversidade e no resistoma microbiano.

No geral, não foram observadas diferenças significativas em relação aos parâmetros físico-químicos entre amostras de diferentes estações do ano. A temperatura apresentou variações entre 20 e 31 °C nos rios Queimados e Capivari, respectivamente. Um outro parâmetro relevante foi o baixo nível de oxigênio dissolvido (OD) no rio Queimados (0,7; 2,5 mg.L⁻¹) o que sinaliza o descarte de grandes volumes de efluentes domésticos, hospitalares e industriais sem tratamento adequado em suas águas. Segundo IGBINOSA; OKOH, 2009, concentrações de oxigênio abaixo de 5 mg.L⁻¹ podem afetar a vida aquática, uma vez que em ambientes não poluídos essa concentração normalmente varia entre 8 e 10 mg.L⁻¹. Nossos dados indicam a liberação de poluentes que prejudicam a qualidade da água destinada ao abastecimento público e comprometem o tratamento, tornando-o mais oneroso.

Resíduos antimicrobianos no ambiente aquático podem ser originários de efluentes hospitalares, domésticos, rurais (aquicultura, pecuária) (KÜMMERER, 2009a, 2009b) e da indústria farmacêutica (CARDOSO; PORCHER; SANCHEZ, 2014). Impulsionada pela enorme demanda pela pecuária e produtos marinhos, o uso de antimicrobianos aumentou rapidamente (ZHANG *et al.*, 2012). O emprego

global de antimicrobianos na pecuária foi de aproximadamente 63 toneladas em 2010 e estimativas sugerem um aumento de 67% até 2030, quase dobrando na China, África do Sul, Brasil, Índia e Rússia (VAN BOECKEL *et al.*, 2015). Como resultado desse uso extensivo, uma variedade de resíduos de antimicrobianos é encontrada em carne, leite, ovos e água potável (LEUNG *et al.*, 2013; LIU; WONG, 2013).

Neste presente estudo, antimicrobianos das classes dos β -lactâmicos, macrolídeos e sulfonamidas foram detectados em amostras de águas não tratadas. Vale destacar que a Bacia do Guandu apresentou as maiores taxas de antimicrobianos. Claritromicina, azitromicina e sulfametoxazol também foram encontrados em amostras de água potável. No entanto, troleandomicina e roxitromicina foram detectados apenas na água potável. Os macrolídeos, como a claritromicina e azitromicina, são amplamente administrados na medicina humana e animal e podem ser carregados para recursos hídricos através do solo agrícola e da aplicação de lamas ou adubos provenientes de esgoto (TOPP *et al.*, 2016).

Outro estudo também revelou a presença de sulfametoxazol e oxitetraciclina em rios afluentes do Guandu na região rural do Estado do Rio de Janeiro (MONTEIRO *et al.*, 2016). As sulfonamidas não são degradadas pela microbiota de águas superficiais, mesmo após 30 dias de sua introdução no ambiente, o que explica sua presença em diferentes ambientes aquáticos como efluentes hospitalares e seus corpos hídricos receptores (NOVAES *et al.*, 2018; PÉREZ; EICHHORN; AGA, 2005; ZHANG; GEISSEN; GAL, 2008). Considerando que águas superficiais são mais afetadas, os produtos farmacêuticos podem representar um problema para as estações de tratamento de água (ETAs) que captam estas águas para a produção de água potável (AL-QAIM *et al.*, 2015).

Assim como neste presente estudo, muitos antimicrobianos já foram detectados em água potável em vários países desenvolvidos em níveis geralmente $<100 \text{ ng.L}^{-1}$ (SEGURA *et al.*, 2009b). Certos compostos, como eritromicina, ácido salicílico e cefalexina são os mais relatados globalmente (JIANG *et al.*, 2011; LEUNG *et al.*, 2012). Vale ressaltar, que neste presente estudo, embora a cefalexina tenha sido encontrada em 60% (6/10) das amostras do Guandu e 20 % (2/10) do São João entre $<10 \text{ ng.L}^{-1}$ e $>500 \text{ ng.L}^{-1}$, a mesma não foi detectada na água potável.

A alta densidade populacional nas cidades resulta em grande uso e descarte de antimicrobianos (LIU *et al.*, 2018). Esse descarte em corpos hídricos representa um risco significativo para a saúde humana e para o meio ambiente, mesmo em baixas concentrações (KÜMMERER, 2009a, 2009b; LEUNG *et al.*, 2013). Na China, ácido salicílico, ácido clofíbrico e carbamazepina foram encontrados em 23-33% das amostras de água potável, seguidos por três macrolídeos (claritromicina; roxitromicina; azitromicina) e sulfametoxazol em 7,1-8,8% (LEUNG *et al.*, 2013). Também foram revelados altos níveis de carbamazepina, ácido clofíbrico e sulfametoxazol em água potável em países da Europa e América do Norte (BENOTTI *et al.*, 2009).

Embora alguns antimicrobianos possam ser eliminados via degradação abiótica ou biótica, sua introdução contínua pode torná-los pseudopersistentes nos ambientes aquáticos (DONG *et al.*, 2016). A presença de antimicrobianos na água potável se deve principalmente, a sua remoção incompleta durante as etapas de convencionais de tratamento em ETAs. Além disso, resíduos de antimicrobianos podem acelerar a emergência e a evolução de ARB e ARGs no ambiente (BEN *et al.*, 2018).

No presente estudo, vários metais traço também foram detectados nos corpos de água estudados, os quais são frequentemente relacionados a atividades humanas como indústrias, descargas de esgoto, lixo eletrônico e agricultura. Noventa por cento (9/10) das amostras da Bacia São João e 30% (3/10) da bacia do Guandu mostraram concentrações de urânio acima do nível máximo recomendado de acordo com a legislação vigente no Brasil. Assim como outros metais, o urânio também é naturalmente incorporado aos ambientes aquáticos por processos geoquímicos devido à formação geológica em que o corpo d'água se encontra, a qual pode possuir em sua composição rochas contendo minerais radiativos. Radionuclídeos como o ^{238}U apresentam instabilidade e na medida em que decaem liberam radiação nas formas de partícula alfa e beta, as quais podem levar a contaminação do ambiente, gerando graves problemas de saúde humana, bem como causando danos a microbiota presente na região (YOSHIDA; TAKAHASHI, 2012).

Em condições normais, o urânio tende a ser um elemento móvel, e as águas naturais geralmente carregam concentrações variando de 0,1 - 10,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$. A

ingestão de urânio ocorre, principalmente, através da cadeia alimentar e água. Após a captação através do trato gastrointestinal este elemento é principalmente depositado nos ossos devido à semelhança dos íons de urânio e cálcio (KARPAS *et al.*, 1998; LEGGETT; HARRISON, 1995; TANDON; IYENGAR; PARR, 1998). Outro estudo no Brasil também revelou a presença de urânio nas águas subterrâneas da Região dos Lagos em que 19% (17/88) das amostras excederam o nível máximo de urânio, possivelmente proveniente de rochas ricas em vestígios de urânio (SHEPPARD *et al.*, 2005). O urânio move-se rapidamente de uma infinidade de pontos relacionados à mineração e fontes não pontuais para o ambiente aquático, poluindo tanto as águas do córrego quanto as águas subterrâneas contidas nos aquíferos (WINDE, 2010).

Altos níveis de urânio em ambientes aquáticos são geralmente associados a atividades de mineração. No entanto, pelo que sabemos, não há mineração de urânio naquela na região dos lagos. Com cerca de 30% do território prospectado, o Brasil atualmente possui a sexta maior reserva de urânio do mundo, estimadas em 309.200 toneladas. Desse total, 46% estão localizados no município de Itatiaia, no Ceará, e 33% nos municípios de Lagoa Real e Caetité, no estado da Bahia (PRADO *et al.*, 2007). Outra explicação possível para altas concentrações de urânio encontradas em nossas amostras de água seria a existência de depósitos naturais de urânio. ALMEIDA *et al.*, 2004 verificou concentrações mais elevadas de urânio dissolvido nas águas subterrâneas da Região dos Lagos relacionadas à formação de complexos de carbonato e hidróxido. Eles mostraram uma correlação significativa entre as concentrações de urânio e os valores de condutividade elétrica, e também entre Ca, Mg, Na, K e Cl, indicando o impacto da água do mar.

Esses dados são preocupantes, uma vez que o aumento do acúmulo de minerais pode causar sérios danos à saúde humana. Estudos mostraram altos níveis de Mn, Fe, Pb, Cd e Al na população da Mongólia e estabeleceram uma relação entre Parkinson, artrite e câncer de pulmão com a presença de metais traço no cabelo (BENDERLI CIHAN; SÖZEN; ÖZTÜRK YILDIRIM, 2011; KOMATSU *et al.*, 2012). O consumo de frutos do mar também pode contribuir para o aumento das concentrações de mercúrio orgânico, levando a atrasos no desenvolvimento cognitivo, como observado em crianças na Espanha (FREIRE *et al.*, 2010).

No presente estudo, foram encontrados níveis de alumínio acima do preconizado em todas as amostras de água não tratada e 64% (7/11) das amostras de água potável. O alumínio é o elemento metálico mais abundante da crosta terrestre, ocorrendo naturalmente no solo, na água e no ar, sendo redistribuído ou movido, através de atividades naturais ou humanas (SIMAS, 2009). Além de se encontrar nas águas superficiais e subterrâneas, o alumínio é um dos elementos presentes na chuva ácida, que contamina rios, lagos, peixes, aves e, no fim da cadeia alimentar, os seres humanos.

Contudo nas últimas décadas surgiram evidências que relacionam o alumínio como potencial causador de algumas doenças neurodegenerativas, como o Alzheimer (INAN-EROGLU; AYAZ, 2018). Estudos realizados em animais demonstraram que o alumínio é distribuído por todo o corpo com uma acumulação preferencial nos ossos e com capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica e placentária (GOURIER-FRÉRY; FRÉRY, 2004; VERSTRAETEN; AIMO; OTEIZA, 2008).

Ainda no presente estudo, o ferro foi o metal mais abundante nas amostras de água não tratada (90%; 18/20) e de água potável (50%; 5/10). Íons de ferro em águas tratadas destinadas ao abastecimento causam depósitos, incrustações e possibilitam a proliferação de bactérias ferruginosas pelo sistema de abastecimento, além de serem responsáveis principalmente, pelo aparecimento de gosto e odor, e interferências em processos industriais (fabricação de papel, tecidos, tinturarias e cervejarias) (MORUZZI; REALI, 2012). A exposição a doses elevadas de ferro pode levar a sobrecarga tecidual, podendo causar lesões em vários órgãos. Além disso, esse quadro pode levar a cirrose hepática e a doenças que afetam o sistema endócrino e a cardiomiopatias (CHAUDHARY *et al.*, 2018).

A avaliação microbiológica da qualidade da água tem um papel destacado no processo de monitoramento, em vista do elevado número e da grande diversidade de microrganismos patogênicos, em geral de origem fecal, que podem estar presentes na água. Embora a legislação não determine um limite de coliformes totais, no presente estudo foram revelados valores elevados em 95% (19/20) das amostras destinadas ao tratamento, mesmo em locais longe de áreas habitadas e de descargas de esgoto conhecidas. Um dado preocupante foi que apenas oito amostras apresentaram níveis de *E. coli* dentro do preconizado pela legislação. Sua

presença em altas concentrações em corpos hídricos indica a ocorrência de contaminação fecal e, conseqüentemente, outros patógenos (AHMED; GYAWALI; TOZE, 2015).

Durante este estudo, verificamos uma baixa correlação entre a enumeração de *E. coli* e a detecção dos marcadores MST *Methanobrevibacter* spp. e *Bacteroidales*. Apesar dos baixos níveis de *E. coli* encontrados na Represa Guandu, a presença de marcadores de contaminação fecal de três hospedeiros-específicos foi demonstrada. Estudos vêm relatando a pouca ou nenhuma correlação entre a detecção de biomarcadores de contaminação fecal MST e a enumeração de *E. coli* e *Enterococcus faecalis* (JOHNSTON *et al.*, 2010; WILSON; SCHUMACHER; BURKEN, 2016). Apesar dessas limitações, *E. coli* continua a ser o indicador microbiano de contaminação fecal mais amplamente utilizados em todo o mundo (CABRAL, 2010). Por outro lado, o gene *nifH* de *Meth. smithii* detectado em efluentes tratados apresentou baixa correlação com *Enterococcus* cultiváveis, mas alta correlação com norovirus, *Cryptosporidium* spp. e *Giardia Lamblia*. Estes resultados sinalizam a possibilidade de correlação desse marcador com patógenos não removidos durante o processo de tratamento de água (ROSARIO *et al.*, 2009). A aplicação de biomarcadores de contaminação fecal MST, no presente estudo, tanto em ambientes impróprios quanto os próprios pela enumeração de *E. coli*, revelaram contaminação fecal recente de diferentes hospedeiros. Isso se deve ao fato de que *Methanobrevibacter* spp. e *Bacteroidales* são organismos anaeróbicos estritos, incapazes de se reproduzir na presença de oxigênio (UFNAR *et al.*, 2006, 2007). Essa é uma questão que requer a atenção de autoridades reguladoras, uma vez que as fezes podem carrear diversos parasitas, como *Cysticercus cellulosae* (forma larval da *Taenia solium*), *Cryptosporidium* spp. e *Ascaris suum*, além de diversas bactérias patogênicas (UFNAR *et al.*, 2007).

Nenhum indicador individualmente é capaz de revelar de forma significativa a presença de todos os patógenos na água. Altas concentrações de coliformes totais, *E. coli* em águas, geralmente, indicam a presença de contaminação fecal, independentemente da existência ou não da presença de patógenos específicos, isso quer dizer que, ausência de indicadores na água não garante a ausência de micro-organismos patogênicos (LONG; SOBSEY, 2004; LÓPEZ-PILA; SZEWZYK, 2000).

Assim como demonstrado neste estudo, os biomarcadores apresentam variações dependendo da composição e tratamento das amostras, entre outros fatores. Essas inconsistências podem gerar resultados imprecisos em relação ao rastreamento de origem da contaminação fecal (AHMED *et al.*, 2009). Esses dados nos levam a sugerir que o uso de vários marcadores na detecção e identificação da fonte de contaminação fecal é sempre recomendado.

A água representa também uma forma importante de disseminação de bactérias entre diferentes ambientes aquáticos, incluindo as águas doces consideradas *habitats* naturais que abrigam a mais rica diversidade bacteriana (VAZ-MOREIRA; NUNES; MANAIA, 2014). É bem conhecido que procariontes heterotróficos desempenham papéis relevantes na estrutura e dinâmica das redes tróficas e na remineralização da matéria orgânica (FENG *et al.*, 2009). No presente estudo, a maioria dos ambientes analisados (93,5%; 29/31) são dominados pelos filos *Proteobacteria*, *Actinobacteria* e *Bacteroidetes*. Proteobactérias apresentam grande diversidade metabólica, fato este que possibilita sua disseminação nos mais variados ambientes (QIN *et al.*, 2016).

Um dado relevante, em nosso estudo foi a alta abundância de actinobactérias na Represa Juturnaíba, que é um dos grupos mais conhecidos por conter organismos produtores de antimicrobianos e portadoras de perfis MDR, e também de uma das fontes mais prevalentes de ARG (FORSBERG *et al.*, 2014). As actinobactérias possuem acetiltransferases e fosfotransferases, que representam o maior mecanismo de resistência aos aminoglicosídeos (FORSBERG *et al.*, 2014), também detectados nos ambientes estudados.

Poluições físicas, químicas e biológicas podem influenciar na composição microbiana, com efeitos potenciais na qualidade e segurança da água. Embora a manutenção de um suprimento seguro e confiável de água potável seja de importância crítica, relativamente poucos microrganismos potencialmente patogênicos são reconhecidos e menos ainda regulamentados (STANISH *et al.*, 2016).

A homogeneidade entre as comunidades bacterianas reveladas no presente estudo pode ser explicada pelo processo de urbanização. É bem conhecido que esta leva à descarga de altas cargas de resíduos e esgoto tratados não tratado contendo fezes e compostos xenobióticos em corpos de água (MEDEIROS *et al.*, 2016; PAUL;

MEYER, 2008). É importante ressaltar que em nosso estudo foi revelada a presença de contaminação fecal, antimicrobianos e metais traços em todos os ambientes analisados. Assim, podemos sugerir que as altas cargas de esgoto lançadas nestas águas proporcionaram um ambiente seletivo para a disseminação de *Gammaproteobacteria* e *Bacteroidia*. Já ambientes aquáticos não impactados pela urbanização apresentam maior prevalência dos filos *Acidobacteria* e *Verrucomicrobia* (MEDEIROS *et al.*, 2016).

O tratamento da água potável tem como objetivo reduzir a carga microbiana, o que explica que a *alpha* e *Beta* diversidades das comunidades microbianas de águas não tratadas foram superiores comparadas com as comunidades de água potável. A *alpha* diversidade é a média de espécies em escala local (NOGUEIRA *et al.*, 2008; TUOMISTO, 2010), e a *Beta* diversidade é a razão entre a diversidade de espécies regionais e locais. Como esperado, a *Beta* diversidade das amostras do Guandu e São João foram diferentes, e as comunidades das amostras de água potável foram reduzidas, mas agrupadas com as águas das bacias (Figuras 16 e 17).

Nossos resultados revelaram a alta abundância do filo *Thaumarchaeota* em 45% (14/31), um filo composto por organismos mesofílicos que desenvolvem importante papel nos ciclos geobioquímicos, como o ciclo do nitrogênio (BROCHIER-ARMANET *et al.*, 2008). Desta forma, esses microrganismos estão amplamente difundidos no ambiente aquático, sejam eles urbanizados ou não (MEDEIROS *et al.*, 2016).

Por outro lado, 55% (17/31) das amostras apresentaram predominância de *Euryarchaeota*. Metanogênicos como *Methanobacteria* e *Methanomicrobia* representaram a maior proporção da meta-comunidade de arqueas de sistemas aquáticos eutrofizados (COMPTE-PORT *et al.*, 2017). Fato esse que corrobora com os resultados observados em relação à contaminação fecal hospedeiro-específico, já que os bioindicadores utilizados são membros da classe *Methanobacteria*.

Outra classe que merece destaque em nossos resultados é *Bathyarchaeia*, classe geralmente encontrada em sedimentos marinhos e de água doce (FILLLOL *et al.*, 2016) e seus membros são encontrados abundantemente em lagos de montanha livres de contaminação (ZHANG *et al.*, 2015). Embora a plena compreensão do potencial metabólico deste filo esteja longe de ser elucidada, evidências sugerem a

capacidade de assimilar matéria orgânica como compostos aromáticos ou proteínas detríticas (LLOYD *et al.*, 2013; MENG *et al.*, 2014). Mais recentemente, genes homólogos necessários para o metabolismo do metano também foram encontrados em dois genomas de *Bathyarchaeia*, sugerindo que membros desse filo podem contribuir para o ciclo do metano em sedimentos (EVANS *et al.*, 2015).

Um *core microbiome* é constituído pelos membros comuns a duas ou mais comunidades microbianas associadas a um *habitat* (SHADE; HANDELSMAN, 2012). O gênero *Variovorax* foi considerado um dos gêneros conhecidos integrantes do *core* microbiano dos ambientes analisados. Muitos membros deste gênero são associados a importantes processos catabólicos, incluindo a degradação de compostos químicos tóxicos e/ou complexos (SATOLA; WÜBBELER; STEINBÜCHEL, 2013). Vale destacar que também foram indicados como membros deste *core* os gêneros *Pseudomonas* e *Acinetobacter*, que também estão entre os gêneros mais tolerantes aos metais mais isolados em nosso estudo.

A interpretação dos plasmídeos revelou alta abundância do sistema de efluxo *czc* (cobalto-zinco-cádmio) em todos os ambientes analisados (Figura 20). O sistema *czc* de efluxo está intimamente associado a locais impactados com petróleo, lodo, metais e outros resíduos urbanos (CABRAL *et al.*, 2016). Além disso, há uma grande preocupação quanto à relação desse sistema e o aumento da resistência antimicrobiana. Linhagens de *P. aeruginosa* isoladas a partir de cateteres urinários, susceptíveis aos carbapenêmicos, carreando o operon *czc*, demonstraram resistência ao imipenem, quando expostas ao zinco. A análise de mecanismos de resistência cruzada revelou co-regulação da super-expressão de *czcR* e a diminuição na expressão de *oprD*, porina associada à resistência aos carbapenêmicos, especialmente ao imipenem (CONEJO *et al.*, 2003; PERRON *et al.*, 2004).

Vários tipos de ARGs detectados em nosso estudo, também foram relatados em águas ambientais, sedimentos e solos, água potável e influentes e efluentes de ETAR (LI *et al.*, 2015; NESME *et al.*, 2014). Um dado relevante foi a presença de diversos genes codificadores de enzimas MBLs (*metallo-β-lactamases*) e carbapenemases, além do gene *mcr* (*mobile colistin resistance*), que confere resistência à polimixina, associado a plasmídeos. O aumento da incidência de ARGs, principalmente aqueles encontrados em microrganismos de origem clínica, é

amplamente observado em resistomas de ambientes eutrofizados. No entanto, o papel do ambiente como origem e fonte de ARGs permanece pouco explorado e controverso (FONSECA; ANDRADE; VICENTE, 2018).

A produção de enzimas β -lactamases é o mecanismo mais comum de resistência bacteriana aos antimicrobianos β -lactâmicos (ROSSOLINI *et al.*, 2001). No presente estudo, foram encontrados genes codificadores de carbapenemases apenas na bacia Guandu. Porém, bactérias Gram-negativas carreando genes de resistência aos carbapenêmicos já foram isoladas de amostras de rios, águas residuais e potável enfatizando o seu elevado potencial de disseminação no ambiente (MARATHE *et al.*, 2017; PIEDRA-CARRASCO *et al.*, 2017). Já os genes de MBLs foram encontrados nas duas bacias e na água potável.

As MBLs são capazes de hidrolisar antimicrobianos β -lactâmicos, incluindo carbapenêmicos e cefalosporinas de 3ª e 4ª geração (MOMBINI *et al.*, 2019). Além de outros genes de resistência aos carbapenêmicos, o gene *bla_{AIM-1}* foi encontrado na amostra de água potável, no presente estudo. Este gene foi descrito inicialmente em *P. aeruginosa* na Austrália e é flanqueado por dois elementos ISCR (*Insertion sequence common region*), o que favorece sua disseminação (YONG *et al.*, 2012). Em geral, linhagens carreando genes MBLs são MDR e apresentam limitações terapêuticas. Além disso, a descrição de genes codificadores de MBLs associados a MGEs aumentou consideravelmente a atenção a essas enzimas, incluindo-as entre as principais ameaças a saúde humana para o século XXI (ISLAM *et al.*, 2014; MOMBINI *et al.*, 2019).

Além disso, o gene *mcr-4* também foi encontrado apenas nas amostras de água potável. O gene *mcr-1* foi descrito pela primeira vez em *Enterobacteriaceae* isoladas de animais, alimentos e seres humanos na China em 2016 (LIU *et al.*, 2016). O gene *mcr-4* foi identificado em *Salmonella enterica* isolada de um porco em abate na Itália em 2013, e em *E. coli* coletadas durante diagnóstico de rotina de diarreia pós-desmame em porcos da Espanha e Bélgica em 2015 e 2016 (CARATTOLI *et al.*, 2017). Até o momento, essa variante do gene *mcr* não foi descrita no Brasil, seja em isolados bacterianos ou através de estudos metagenômicos.

A colistina é amplamente utilizada como um promotor de crescimento para melhorar o ganho de peso em criações de animais em alguns países asiáticos,

incluindo China, Índia, Japão e Vietnã (KEMPF; JOUY; CHAUVIN, 2016). Na Europa, é, principalmente, utilizada para tratar infecções causadas por *Enterobacteriaceae* em porcos, galinhas, vacas, ovelhas e cabras (CATRY *et al.*, 2015). No Brasil a colistina vem sendo amplamente adicionada à ração animal, como promotora de crescimento na pecuária, em suínos e aves (FERNANDES *et al.*, 2016).

A disseminação global de bactérias MDR de origem clínica resultou no retorno do uso de colistina, apesar de sua toxicidade (CARATTOLI *et al.*, 2018). O aumento da resistência à colistina em todo o mundo, ameaça a eficácia de um dos antimicrobianos de último recurso utilizados para o tratamento de infecções, principalmente, ocasionadas por enterobactérias (CHEN *et al.*, 2018b).

A resistência generalizada aos antimicrobianos representa uma séria ameaça à saúde humana, uma vez que está associada à perda do potencial terapêutico dos antibióticos e à consequente morbidade e mortalidade (ASHBOLT *et al.*, 2013). Atualmente, estudos sugerem que compostos químicos que não sejam antimicrobianos também podem selecionar e estimular a resistência antimicrobiana, e incluem metais pesados (SEILER; BERENDONK, 2012), desinfetantes (ZHANG *et al.*, 2017), subprodutos de desinfecção (LI *et al.*, 2016) e nanomateriais (DING *et al.*, 2016).

Neste estudo foram utilizados oito metais traço (As, Co, Cr, Cu, Hg, Pb, U e Zn) para selecionar microrganismos tolerantes aos mesmos. A bacia São João apresentou o maior número de isolados, seguido pela bacia Guandu e amostras de água potável. Este fato pode ser explicado pelos níveis mais elevados de diferentes metais como alumínio, ferro e urânio observados nas amostras da bacia São João, o que representa uma pressão seletiva contínua neste ambiente aquático. Além disso, as amostras de água potável passam por tratamento e desinfecção, reduzindo assim a concentração de microrganismos e dificultando sua sobrevivência.

Diferentes espécies bacterianas podem evoluir através de diferentes modificações genômicas que incluem mutações, rearranjos ou HGT (JUHAS *et al.*, 2009). MGEs podem conferir propriedades adaptativas como virulência, resistência a antimicrobianos e metais, degradação de compostos xenobióticos e a formação de novas vias metabólicas (HERNÁNDEZ-RAMÍREZ *et al.*, 2018). A co-ocorrência de genes de resistência a metais e antimicrobianos, principalmente, em plasmídeos,

pode promover a resistência aos antibióticos devido à exposição ao metal, o que se tornou um grande problema de saúde em ambientes clínicos (PAL *et al.*, 2015).

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram uma grande variedade de gêneros bacterianos (n = 34). Um subgrupo de quatro gêneros (*Pseudomonas* spp. (n = 92), *Serratia* spp. (n = 71), *Acinetobacter* spp. (n = 51), e *Klebsiella* spp. (n = 51)) foi escolhido para nossa investigação com base em sua abundância nas amostras. Inicialmente, avaliamos o perfil de susceptibilidade destes gêneros aos metais, *Serratia* spp. e *Klebsiella* spp. apresentaram menor susceptibilidade aos metais, além disso, apresentaram maior percentual de linhagens PMT (44% *Serratia* spp. e 24% *Klebsiella* spp.).

Várias bactérias são capazes de alterar o estado de oxidação de metais, como ferro, cromo, urânio e arsênico, através de vários processos metabólicos, sendo a maioria do filo *Proteobacteria* (BOOTHMAN *et al.*, 2006). Os gêneros bacterianos mais comumente tolerantes a altas concentrações de metais são *Acidithiobacillus* spp., *Desulfovibrio* spp., *Escherichia* spp., *Cupriavidus* spp., *Ochrobactrum* spp., *Streptomyces* spp., *Micrococcus* spp., *Acinetobacter* spp. e *Pseudomonas* spp. (MEJIAS CARPIO; ANSARI; RODRIGUES, 2018). Além disso, *Klebsiella* spp. pode apresentar mecanismos de precipitação de metais permitindo assim, maior tolerância aos mesmos (AIKING *et al.*, 1984).

O gênero *Serratia* ganhou destaque na área de biorremediação de áreas contaminadas por metais, principalmente por urânio, quando uma linhagem demonstrou capacidade de bioprecipitar urânio como um mineral de fosfato de urânio por meio de sua atividade fosfatásica sob condições aeróbias em meio suplementado com fosfato de glicerol (CHANDWADKAR; MISRA; ACHARYA, 2018).

Além da tolerância aos metais, também avaliamos o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados. Trinta e um por cento dos isolados (82/265; 4 *Acinetobacter* spp., 17 *Klebsiella* spp., 14 *Pseudomonas* spp., e 47 *Serratia* spp.) foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados. O perfil XDR foi observado apenas em *Acinetobacter* spp. (10%, 5/51 XDR) e *Pseudomonas* spp. (8%, 7/92 XDR), e o perfil PDR apenas em *Pseudomonas* spp. (3%, 3/92 PDR).

É importante ressaltar que uma linhagem de *Pseudomonas* spp. recuperada de água potável, do bairro Centro apresentou perfil XDR, sendo sensível apenas ao imipenem. De maneira geral, o tratamento de água ocorre pela remoção de

partículas suspensas e coloidais, matéria orgânica, microrganismos e outras substâncias que causem impactos negativos à saúde. No Brasil, existem cerca de 7.500 ETAs e aproximadamente 75% destas, utilizam processo denominado convencional para tratamento da água. Este processo emprega a sedimentação seguida de floculação, decantação, filtração, desinfecção e fluoretação (BETANCOURT; ROSE, 2004; BOTERO *et al.*, 2009; JIA *et al.*, 2015). Entretanto, a desinfecção da água potável, pelo cloro, pode contribuir para o aumento de ARGs, provavelmente por mecanismos de resistência cruzada ou co-resistência a desinfetantes e antimicrobianos (XI *et al.*, 2009). Esses mecanismos podem ser responsáveis pela disseminação de ARB, como os relatados aqui, nos ecossistemas aquáticos (SHI *et al.*, 2013). Além disso, *Pseudomonas* spp. são os contaminantes mais comuns dos sistemas de água potável, além de serem recuperados ambientes controlados como salas limpa, que possuem fontes de água (VIJAYAKUMAR; SANDLE, 2018).

As estações de tratamento de água potável não removem de forma eficiente antimicrobianos, desinfetantes e metais. Como resultado, bactérias carreando determinantes de resistência, ou que são capazes de adquiri-los, podem aumentar durante as várias etapas do tratamento (BERGERON *et al.*, 2015; XI *et al.*, 2009). Conseqüentemente, um grande número de bactérias contendo MGE pode ser liberado nos sistemas de abastecimento (COLOMER-LLUCH; JOFRE; MUNIESA, 2011; MARTÍNEZ, 2008).

Metais como cobre, zinco e urânio geralmente estão presentes em concentrações sub-inibitórias, ou seja, abaixo da concentração inibitória mínima (CIM) (SEILER; BERENDONK, 2012) no solo (TENG *et al.*, 2014) e água (WASEEM *et al.*, 2014). Em concentrações inibitórias de metais as taxas de transferência horizontal praticamente cessam, entretanto, em níveis sub-inibitórios essas mesmas taxas são consideravelmente aumentadas (ZHANG *et al.*, 2017).

Neste estudo selecionamos cobre e zinco na avaliação da interferência de metais na resistência aos antimicrobianos, devido ao elevado número de isolados tolerantes a estes metais. Os perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados sensíveis a todos os antimicrobianos (82/265; 4 *Acinetobacter* spp., 14 *Pseudomonas* spp., 17 *Klebsiella* spp., e 47 *Serratia* spp.) foram novamente avaliados na presença destes metais. Vinte e quatro por cento não apresentaram

nenhuma alteração no perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos. Foi notável que as concentrações mais altas apresentaram maior impacto no perfil de susceptibilidade antimicrobiana.

Muitos estudos relatam a presença de resistência co-regulada entre antimicrobianos carbapenêmicos e diferentes metais, como zinco, cádmio cobalto e cobre, através de mecanismos regulatórios comuns à resistência a ambos compostos (CAILLE; ROSSIER; PERRON, 2007; DIEPPOIS *et al.*, 2012; FAJARDO *et al.*, 2014; PERRON *et al.*, 2004). Entretanto, em nosso estudo observamos não apenas a indução da resistência aos carbapenêmicos, mas também a outros antimicrobianos não pertencentes à classe dos β -lactâmicos. Cinquenta por cento (41/82) apresentaram resistência a gentamicina na presença de zinco, enquanto 48% (39/82) apresentou resistência a ciprofloxacina na presença deste mesmo metal. Na presença do cobre 46% (38/82) e 45% (37/82) apresentaram resistência a gentamicina e ciprofloxacina, respectivamente.

Recentemente, um estudo avaliou o papel do regulador da absorção de zinco Zur, membro da família do regulador de absorção férrico (Fur) no perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de *A. baumannii*. A inativação do gene *zur* aumentou a susceptibilidade deste microrganismo à colistina, gentamicina, rifampicina e tigeciclina (AJIBOYE; SKIEBE; WILHARM, 2018). Embora essa associação tenha sido relatada nessa espécie bacteriana nossos dados nos levam a sugerir a presença de bombas de efluxo expressas apenas na presença dos metais.

Bombas de efluxo são os principais componentes defensivos de bactérias que ativamente expulsam compostos nocivos do periplasma e/ou citoplasma, diminuindo assim sua concentração intracelular (MARTINS *et al.*, 2011; PAIXÃO *et al.*, 2009). Estes sistemas são encontrados em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, no entanto, a resistência mediada por efluxo em bactérias Gram-negativas é mais complexa devido à arquitetura molecular do envelope celular (KUMAR; SCHWEIZER, 2005).

Os sistemas de efluxo que expulsam uma ampla gama de compostos nocivos quimicamente e estruturalmente não relacionados da bactéria, o fazem de maneira dependente de energia, sem modificação da estrutura, contribuindo para o fenótipo MDR de importantes patógenos bacterianos (OLAITAN; MORAND; ROLAIN, 2014; WEBBER; PIDDOCK, 2003). A expressão das bombas de efluxo de multidrogas

(*multidrug efflux pumps* - MEPs) é rigorosamente regulada, na grande maioria o nível de expressão é muito baixo, pelo menos sob condições de cultivo em laboratório (PIDDOCK, 2006b). Um nível mais alto de expressão e, portanto, de resistência antimicrobiana pode ser alcançado de duas maneiras; transitoriamente, na presença de indutores da expressão das bombas de efluxo, como os metais, ou constitutivamente, devido a mutações nos elementos que diminuem sua expressão. Vários estudos destacaram a contribuição das MEPs para a aquisição de resistência a múltiplos fármacos por diferentes patógenos (BLANCO *et al.*, 2016; POOLE, 2007; YU *et al.*, 2017).

Os dados obtidos neste estudo revelaram a indução de bombas de efluxo em 76% (62/82) dos isolados selecionados, uma vez que, na presença de zinco e cobre o poder de extrusão celular foi maior que o observado na ausência destes metais. Todavia, os 20 isolados que não apresentaram nenhuma alteração no perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, também não apresentaram nenhuma alteração no efluxo celular na presença de metais. O que corrobora com a hipótese da indução de MEPs na alteração dos perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos em nossos isolados. Embora a expressão de uma única MEP possa conferir resistência a múltiplos antimicrobianos, a super-expressão simultânea de mais de um sistema de efluxo já foi descrita em *P. aeruginosa* (LLANES *et al.*, 2004; POONSUK; TRIBUDDHARAT; CHUANHUEN, 2014) e *Stenotrophomonas maltophilia* (GOULD; OKAZAKI; AVISON, 2013).

A linhagem de *P. putida* DOT-TE1 é capaz de resistir a altas concentrações de solventes, em parte devido à atividade de TtgABC, uma bomba de efluxo tripartite RND implicada na tolerância ao tolueno. Mutações inativaram o regulador de expressão deste gene o que levou à superexpressão da bomba de efluxo, tornando esta linhagem mais resistente ao cloranfenicol, ácido nalidíxico e tetraciclina (DUQUE *et al.*, 2001). Além disso, a expressão deste sistema de efluxo também é induzida por eritromicina, colistina, ceftazidima e ciprofloxacina, bem como por narigenina e tolueno (TERÁN *et al.*, 2003).

A presença de MEPs em bactérias não se restringe a ambientes clínicos, visto que além de conferir resistência aos antimicrobianos, as bombas de efluxo podem ter funções relevantes para a sobrevivência bacteriana em ambientes naturais. Espécies bacterianas ambientais apresentam um maior número de genes que

codificam as bombas de efluxo. Porém, ainda não foi estabelecida uma correlação entre o número de MEPs encontradas em cada genoma e os perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos (KONSTANTINIDIS; TIEDJE, 2004; YOUENOU *et al.*, 2015).

Além disso, a expressão de MEPs também é induzida por compostos produzidos pelo hospedeiro o que sugere que elas podem desempenhar um papel na virulência bacteriana (PIDDOCK, 2006a). A bomba de efluxo de *Vibrio cholerae* VexB é o principal sistema de efluxo responsável pela resistência aos sais biliares neste microrganismo (BINA *et al.*, 2008, 2018). Por outro lado, em *Neisseria gonorrhoeae* a bomba de efluxo MtrCDE contribui para a resistência a péptidos antimicrobianos (WARNER *et al.*, 2007) e o FarAB está envolvido na resistência a ácidos graxos de cadeia longa (LEE; SHAFER, 1999), contribuindo para sua patogenicidade (JERSE *et al.*, 2003).

MEPs apresentam diferentes funções com relevância para a adaptação bacteriana a diferentes habitats. Algumas dessas funções, como a resistência a metais pesados assemelham-se à resistência a antimicrobianos, uma vez que são respostas adaptativas a diferentes tipos de estresse. As informações atualmente disponíveis apoiam a tese de que, além de contribuir para a resistência aos antimicrobianos, as MEPs apresentam uma variedade de funções com relevância para o comportamento bacteriano em diferentes ecossistemas.

Os dados obtidos no presente estudo confirmam a relevância de estudos voltados à avaliação da influência de poluentes químicos e biológicos nas comunidades microbianas e na disseminação e persistência do resistoma microbiano, em ambientes aquáticos brasileiros. Nossos resultados revelam dados inéditos capazes de contribuir para o aprimoramento de ações da vigilância ambiental e epidemiológica, o que caracteriza sua extrema relevância para a saúde pública.

7 CONCLUSÕES

- Nossos resultados revelaram altos níveis de poluição químicos e biológicos, nas águas destinadas ao abastecimento público no Rio de Janeiro, o que compromete tanto a qualidade como o tratamento dessas águas;
- Resíduos de antimicrobianos foram encontrados, tanto nas águas não tratadas, quanto na água potável; altas concentrações de urânio, ferro e alumínio foram detectadas nas águas não tratadas;
- Biomarcadores de contaminação fecal hospedeiro-específicos humana, bovina, suíno e equino foram encontrados em ambientes considerados próprios e impróprios pela legislação vigente, demonstrando sua alta sensibilidade e baixa correlação com os indicadores convencionais;
- A prevalência de filos *Proteobacteria*, *Actinobacteria* e *Bacteroidetes* nas águas estudadas, pode estar relacionada ao constante descarte de efluentes não tratados nesses corpos hídricos; Além da predominância de *Euryarchaeota* e *Thaumarchaeota* em 55% (17/31) e 45% (14/31) das amostras, respectivamente;
- Elevadas cargas de poluentes na bacia do Guandu podem ter promovido maior diversidade do resistoma microbiano quando comparado com as águas da bacia de São João e da água potável;
- Embora o tratamento das águas tenha sido considerado satisfatório, microrganismos multidroga resistentes e genes de resistência aos antimicrobianos e metais foram encontrados na água potável;
- A presença de metais traço, como zinco e cobre, induziu a resistência a diferentes classes de antimicrobianos, por mecanismos de resistência cruzada ou co-regulada, e bombas de efluxo.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS. **Plano estratégico de recursos hídricos da bacia hidrográfica dos Rios do Guandu, da Guarda e Guandu-Mirim**. Disponível em: <http://www.comiteguandu.org.br/conteudo/livroguandu2013.pdf>.

AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS. **Atlas de esgotos: despoluição de bacias hidrográficas**. Brasília: [s.n.].

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução nº 44 de 28 de outubro de 2010. **Diário Oficial da União**, Brasil, 2010.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução nº 20, de 5 de maio de 2011. **Diário Oficial da União**, 2011.

AHMED, W. *et al.* Comparison of molecular markers to detect fresh sewage in environmental waters. **Water Research**, 2009.

AHMED, W.; GYAWALI, P.; TOZE, S. Quantitative PCR measurements of *Escherichia coli* including shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) in animal feces and environmental waters. **Environmental science & technology**, v. 49, n. 5, p. 3084–90, 3 mar. 2015.

AIKING, H. *et al.* Inorganic phosphate accumulation and cadmium detoxification in *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 growing in continuous culture. **Applied and Environmental Microbiology**, 1984.

AJIBOYE, T. O.; SKIEBE, E.; WILHARM, G. Impact of zinc uptake regulator Zur on the sensitivity and oxidative stress response of *Acinetobacter baumannii* to antibiotics. **International journal of antimicrobial agents**, 7 dez. 2018.

AL-QAIM, F. F. *et al.* Investigation of the Environmental Transport of Human Pharmaceuticals to Surface Water: A Case Study of Persistence of Pharmaceuticals in Effluent of Sewage Treatment Plants and Hospitals in Malaysia. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2015.

ALMEIDA, R. M. R. *et al.* Groundwater radon, radium and uranium concentrations in Região dos Lagos, Rio de Janeiro State, Brazil. **Journal of environmental radioactivity**, v. 73, n. 3, p. 323-34, 2004.

ALONSO, A.; SÁNCHEZ, P.; MARTÍNEZ, J. L. Environmental selection of antibiotic resistance genes. **Environmental microbiology**, v. 3, n. 1, p. 1-9, jan. 2001.

AMINOV, R. I.; MACKIE, R. I. Evolution and ecology of antibiotic resistance genes. **FEMS microbiology letters**, v. 271, n. 2, p. 147-61, jun. 2007.

ANDREWS, S. **FastQC**: a quality control tool for high throughput sequence data. Babraham Bioinformatics. 2010. Disponível em:

<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:FastQC+a+quality+control+tool+for+high+throughput+sequence+data.#0>.

ANSTEAD, L.; BOAR, R. R. Willow Spiling: Review of Streambank Stabilisation Projects in the UK. **Freshwater Reviews**, v. 3, n. 1, p. 33-47, jun. 2010.

APHA/AWWA/WEF. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. [s.l: s.n.].

ARRIGO, K. R. Marine microorganisms and global nutrient cycles. **Nature**, v. 437, n. 7057, p. 349-55, 15 set. 2005.

ASHBOLT, N. J. *et al.* Human health risk assessment (HHRA) for environmental development and transfer of antibiotic resistance. **Environmental Health Perspectives. Environ Health Perspect.**, v. 121, n. 9, p. 993-1001, 2013.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Crise hídrica: uma realidade brasileira**. [s.l: s.n.].

BAGER, F. *et al.* **DANMAP 2014 - Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark**. Disponível em: www.danmap.org%5CnThis.

BAKER-AUSTIN, C. *et al.* Co-selection of antibiotic and metal resistance. **Trends in Microbiology**, v. 14, n. 4, p. 176-182, abr. 2006.

BANKEVICH, A. *et al.* SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. **Journal of computational biology : a journal of computational molecular cell biology**, v. 19, n. 5, p. 455-77, maio 2012.

BAQUERO, F.; MARTÍNEZ, J.-L.; CANTÓN, R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 260-265, jun. 2008.

BARCELLOS, C.; QUITÉRIO, L. A. D. [Environmental surveillance in health in Brazil's Unified Health System]. **Revista de saude publica**, v. 40, n. 1, p. 170-7, fev. 2006.

BEHERA, S. K. *et al.* Occurrence and removal of antibiotics, hormones and several other pharmaceuticals in wastewater treatment plants of the largest industrial city of Korea. **The Science of the total environment**, v. 409, n. 20, p. 4351-60, 15 set. 2011.

BEN, Y. *et al.* Human health risk assessment of antibiotic resistance associated with antibiotic residues in the environment: A review. **Environmental research**, v. 169, p. 483-493, 26 nov. 2018.

BENDERLI CIHAN, Y.; SÖZEN, S.; ÖZTÜRK YILDIRIM, S. Trace Elements and Heavy Metals in Hair of Stage III Breast Cancer Patients. **Biological Trace Element**

Research, v. 144, n. 1-3, p. 360-379, 10 dez. 2011.

BENOTTI, M. J. *et al.* Pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in U.S. drinking water. **Environmental science & technology**, v. 43, n. 3, p. 597-603, fev. 2009.

BERGAMASCO, A. M. D. D. *et al.* Contaminantes quimicos em aguas destinadas ao consumo humano no Brasil. **Cad. Saude Colet.**, v. 19, n. 4, p. 479-486, 2011.

BERGERON, S. *et al.* Presence of antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes in raw source water and treated drinking water. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 102, p. 370-374, ago. 2015.

BETANCOURT, W. Q.; ROSE, J. B. Drinking water treatment processes for removal of *Cryptosporidium* and *Giardia*. **Veterinary parasitology**, v. 126, n. 1-2, p. 219-34, 9 dez. 2004.

BIANCO, K. *et al.* Fecal pollution source tracking in waters intended for human supply based on archaeal and bacterial genetic markers. **Journal of water and health**, v. 13, n. 4, p. 985-95, dez. 2015.

BINA, X. R. *et al.* *Vibrio cholerae* RND family efflux systems are required for antimicrobial resistance, optimal virulence factor production, and colonization of the infant mouse small intestine. **Infection and Immunity**, 2008.

BINA, X. R. *et al.* The *Vibrio cholerae* RND efflux systems impact virulence factor production and adaptive responses via periplasmic sensor proteins. **PLoS Pathogens**, 2018.

BLANCO, P. *et al.* Bacterial Multidrug Efflux Pumps: Much More Than Antibiotic Resistance Determinants. **Microorganisms**, 2016.

BLATCHLEY, E. R. *et al.* Effects of wastewater disinfection on waterborne bacteria and viruses. **Water environment research : a research publication of the Water Environment Federation**, v. 79, n. 1, p. 81-92, jan. 2007.

BOEHM, A. B. *et al.* A sea change ahead for recreational water quality criteria. **Journal of water and health**, v. 7, n. 1, p. 9-20, mar. 2009.

BOOTHMAN, C. *et al.* Molecular analysis of a sulphate-reducing consortium used to treat metal-containing effluents. **BioMetals**, 2006.

BOTERO, W. G. *et al.* Caracterização de lodo gerado em estações de tratamento de água: perspectivas de aplicação agrícola. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2018-2022, 2009.

BOXALL, A.-M.; LEEDER, S. R. The health system: what should our priorities be? **Health promotion journal of Australia : official journal of Australian Association of Health Promotion Professionals**, v. 17, n. 3, p. 200-5, dez. 2006.

BRAGA, B. *et al.* **Introdução à engenharia ambiental**: o desafio do desenvolvimento sustentável. 2. ed. São Paulo: Prentice Hall, 2005.

BRANCO, R. *et al.* The chromate-inducible chrBACF operon from the transposable element TnOtChr confers resistance to chromium(VI) and superoxide. **Journal of bacteriology**, v. 190, n. 21, p. 6996-7003, nov. 2008.

BROCHIER-ARMANET, C. *et al.* Mesophilic crenarchaeota: Proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. **Nature Reviews Microbiology**, 2008.

CABRAL, L. *et al.* Anthropogenic impact on mangrove sediments triggers differential responses in the heavy metals and antibiotic resistomes of microbial communities. **Environmental Pollution**, 2016.

CAILLE, O.; ROSSIER, C.; PERRON, K. A copper-activated two-component system interacts with zinc and imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of bacteriology**, v. 189, n. 13, p. 4561-8, jul. 2007.

CAPORASO, J. G. *et al.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature methods**, v. 7, n. 5, p. 335-6, maio 2010.

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**, 2017.

CARATTOLI, A. *et al.* Comparative analysis of an mcr-4 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* monophasic variant of human and animal origin. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, 2018.

CARDOSO, O.; PORCHER, J.-M.; SANCHEZ, W. Factory-discharged pharmaceuticals could be a relevant source of aquatic environment contamination: review of evidence and need for knowledge. **Chemosphere**, v. 115, p. 20-30, nov. 2014.

CARDOZA, L. A. *et al.* Factors Affecting the Fate of Ciprofloxacin in Aquatic Field Systems. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 161, n. 1-4, p. 383-398, fev. 2005.

CATRY, B. *et al.* Use of colistin-containing products within the European Union and European Economic Area (EU/EEA): development of resistance in animals and possible impact on human and animal health. **International journal of antimicrobial agents**, v. 46, n. 3, p. 297–306, set. 2015.

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. **Centro de Vigilância Epidemiológica**, 2014.

CHANDWADKAR, P.; MISRA, H. S.; ACHARYA, C. Uranium biomineralization induced by a metal tolerant: *Serratia* strain under acid, alkaline and irradiated conditions. **Metallomics**, 2018.

CHAPMAN, J. S. Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 51, n. 4, p. 271-276, jun. 2003.

CHAUDHARY, K. *et al.* Iron Overload Accelerates the Progression of Diabetic Retinopathy in Association with Increased Retinal Renin Expression. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 3025, 14 fev. 2018.

CHEN, B. *et al.* Global land-water nexus: agricultural land and freshwater use embodied in worldwide supply chains. **The Science of the total environment**, v. 613-614, p. 931-943, 1 fev. 2018a.

CHEN, L. *et al.* Newly identified colistin resistance genes, *mcr-4* and *mcr-5*, from upper and lower alimentary tract of pigs and poultry in China. **PLoS ONE**, 2018b.

COLOMER-LLUCH, M.; JOFRE, J.; MUNIESA, M. Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of environmental samples. **PloS one**, v. 6, n. 3, p. e17549, 3 mar. 2011.

COMITÊ DAS BACIAS HIDROGRÁFICAS DAS LAGOAS DE ARARUAMA, S. E DOS R. S. J. E U. **Comitê das Bacias Hidrográficas das Lagoas de Araruama, Saquarema e dos Rios São João e Una.**

COMPTE-PORT, S. *et al.* Abundance and Co-Distribution of Widespread Marine Archaeal Lineages in Surface Sediments of Freshwater Water Bodies across the Iberian Peninsula. **Microbial ecology**, v. 74, n. 4, p. 776-787, 2017.

CONEJO, M. C. *et al.* Zinc eluted from siliconized latex urinary catheters decreases OprD expression, causing carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 47, n. 7, p. 2313-5, jul. 2003.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução CONAMA nº 274 de 29 de novembro de 2000. Define os critérios de balneabilidade em águas brasileiras. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, n. 18, p. 70-71, 25 jan. 2001.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **Resolução nº 357, de 17 de março de 2005.** **Diário Oficial Brasil**, 2005.

COSTA, P. S. *et al.* Bacteria and genes involved in arsenic speciation in sediment impacted by long-term gold mining. **PloS one**, v. 9, n. 4, p. e95655, 2014.

CUI, L. *et al.* Surface-Enhanced Raman Spectroscopy for Identification of Heavy Metal Arsenic(V)-Mediated Enhancing Effect on Antibiotic Resistance. **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 6, p. 3164-3170, 15 mar. 2016.

D'COSTA, V. M. *et al.* Sampling the antibiotic resistome. **Science (New York, N.Y.)**, v. 311, n. 5759, p. 374-7, 20 jan. 2006.

DAVIS, I. J. *et al.* Linkage of a novel mercury resistance operon with streptomycin resistance on a conjugative plasmid in *Enterococcus faecium*. **Plasmid**, v. 54, n. 1, p. 26-38, jul. 2005.

DE LIMA E SILVA, A. A. *et al.* Heavy metal tolerance (Cr, Ag and Hg) in bacteria isolated from sewage. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2012.

DHARIWAL, A. *et al.* MicrobiomeAnalyst: a web-based tool for comprehensive statistical, visual and meta-analysis of microbiome data. **Nucleic acids research**, v. 45, n. W1, p. W180-W188, 3 jul. 2017.

DI CESARE, A. *et al.* Co-occurrence of integrase 1, antibiotic and heavy metal resistance genes in municipal wastewater treatment plants. **Water Research**, v. 94, p. 208-214, maio 2016.

DI CESARE, A.; ECKERT, E.; CORNO, G. Co-selection of antibiotic and heavy metal resistance in freshwater bacteria. **Journal of Limnology**, v. 75, n. s2, p. 59-66, 13 abr. 2016.

DIEPPOIS, G. *et al.* The transcriptional regulator CzcR modulates antibiotic resistance and quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. **PLoS ONE**, 2012.

DING, C. *et al.* Enhanced uptake of antibiotic resistance genes in the presence of nanoalumina. **Nanotoxicology**, v. 10, n. 8, p. 1051-60, 2016.

DING, C.; HE, J. Effect of antibiotics in the environment on microbial populations. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 87, n. 3, p. 925–41, jul. 2010.

DINSDALE, E. A. *et al.* Functional metagenomic profiling of nine biomes. **Nature**, 2008.

DONG, D. *et al.* Antibiotics in water and sediments from Liao River in Jilin Province, China: occurrence, distribution, and risk assessment. **Environmental Earth Sciences**, 2016.

DUQUE, E. *et al.* Global and cognate regulators control the expression of the organic solvent efflux pumps TtgABC and TtgDEF of *Pseudomonas putida*. **Molecular Microbiology**, 2001.

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.** Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 2012.

ENGEMANN, C. A. *et al.* Disappearance of oxytetracycline resistance genes in aquatic systems. **FEMS microbiology letters**, v. 263, n. 2, p. 176-82, out. 2006.

ENGLERT, B.; EPA. **Method 1694:** pharmaceuticals and personal care products in water, soil, sediment, and biosolids by HPLC/MS/MS. Washington: U.S.

Environmental Protection Agency. , 2007. p. 1-77. (EPA Method).

EUCAST. **Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters**. 2016. p. 35-44.

EVANS, P. N. *et al.* Methane metabolism in the archaeal phylum Bathyarchaeota revealed by genome-centric metagenomics. **Science**, New York, v. 350, n. 6259, p. 434–8, 23 out. 2015.

FAJARDO, A. *et al.* Characterization of a novel Zn²⁺-dependent intrinsic imipenemase from *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2014.

FAJARDO, A.; LINARES, J. F.; MARTÍNEZ, J. L. Towards an ecological approach to antibiotics and antibiotic resistance genes. **Clinical microbiology and infection**, v. 15, supl. 1, p. 14-6, jan. 2009.

FENG, B.-W. *et al.* Bacterial diversity of water and sediment in the Changjiang estuary and coastal area of the East China Sea. **FEMS microbiology ecology**, v. 70, n. 2, p. 80-92, nov. 2009.

FENG, G. *et al.* [Microbial source tracking of water fecal pollution: a review]. **Ying yong sheng tai xue bao = The journal of applied ecology**, v. 21, n. 12, p. 3273-81, dez. 2010.

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**, 2016.

FIELD, K. G.; SAMADPOUR, M. Fecal source tracking, the indicator paradigm, and managing water quality. **Water research**, v. 41, n. 16, p. 3517-38, ago. 2007.

FILLOL, M. *et al.* Insights in the ecology and evolutionary history of the Miscellaneous Crenarchaeotic Group lineage. **ISME Journal**, 2016.

FLUIT, A. C.; VISSER, M. R.; SCHMITZ, F. J. Molecular detection of antimicrobial resistance. **Clinical microbiology reviews**, v. 14, n. 4, p. 836-71, out. 2001.

FONSECA, E. L.; ANDRADE, B. G. N.; VICENTE, A. C. P. The resistome of low-impacted marine environments is composed by distant Metallo- β -lactamases homologs. **Frontiers in Microbiology**, 2018.

FORSBERG, K. J. *et al.* Bacterial phylogeny structures soil resistomes across habitats. **Nature**, 2014.

FREIRE, C. *et al.* Hair mercury levels, fish consumption, and cognitive development in preschool children from Granada, Spain. **Environmental Research**, v. 110, n. 1, p. 96-104, jan. 2010.

FREMAUX, B. *et al.* Evaluation of host-specific Bacteroidales 16S rRNA gene markers as a complementary tool for detecting fecal pollution in a prairie watershed. **Water Research**, v. 43, n. 19, p. 4838-4849, nov. 2009.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Vigilância ambiental em saúde**. Brasília, 2002.

GILLINGS, M. R. *et al.* Using the class 1 integron-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution. **The ISME journal**, v. 9, n. 6, p. 1269-79, 12 jun. 2015.

GORCHEV, H. G.; OZOLINS, G. **Guidelines for drinking-water quality**. 4. ed. Geneva: WHO, 2011.v. 1

GOULD, V. C.; OKAZAKI, A.; AVISON, M. B. Coordinate hyperproduction of SmeZ and SmeJK efflux pumps extends drug resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2013.

GOURIER-FRÉRY, C.; FRÉRY, N. Aluminium. **EMC - Toxicologie-Pathologie**, v. 1, n. 3, p. 79-95. 2004.

HARWOOD, V. J. *et al.* Isolation of fecal coliform bacteria from the diamondback terrapin (*Malaclemys terrapin centrata*). **Applied and environmental microbiology**, v. 65, n. 2, p. 865-7, fev. 1999.

HARWOOD, V. J. *et al.* Validation and field testing of library-independent microbial source tracking methods in the Gulf of Mexico. **Water research**, v. 43, n. 19, p. 4812-9, nov. 2009.

HASMAN, H. The *tcxB* gene is part of the *tcrYAZB* operon conferring copper resistance in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. **Microbiology**, Reading, England, v. 151, n. 9, p. 3019-25, set. 2005.

HEGSTAD, K. *et al.* Does the wide use of quaternary ammonium compounds enhance the selection and spread of antimicrobial resistance and thus threaten our health? **Microbial drug resistance**, Larchmont, N.Y., v. 16, n. 2, p. 91-104, jun. 2010.

HERNÁNDEZ-RAMÍREZ, K. C. *et al.* A plasmid-encoded mobile genetic element from *Pseudomonas aeruginosa* that confers heavy metal resistance and virulence. **Plasmid**, 2018.

IGBINOSA, E. O.; OKOH, A. I. Impact of discharge wastewater effluents on the physico-chemical qualities of a receiving watershed in a typical rural community. **International Journal of Environmental Science & Technology**, v. 6, n. 2, p. 175-182, 1 mar. 2009.

INAN-EROGLU, E.; AYAZ, A. Is aluminum exposure a risk factor for neurological disorders? **Journal of Research in Medical Sciences**, v. 23, n. 1, p. 51, abr. 2018.

INSTITUTO TRATA BRASIL. **Trata Brasil**: saneamento no Brasil. Rio de Janeiro: SNIS, 2015. Disponível em: <http://www.tratabrasil.org.br/saneamento-no-brasil#RJ>. Acesso em: **DIA MÊS ANO**.

ISLAM, M. A. *et al.* Environmental spread of New Delhi metallo- β -lactamase-1-producing multidrug-resistant bacteria in Dhaka, Bangladesh. **Applied and Environmental Microbiology**, 2014.

JACKSON, J. Heavy metals and other inorganic toxics. *In*: MATSUI, S. (ed.). **Guidelines of lake management**. New York: ILEC, 199, p. 65-80.

JASMINE, R.; VENKADESAN, B.; RAGUL, K. Identification and characterization of heavy metal-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and its potential for bioremediation. **Am. J. PharmTech Res.**, v. 2, n. 4, June, 2012.

JERSE, A. E. *et al.* A gonococcal efflux pump system enhances bacterial survival in a female mouse model of genital tract infection. **Infection and Immunity**, 2003.

JIA, B. *et al.* CARD 2017: expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database. **Nucleic acids research**, v. 45, n. D1, p. D566–D573, 2017.

JIA, S. *et al.* Bacterial Community Shift Drives Antibiotic Resistance Promotion during Drinking Water Chlorination. **Environmental Science and Technology**, 2015.

JIANG, L. *et al.* Occurrence, distribution and seasonal variation of antibiotics in the Huangpu River, Shanghai, China. **Chemosphere**, v. 82, n. 6, p. 822-8, Feb. 2011.

JOHNSTON, C. *et al.* A real-time qPCR assay for the detection of the *nifH* gene of *Methanobrevibacter smithii*, a potential indicator of sewage pollution. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 6, p. 1946-1956, Dec. 2010.

JUHAS, M. *et al.* Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. **FEMS Microbiology Reviews**, 2009.

KACAR, A. Investigation of Heavy Metal-Resistant Sediment Bacteria and Some Water Quality Parameters: A Case Study of Lake Bafa (Turkey). **International Journal of Environmental Research**, v. 9, n. 3, p. 813-822, 2015.

KARPAS, Z. *et al.* Uptake of Ingested Uranium after Low "Acute Intake". **Health Physics**, v. 74, n. 3, p. 337-345, Mar. 1998.

KEEGAN, K. P.; GLASS, E. M.; MEYER, F. MG-RAST, a Metagenomics Service for Analysis of Microbial Community Structure and Function. **Methods in molecular biology**, Clifton, N.J., v. 1399, p. 207-33, 2016.

KEMPER, N. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. **Ecological Indicators**, v. 8, n. 1, p. 1-13, Jan. 2008.

KEMPF, I.; JOUY, E.; CHAUVIN, C. Colistin use and colistin resistance in bacteria from animals. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 2016.

KHALIL, M. A. F.; ELGAML, A.; EL-MOWAFY, M. Emergence of Multidrug-Resistant New Delhi Metallo- β -Lactamase-1-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Egypt. **Microbial Drug Resistance**, v. 23, n. 4, p. 480-487, jun. 2017.

KIM, O.-S. *et al.* Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 62, n. 3, p. 716-21, mar. 2012.

KNAPP, C. W. *et al.* Indirect evidence of transposon-mediated selection of antibiotic resistance genes in aquatic systems at low-level oxytetracycline exposures. **Environmental Science and Technology**, v. 42, n. 14, p. 5348-5353, 2008.

KNAPP, C. W. *et al.* Evidence of increasing antibiotic resistance gene abundances in archived soils since 1940. **Environmental science & technology**, v. 44, n. 2, p. 580-7, 15 jan. 2010.

KOMATSU, F. *et al.* Influence of essential trace minerals and micronutrient insufficiencies on harmful metal overload in a Mongolian patient with multiple sclerosis. **Current aging science**, v. 5, n. 2, p. 112-25, jul. 2012.

KONSTANTINIDIS, K. T.; TIEDJE, J. M. Trends between gene content and genome size in prokaryotic species with larger genomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2004.

KOZICH, J. J. *et al.* Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. **Applied and environmental microbiology**, v. 79, n. 17, p. 5112-20, set. 2013.

KUMAR, A.; SCHWEIZER, H. P. Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2005.

KÜMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment - a review - part II. **Chemosphere**, v.75, n. 4, p. 435-41, 2009a.

KÜMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment--a review--part I. **Chemosphere**, v. 75, n. 4, p. 417-34, abr. 2009b.

LAWFORD, R. *et al.* Basin perspectives on the Water–Energy–Food Security Nexus. **Current Opinion in Environmental Sustainability**, v. 5, n. 6, p. 607-616, dez. 2013.

LE-MINH, N. *et al.* Fate of antibiotics during municipal water recycling treatment processes. **Water research**, v. 44, n. 15, p. 4295-323, ago. 2010.

LECLERC, H. *et al.* Advances in the bacteriology of the coliform group: their suitability as markers of microbial water safety. **Annual review of microbiology**, v.

55, n. 1, p. 201-34, 2001.

LEE, E. H.; SHAFER, W. M. The farAB-encoded efflux pump mediates resistance of gonococci to long-chained antibacterial fatty acids. **Molecular Microbiology**, 1999.

LEGGETT, R. W.; HARRISON, J. D. Fractional absorption of ingested uranium in humans. **Health physics**, v. 68, n. 4, p. 484-98, abr. 1995.

LEUNG, H. W. *et al.* Distribution, fate and risk assessment of antibiotics in sewage treatment plants in Hong Kong, South China. **Environment International**, 2012.

LEUNG, H. W. *et al.* Pharmaceuticals in tap water: human health risk assessment and proposed monitoring framework in China. **Environmental health perspectives**, v. 121, n. 7, p. 839-46, jul. 2013.

LI, A.-D.; LI, L.-G.; ZHANG, T. Exploring antibiotic resistance genes and metal resistance genes in plasmid metagenomes from wastewater treatment plants. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 1025, 2015.

LI, D. *et al.* Water Disinfection Byproducts Induce Antibiotic Resistance-Role of Environmental Pollutants in Resistance Phenomena. **Environmental science & technology**, v. 50, n. 6, p. 3193-201, 15 mar. 2016.

LI, J. *et al.* Antibiotic-resistant genes and antibiotic-resistant bacteria in the effluent of urban residential areas, hospitals, and a municipal wastewater treatment plant system. **Environmental Science and Pollution Research**, 2015.

LI, L. L. *et al.* Metamobilomics--expanding our knowledge on the pool of plasmid encoded traits in natural environments using high-throughput sequencing. **Clinical microbiology and infection**, v. 18, s. 4, p. 5-7, jul. 2012.

LIU, J.L.; WONG, M.H. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs): a review on environmental contamination in China. **Environment international**, v. 59, p. 208-24, set. 2013.

LIU, M.; LU, J. Support vector machine—an alternative to artificial neuron network for water quality forecasting in an agricultural nonpoint source polluted river? **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 18, p. 11036-11053, 5 set. 2014.

LIU, X. *et al.* Occurrence and fate of antibiotics and antibiotic resistance genes in typical urban water of Beijing, China. **Environmental pollution**, Barking, Essex, v. 246, p. 163-173, 5 dez. 2019.

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**, 2016.

LLANES, C. *et al.* Clinical Strains of *Pseudomonas aeruginosa* Overproducing

MexAB-OprM and MexXY Efflux Pumps Simultaneously. **ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**, 2004.

LLOYD, K. G. *et al.* Predominant archaea in marine sediments degrade detrital proteins. **Nature**, v. 496, n. 7444, p. 215-8, 11 abr. 2013.

LONG, S. C.; SOBSEY, M. D. A comparison of the survival of F+RNA and F+DNA coliphages in lake water microcosms. **Journal of Water and Health**, 2004.

LOO, T. W.; CLARKE, D. M. Covalent modification of human P-glycoprotein mutants containing a single cysteine in either nucleotide-binding fold abolishes drug-stimulated ATPase activity. **The Journal of biological chemistry**, v. 270, n. 39, p. 22957-61, 29 set. 1995.

LÓPEZ-PILA, J. M.; SZEWZYK, R. Estimating the infection risk in recreational waters from the faecal indicator concentration and from the ratio between pathogens and indicators. **Water Research**, 2000.

MANTEN, A. [Significance of antibiotics in the environment]. **Nederlands tijdschrift voor geneeskunde**, v. 115, n. 44, p. 1844-8, 30 out. 1971.

MARATHE, N. P. *et al.* Untreated urban waste contaminates Indian river sediments with resistance genes to last resort antibiotics. **Water Research**, 2017.

MARTINEZ, J. L. *et al.* Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems. **FEMS microbiology reviews**, v. 33, n. 2, p. 430-49, mar. 2009.

MARTINEZ, J. L. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. **Environmental Pollution**, Barking, Essex, v. 157, n. 11, p. 2893–902, nov. 2009.

MARTÍNEZ, J. L. Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. **Science**, New York, N.Y., v. 321, n. 5887, p. 365-7, 18 jul. 2008.

MARTINS, M. *et al.* Identification of efflux pump-mediated multidrug-resistant bacteria by the ethidium bromide-agar cartwheel method. **In vivo**, Athens, Greece, v. 25, n. 2, p. 171-8, 2011.

MARTINS, M. *et al.* A Simple Method for Assessment of MDR Bacteria for Over-Expressed Efflux Pumps. **The open microbiology journal**, v. 7, n. 1, p. 72-82, 2013.

MARTINS, V. V. *et al.* Aquatic environments polluted with antibiotics and heavy metals: a human health hazard. **Environmental science and pollution research international**, v. 21, n. 9, p. 5873-8, maio 2014.

MATYAR, F.; KAYA, A.; DINÇER, S. Antibacterial agents and heavy metal resistance in Gram-negative bacteria isolated from seawater, shrimp and sediment in Iskenderun Bay, Turkey. **The Science of the total environment**, v. 407, n. 1, p. 279-85, 15 dez. 2008.

MEDEIROS, J. D. *et al.* Comparative metagenome of a stream impacted by the urbanization phenomenon. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2016.

MEJIAS CARPIO, I. E.; ANSARI, A.; RODRIGUES, D. F. Relationship of Biodiversity with Heavy Metal Tolerance and Sorption Capacity: A Meta-Analysis Approach. **Environmental Science and Technology**, 2018.

MENG, J. *et al.* Genetic and functional properties of uncultivated MCG archaea assessed by metagenome and gene expression analyses. **The ISME journal**, v. 8, n. 3, p. 650-9, mar. 2014.

MIESZKIN, S. *et al.* Estimation of pig fecal contamination in a river catchment by real-time PCR using two pig-specific Bacteroidales 16S rRNA genetic markers. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n. 10, p. 3045–54, maio 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria de Consolidação nº 5, de 28 de setembro de 2017. **Diário Oficial da União**, 2017.

MOMBINI, S. *et al.* Diversity and metallo- β -lactamase-producing genes in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from filters of household water treatment systems. **Journal of Environmental Management**, 2019.

MONTEIRO, M. A. *et al.* Occurrence of Antimicrobials in River Water Samples from Rural Region of the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Environmental Protection**, v. 7, n. 2, p. 230-241, 2016.

MORUZZI, R. B.; REALI, M. A. P. Iron and manganese oxidation and removal from public and industrial water – a general approach. **Revista de Engenharia e Tecnologia**, v. 4, n. 1, p. 29-43, 2012.

MOURA, C. L. DE. **Distribuição de Metais Pesados (Cr, Cu, Ni e Zn) em Sedimentos de Fundo do Rio Embu-Mirim-SP**. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

MUNIZ, D. H. DE F.; OLIVEIRA-FILHO, E. C. Metais pesados provenientes de rejeitos de mineração e seus efeitos sobre a saúde e o meio ambiente. **Universitas: Ciências da Saúde**, v. 4, n. 1, p. 83-100, 29 abr. 2008.

NAYLOR, M.; BALL, R. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. [s.l.: s.n.]. v. I

NESME, J. *et al.* Large-scale metagenomic-based study of antibiotic resistance in the environment. **Current Biology**, 2014.

NIES, D. H. Microbial heavy-metal resistance. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, n. 6, p. 730-750, 22 jun. 1999.

NOGUEIRA, G. *et al.* Microbiological quality of drinking water of urban and rural

communities, Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, n. 2, p. 232-236, abr. 2003.

NOGUEIRA, I. DE S. *et al.* Diversidade (alfa, beta e gama) da comunidade fitoplanctônica de quatro lagos artificiais urbanos do município de Goiânia, GO. **Hoehnea**, v. 35, n. 2, p. 219-233, jun. 2008.

NORMAN, A. *et al.* An improved method for including upper size range plasmids in metamobilomes. **PloS one**, v. 9, n. 8, p. e104405, 2014.

NORMAN, A.; HANSEN, L. H.; SØRENSEN, S. J. Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 364, n. 1527, p. 2275-89, 12 ago. 2009.

NOVAES, R. M. P. *et al.* Perfil de resistência aos antibióticos e prevalência dos genes *qacEΔ1* e *sul1* em *Pseudomonas aeruginosa* de efluente hospitalar. **Vigilância Sanitária em Debate**, v. 6, n. 2, p. 18, 30 maio 2018.

NURK, S. *et al.* metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler. **Genome research**, v. 27, n. 5, p. 824-834, 2017.

OKABE, S. *et al.* Quantification of host-specific *Bacteroides-Prevotella* 16S rRNA genetic markers for assessment of fecal pollution in freshwater. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 74, n. 4, p. 890-901, mar. 2007.

OLAITAN, A. O.; MORAND, S.; ROLAIN, J.-M. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. **Frontiers in microbiology**, v. 5, n. nov, p. 643, 2014.

OLIVEIRA, S. S. *et al.* Detection of human fecal contamination by *nifH* gene quantification of marine waters in the coastal beaches of Rio de Janeiro, Brazil. **Environmental science and pollution research international**, v. 23, n. 24, p. 25210-25217, dez. 2016.

OVERBEEK, R. *et al.* The subsystems approach to genome annotation and its use in the project to annotate 1000 genomes. **Nucleic Acids Research**, 2005.

PAIXÃO, L. *et al.* Fluorometric determination of ethidium bromide efflux kinetics in *Escherichia coli*. **Journal of Biological Engineering**, 2009.

PAL, C. *et al.* BacMet: antibacterial biocide and metal resistance genes database. **Nucleic acids research**, v. 42, n. Database issue, p. D737-43, jan. 2014.

PAL, C. *et al.* Co-occurrence of resistance genes to antibiotics, biocides and metals reveals novel insights into their co-selection potential. **BMC Genomics**, 2015.

PAUL, M. J.; MEYER, J. L. Streams in the Urban Landscape. *In: URBAN Ecology*. Boston, MA: Springer US, 2008. p. 207-231.

PEIXOTO, L. J. *et al.* *Aeromonas* spp.: fatores de virulência e perfis de resistência a

antimicrobianos e metais pesados. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 79, n. 3, p. 453-461, set. 2012.

PÉREZ, S.; EICHHORN, P.; AGA, D. S. Evaluating the biodegradability of sulfamethazine, sulfamethoxazole, sulfathiazole, and trimethoprim at different stages of sewage treatment. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 24, n. 6, p. 1361-7, jun. 2005.

PERRON, K. *et al.* CzcR-CzcS, a two-component system involved in heavy metal and carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 10, p. 8761-8, 5 mar. 2004.

PIDDOCK, L. J. V. Multidrug-resistance efflux pumps - Not just for resistance. **Nature Reviews Microbiology**, 2006a.

PIDDOCK, L. J. V. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. **Clinical microbiology reviews**, v. 19, n. 2, p. 382-402, abr. 2006b.

PIEDRA-CARRASCO, N. *et al.* Carbapenemase-producing enterobacteriaceae recovered from a Spanish river ecosystem. **PLoS ONE**, 2017.

POOLE, K. **Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms** *Annals of Medicine*, 2007.

POONSUK, K.; TRIBUDDHARAT, C.; CHUANHUEN, R. Simultaneous overexpression of multidrug efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* non-cystic fibrosis clinical isolates. **Can. J. Microbiol.**, 2014.

PRADO, G. R. *et al.* Evaluation of uranium incorporation from contaminated areas using teeth as bioindicators--a case study. **Radiation Protection Dosimetry**, v. 130, n. 2, p. 249-252, 15 dez. 2007.

QIN, Y. *et al.* Bacterial abundance and diversity in pond water supplied with different feeds. **Scientific Reports**, 2016.

QUAST, C. *et al.* The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic acids research**, v. 41, p. D590-6, jan. 2013.

RAFIQ, M. *et al.* Recovery of metallo-tolerant and antibiotic resistant psychrophilic bacteria from Siachen glacier, Pakistan. **PLOS ONE**, v. 12, n. 7, p. e0178180, 26 jul. 2017.

RAHMAN, M. H. *et al.* Occurrence of two genotypes of tetracycline (TC) resistance gene tet(M) in the TC-resistant bacteria in marine sediments of Japan. **Environmental science & technology**, v. 42, n. 14, p. 5055-61, 15 jul. 2008.

RAO, X. *et al.* An improvement of the 2⁻(-delta delta CT) method for quantitative real-

time polymerase chain reaction data analysis. **Biostatistics, bioinformatics and biomathematics**, v. 3, n. 3, p. 71-85, ago. 2013.

READY, D. *et al.* The effect of amalgam exposure on mercury- and antibiotic-resistant bacteria. **International journal of antimicrobial agents**, v. 30, n. 1, p. 34-9, jul. 2007.

RICCIARDI, F. *et al.* Is chemical contamination linked to the diversity of biological communities in rivers? **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 5, p. 592-602, maio 2009.

RICHARDSON, S. D.; TERNES, T. A. Water analysis: emerging contaminants and current issues. **Analytical chemistry**, v. 86, n. 6, p. 2813-48, 18 mar. 2014.

RODRIGUES, C. M. **Análise da resistência a cobre e zinco sobre o crescimento e expressão gênica em *Xylella fastidiosa* em condições de biofilme**. 2007. 101 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2007.

ROSARIO, K. *et al.* Pepper Mild Mottle Virus as an Indicator of Fecal Pollution. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 22, p. 7261-7267, 15 nov. 2009.

ROSEWARNE, C. P. *et al.* Class 1 integrons in benthic bacterial communities: abundance, association with Tn402-like transposition modules and evidence for coselection with heavy-metal resistance. **FEMS microbiology ecology**, v. 72, n. 1, p. 35-46, abr. 2010.

ROSSOLINI, G. M. *et al.* Metallo- β -lactamase producers in environmental microbiota: New molecular class B enzyme in *Janthinobacterium lividum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2001.

SARMAH, A. K.; MEYER, M. T.; BOXALL, A. B. A. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. **Chemosphere**, v. 65, n. 5, p. 725-59, out. 2006.

SATOLA, B.; WÜBBELER, J. H.; STEINBÜCHEL, A. Metabolic characteristics of the species *Variovorax paradoxus*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 97, n. 2, p. 541-60, jan. 2013.

SCHLÜTER, A. *et al.* Genomics of IncP-1 antibiotic resistance plasmids isolated from wastewater treatment plants provides evidence for a widely accessible drug resistance gene pool. **FEMS microbiology reviews**, v. 31, n. 4, p. 449-77, jul. 2007.

SCHMIEDER, R.; EDWARDS, R. Insights into antibiotic resistance through metagenomic approaches. **Future microbiology**, v. 7, n. 1, p. 73-89, jan. 2012.

SEGURA, J. *et al.* Bioanalysis and Analytical Services Research Group at The Municipal Institute for Medical Research IMIM-Hospital del Mar, Spain. **Bioanalysis**,

v. 1, n. 8, p. 1403-9, nov. 2009a.

SEGURA, P. A. *et al.* Review of the occurrence of anti-infectives in contaminated wastewaters and natural and drinking waters. **Environmental health perspectives**, v. 117, n. 5, p. 675-84, maio 2009b.

SEILER, C.; BERENDONK, T. U. Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture. **Frontiers in microbiology**, v. 3, n. dec., p. 399, 2012.

SHADE, A.; HANDELSMAN, J. Beyond the Venn diagram: the hunt for a core microbiome. **Environmental microbiology**, v. 14, n. 1, p. 4-12, jan. 2012.

SHEPPARD, S. C. *et al.* Derivation of ecotoxicity thresholds for uranium. **Journal of Environmental Radioactivity**, v. 79, n. 1, p. 55-83, jan. 2005.

SHI, P. *et al.* Metagenomic insights into chlorination effects on microbial antibiotic resistance in drinking water. **Water Research**, v. 47, n. 1, p. 111-120, jan. 2013.

SHUVAL, H. Estimating the global burden of thalassogenic diseases: human infectious diseases caused by wastewater pollution of the marine environment. **Journal of water and health**, v. 1, n. 2, p. 53-64, jun. 2003.

SILVER, S.; PHUNG, L. T. Bacterial heavy metal resistance: new surprises. **Annual review of microbiology**, v. 50, p. 753-89, 1996.

SIMAS, L. Qualidade da água para consumo humano. **Segurança e qualidade alimentar**, 2009.

SOGE, O. O. *et al.* A novel transposon, Tn6009, composed of a Tn916 element linked with a *Staphylococcus aureus* mer operon. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 62, n. 4, p. 674-80, out. 2008.

STANISH, L. F. *et al.* Factors Influencing Bacterial Diversity and Community Composition in Municipal Drinking Waters in the Ohio River Basin, USA. **PloS one**, v. 11, n. 6, p. e0157966, 2016.

SUGAWARA, E.; NIKAIDO, H. Properties of AdeABC and AdeIJK efflux systems of *Acinetobacter baumannii* compared with those of the AcrAB-TolC system of *Escherichia coli*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 12, p. 7250-7, dez. 2014.

TACÃO, M.; CORREIA, A.; HENRIQUES, I. Resistance to Broad-Spectrum Antibiotics in Aquatic Systems: Anthropogenic Activities Modulate the Dissemination of bla CTX-M -Like Genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 12, p. 4134–4140, 15 jun. 2012.

TANDON, L.; IYENGAR, G. .; PARR, R. . A review of radiologically important trace elements in human bones. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 49, n. 8, p. 903-910,

maio 1998.

TENG, Y. *et al.* **Soil and soil environmental quality monitoring in China: A review** *Environment International*, 2014.

TERÁN, W. *et al.* Antibiotic-dependent induction of *Pseudomonas putida* DOT-T1E TtgABC efflux pump is mediated by the drug binding repressor TtgR. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2003.

THADEU, W. *et al.* Potencial impacto na Saúde Pública por *Campylobacter* spp . Estudo de caso : curso inferior do rio São João , RJ , Brasil. **Cad. Saúde Colet.**, v. 19, n. 1, p. 74-81, 2011.

TOPP, E. *et al.* Reduced persistence of the macrolide antibiotics erythromycin, clarithromycin and azithromycin in agricultural soil following several years of exposure in the field. **Science of the Total Environment**, 2016.

TUCCI, C. **Hidrologia: ciência e aplicação**. ABRH, Porto Alegre: Editora da Universidade, 2000.

TUOMISTO, H. A consistent terminology for quantifying species diversity? Yes, it does exist. **Oecologia**, v. 164, n. 4, p. 853-60, dez. 2010.

UFNAR, J. A. *et al.* Detection of the *nifH* gene of *Methanobrevibacter smithii*: a potential tool to identify sewage pollution in recreational waters. **Journal of applied microbiology**, v. 101, n. 1, p. 44-52, jul. 2006.

UFNAR, J. A. *et al.* Development of a swine-specific fecal pollution marker based on host differences in methanogen *mcrA* genes. **Applied and environmental microbiology**, v. 73, n. 16, p. 5209-17, ago. 2007.

VAN BELKUM, A. *et al.* Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. **Clinical microbiology and infection**, v. 13, s. 3, p. 1-46, out. 2007.

VAN BOECKEL, T. P. *et al.* Global trends in antimicrobial use in food animals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 18, p. 5649-54, maio 2015.

VAZ-MOREIRA, I.; NUNES, O. C.; MANAIA, C. M. Bacterial diversity and antibiotic resistance in water habitats: searching the links with the human microbiome. **FEMS microbiology reviews**, v. 38, n. 4, p. 761-78, jul. 2014.

VÁZQUEZ-LASLOP, N.; MANKIN, A. S. How Macrolide Antibiotics Work. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 43, n. 9, p. 668-684, set. 2018.

VERÍSSIMO, F. A. D. R.; FERREIRA, M. I. P. Application of the Water Quality Index (QWI) to characterize the lower course of the São João River. **Boletim do Observatório Ambiental Alberto Ribeiro Lamego**, v. 7, n. 2, 2013.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic acids research**, v. 19, n. 24, p. 6823-31, 25 dez. 1991.

VERSTRAETEN, S. V.; AIMO, L.; OTEIZA, P. I. Aluminium and lead: Molecular mechanisms of brain toxicity. **Archives of Toxicology**, 2008.

VIJAYAKUMAR, R.; SANDLE, T. A review on biocides reduced susceptibility due to plasmid-borne antiseptic resistant genes - Special notes on pharmaceutical environmental isolates. **Journal of applied microbiology**, p. 0-2, 1 out. 2018.

VILMORE, J. **Antibióticos somente ser vendidos com retenção de receita**. Disponível em: <http://www.180graus.com/farmacia/10>. Acesso em: **DIA MÊS ANO**.

VOICA, D. M. *et al.* Heavy metal resistance in halophilic Bacteria and Archaea. **FEMS Microbiology Letters**, v. 363, n. 14, p. 146, jul. 2016.

WALKER, A. Welcome to the plasmidome. **Nature reviews. Microbiology**, v. 10, n. 6, p. 379, 14 maio 2012.

WARNER, D. M. *et al.* Regulation of the MtrC-MtrD-MtrE Efflux-Pump System Modulates the In Vivo Fitness of *Neisseria gonorrhoeae*. **The Journal of Infectious Diseases**, 2007.

WASEEM, A. *et al.* Pollution status of Pakistan: a retrospective review on heavy metal contamination of water, soil, and vegetables. **BioMed research international**, v. 2014, p. 813206, 2014.

WATKINSON, A. J.; MURBY, E. J.; COSTANZO, S. D. Removal of antibiotics in conventional and advanced wastewater treatment: implications for environmental discharge and wastewater recycling. **Water research**, v. 41, n. 18, p. 4164-76, out. 2007.

WEBBER, M. A.; PIDDOCK, L. J. V. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2003.

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

WHO; UNICEF. **Progress on drinking water, sanitation and hygiene: 2017 Update and SDG Baselines**. Switzerland, 2017.

WILSON, J. L.; SCHUMACHER, J. G.; BURKEN, J. G. Persistence and Microbial Source Tracking of *Escherichia coli* at a Swimming Beach at Lake of the Ozarks State Park, Missouri. **Journal of the American Water Resources Association**, 2016.

WINDE, F. Uranium pollution of the wonderfonteinspruit, 1997-2008 Part 2: Uranium

in water-concentrations, loads and associated risks. **Water SA**, v. 36, n. 3, p. 257-278, 2010.

WORLD HEALTH ORGANISATION. **Health risks of heavy metals from long-range transboundary air pollution**. Germany, 2007. p. 2-144.

WORLD HEALTH ORGANISATION. **ICSCs - International Chemical Safety Cards**. Disponível em: <http://www.ilo.org/legacy/english/protection/safework/cis/products/icsc/dtasht/index.htm>.

WRIGHT, G. D. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. **Nature reviews Microbiology**, v. 5, n. 3, p. 175-86, mar. 2007.

WRIGHT, G. D. Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic? **Current opinion in microbiology**, v. 13, n. 5, p. 589-94, out. 2010.

WRIGHT, M. S. *et al.* Influence of industrial contamination on mobile genetic elements: class 1 integron abundance and gene cassette structure in aquatic bacterial communities. **The ISME journal**, v. 2, n. 4, p. 417-28, abr. 2008.

XI, C. *et al.* Prevalence of antibiotic resistance in drinking water treatment and distribution systems. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n. 17, p. 5714-8, set. 2009.

YAO, H. *et al.* Regional Risk Assessment for Point Source Pollution Based on a Water Quality Model of the Taipu River, China. **Risk Analysis**, v. 35, n. 2, p. 265-277, fev. 2015.

YONG, D. *et al.* Genetic and biochemical characterization of an acquired subgroup B3 metallo- β -lactamase gene, blaAIM-1, and its unique genetic context in *Pseudomonas aeruginosa* from Australia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2012.

YOSHIDA, N.; TAKAHASHI, Y. Land-Surface Contamination by Radionuclides from the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant Accident. **Elements**, v. 8, n. 3, p. 201-206, 1 jun. 2012.

YOUENOU, B. *et al.* Comparative genomics of environmental and clinical *Stenotrophomonas maltophilia* strains with different antibiotic resistance profiles. **Genome Biology and Evolution**, 2015.

YU, Z. *et al.* Antimicrobial resistance and its association with tolerance to heavy metals in agriculture production. **Food Microbiology**, 2017.

ZHANG, J. *et al.* Distribution of sediment bacterial and archaeal communities in plateau freshwater lakes. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 99, n. 7, p. 3291-302, abr. 2015.

ZHANG, R. *et al.* Occurrence and risks of antibiotics in the Laizhou Bay, China: Impacts of river discharge. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 2012.

ZHANG, T.; ZHANG, X.-X.; YE, L. Plasmid metagenome reveals high levels of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements in activated sludge. **PloS one**, v. 6, n. 10, p. e26041, 2011.

ZHANG, Y. *et al.* Subinhibitory Concentrations of Disinfectants Promote the Horizontal Transfer of Multidrug Resistance Genes within and across Genera. **Environmental science & technology**, v. 51, n. 1, p. 570-580, 2017.

ZHANG, Y.; GEISSEN, S. U.; GAL, C. Carbamazepine and diclofenac: Removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. **Chemosphere**, 2008.

APÊNDICE A - LISTA DE GENES DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS ANOTADOS UTILIZANDO O BANCO DE DADOS CARD.

Resistance genes	Guandu watershed	São João Watershed	Drinking Water
AAC(3)-Ic	1		
AAC(6')-31			1
AAC(6')-33	1		
AAC(6')-34	1	1	
AAC(6')-I30			1
AAC(6')-Ia	4		
AAC(6')-Ib	1		
AAC(6')-Ib-Hangzhou		1	
AAC(6')-Ib-SK	1		1
AAC(6')-Ic	1		
AAC(6')-Ie-APH(2'')-Ia	2		
AAC(6')-Ii		1	
AAC(6')-IIc	1		
AAC(6')-IId	1		
AAC(6')-Iip	1	1	
AAC(6')-IIsa	1	1	
AAC(6')-It		1	
aad(6)	2		
abcA	11		1
abeM	2		
abeS	1		
Acinetobacter baumannii gyrA conferring resistance to fluoroquinolones	1		
AcrF	1		
AcrS	7	1	2
ACT-31	2		
adeJ	2		
adeL	13	1	9
adeN	7	1	
adeR	6	1	
adeS	8	1	2
AER-1			1
AIM-1			1
apmA	7	3	2
arIR	4		
arIS	5		1
arnA	8	1	4
AxyX			1

bacA	5	1	1
Bacillus clausii chloramphenicol acetyltransferase	1	1	
Bacillus pumilus cat86	1		
Bacillus subtilis pgsA with mutation conferring resistance to daptomycin		1	
baeR	3		
baeS	3	1	1
basR		1	
basS	5		1
bcrA	6	1	3
bcrB	3		
bcrC	1		
Bifidobacterium ileS conferring resistance to mupirocin	9	4	7
BJP-1			1
blal	2		
blaR1	1		
blt	1		
bmr	1		
Brucella suis mprF	1		
Campylobacter coli chloramphenicol acetyltransferase	1		
carA	10	1	4
catB10	1		1
catB8		1	
catB9	1		
CAU-1	2		
cdeA	12	3	
Chlamydia trachomatis intrinsic murA conferring resistance to fosfomycin	8	2	6
chrB	2		
cipA		1	
clbA			1
clbB	2		
clbC	1		1
cmeR	4		1
cmlv	1		
cmrA			1
cmx	2		2
CMY-73	2		
cpaA	2		
CPS-1	1		
cpxA	1		1
CRP	4		2

dfrA1	1		1
dfrA19	1		
dfrA24	1		
dfrA8	1		
EdeQ	6		
efmA	1		1
efpA			2
efrA	3		1
efrB	5		1
emeA	1		1
emrA	1		
emrB	2		
emrR	7		
Enterococcus faecalis cls with mutation conferring resistance to daptomycin	1		
Enterococcus faecium cls conferring resistance to daptomycin	2	1	3
Enterococcus faecium EF-Tu mutants conferring resistance to GE2270A	1		
Enterococcus faecium liaS mutant conferring daptomycin resistance	1		
EreA2	1		
Erm(34)	1		
Erm(36)	1		
Erm(37)	2		
Erm(41)	1		
Erm(47)	1		
ErmN	2		2
ErmO	1		
ErmV			1
Escherichia coli acrR with mutation conferring multidrug antibiotic resistance	6		1
Escherichia coli EF-Tu mutants conferring resistance to kirromycin	3	1	3
Escherichia coli EF-Tu mutants conferring resistance to Pulvomycin		2	2
Escherichia coli emrE	1		1
Escherichia coli fabI mutations conferring resistance to isoniazid and triclosan	2		2
Escherichia coli gyrA conferring resistance to fluoroquinolones	2	1	1
Escherichia coli marR mutant conferring antibiotic resistance	6		
Escherichia coli parE conferring resistance to fluoroquinolones			1
Escherichia coli soxS with mutation conferring antibiotic resistance	25	1	3
Escherichia coli UhpA with mutation conferring resistance to fosfomycin	1		1
ESP-1	1		
evgA	30	1	11

evgS	47	5	15
farA			1
FEZ-1	1	1	
FosA	1		
FosK			1
FosX	1		
gadW	6		1
gadX	12	1	2
GOB-18	1		
golS	12	2	5
hmrM	5		2
hp1181	1		1
IMP-12	1		
iri			1
kdpE	2	1	3
<i>Lactobacillus reuteri</i> cat-TC	1		
LEN-22			1
LlmA 23S ribosomal RNA methyltransferase	3	1	2
lmrC	1		2
lmrD	3	2	1
LpeA	2		
LRA-12	1		1
LRA-13	1		
LRA-17	1	1	
LRA-19	1		
LRA-2			1
LRA-8	2		1
lrfA	1		1
lsaA	16	1	1
lsaB	11	3	5
lsaC	16	1	4
lsaE	16	3	2
macA	2		
macB	11	2	5
marA	11	2	1
MCR-4			1
mdtA	2		
mdtE			1
mdtG	1		
MdtK		1	2
mdtM	1		

mdtP			1
mecA			1
mecB	4		3
mecC	4		1
mecD		1	
mecI	4		
mecR1	2		
mef(B)	1		
mefA	1		
mefC	2		
mefE	2		
mel	7		2
mepA	13		
mepR	1		
MexD			1
MexE	1		
MexJ			1
MexL	4		5
mexQ	1		1
MexR	4		
MexS	2		5
MexT			1
mexY	1		1
MexZ	2		
mgrA	1		
MOX-9			1
msbA	11	1	
MSI-1	1		1
msrA	14	4	4
msrC	11	1	1
msrE	6		6
mtrA	2		1
mtrD	1		1
mtrR	11		1
MuxC			1
Mycobacterium smegmatis ndh with mutation conferring resistance to isoniazid		1	
Mycobacterium tuberculosis ethA with mutation conferring resistance to ethionamide			1
Mycobacterium tuberculosis folC with mutation conferring resistance to para-aminosalicylic acid	1		
Mycobacterium tuberculosis gidB mutation conferring resistance to streptomycin		1	
Mycobacterium tuberculosis gyrB mutant conferring	1		

resistance to fluoroquinolone			
Mycobacterium tuberculosis inhA mutations conferring resistance to isoniazid			1
Mycobacterium tuberculosis kasA mutant conferring resistance to isoniazid	1		
Mycobacterium tuberculosis pncA mutations conferring resistance to pyrazinamide	1		
Mycobacterium tuberculosis rpoB mutants conferring resistance to rifampicin	2	3	3
Mycobacterium tuberculosis rpsL mutations conferring resistance to Streptomycin	2		2
Mycobacterium tuberculosis thyA with mutation conferring resistance to para-aminosalicylic acid			1
Mycoplasma hominis parC conferring resistance to fluoroquinolone	3		2
myrA	1		2
nalC	4		1
nalD	8	1	4
Neisseria meningitidis PBP2 conferring resistance to beta-lactam	1	1	
NmcR	17	1	7
novA	2		1
OCH-8			1
oleB	17		6
oleC	6	1	
oleI	1		
optrA	8	4	4
otr(A)	4	2	
otrC	5		4
patA	13	1	10
patB	5		3
PEDO-1	1		
PEDO-2	1		
Planobispora rosea EF-Tu mutants conferring resistance to inhibitor GE2270A			1
PmpM	2		
pmrA	1		
PmrF	10	2	1
poxtA	10	1	4
pp-flo	1		
Pseudomonas aeruginosa catB6			1
Pseudomonas aeruginosa catB7	1		
Pseudomonas aeruginosa CpxR	5		
Pseudomonas aeruginosa parE conferring resistance to fluoroquinolones	2		
Pseudomonas aeruginosa soxR	1		3
Pseudomonas mutant PhoP conferring resistance to colistin			1
qacH	1		

QepA1	1		
QepA2	1		
QnrB56	1		
QnrC	1		
QnrD2		1	
QnrVC7	1		
ramA	9		
Rhodococcus fascians cmr	1		1
Rm3	1		
rosA	1		1
rosB	3		1
rphA	3		1
rphB	3	1	2
rpoB2	3	1	4
salA	16		9
SAT-4	5	1	4
sdiA	2		1
SFB-1			1
Shigella flexneri parC conferring resistance to fluoroquinolones		1	
SHV-96	1		
SMB-1	1		
smeA			2
smeR	3	1	1
smeS	4	1	3
SPG-1	1		
srmB	12	2	
Staphylococcus aureus fusA with mutation conferring resistance to fusidic acid	1		
Staphylococcus aureus rpoB mutants conferring resistance to rifampicin			3
Staphylococcus mupA conferring resistance to mupirocin	4		1
Staphylococcus mupB conferring resistance to mupirocin	6		3
Streptococcus pneumoniae PBP1a conferring resistance to amoxicillin	1		
Streptococcus pneumoniae PBP2b conferring resistance to amoxicillin	2		
Streptomyces rishiriensis parY mutant conferring resistance to aminocoumarin	4	2	3
sul1	2		1
TaeA	11	2	2
tet(31)	1		2
tet(35)	7		2
tet(38)	1		1
tet(42)	1		

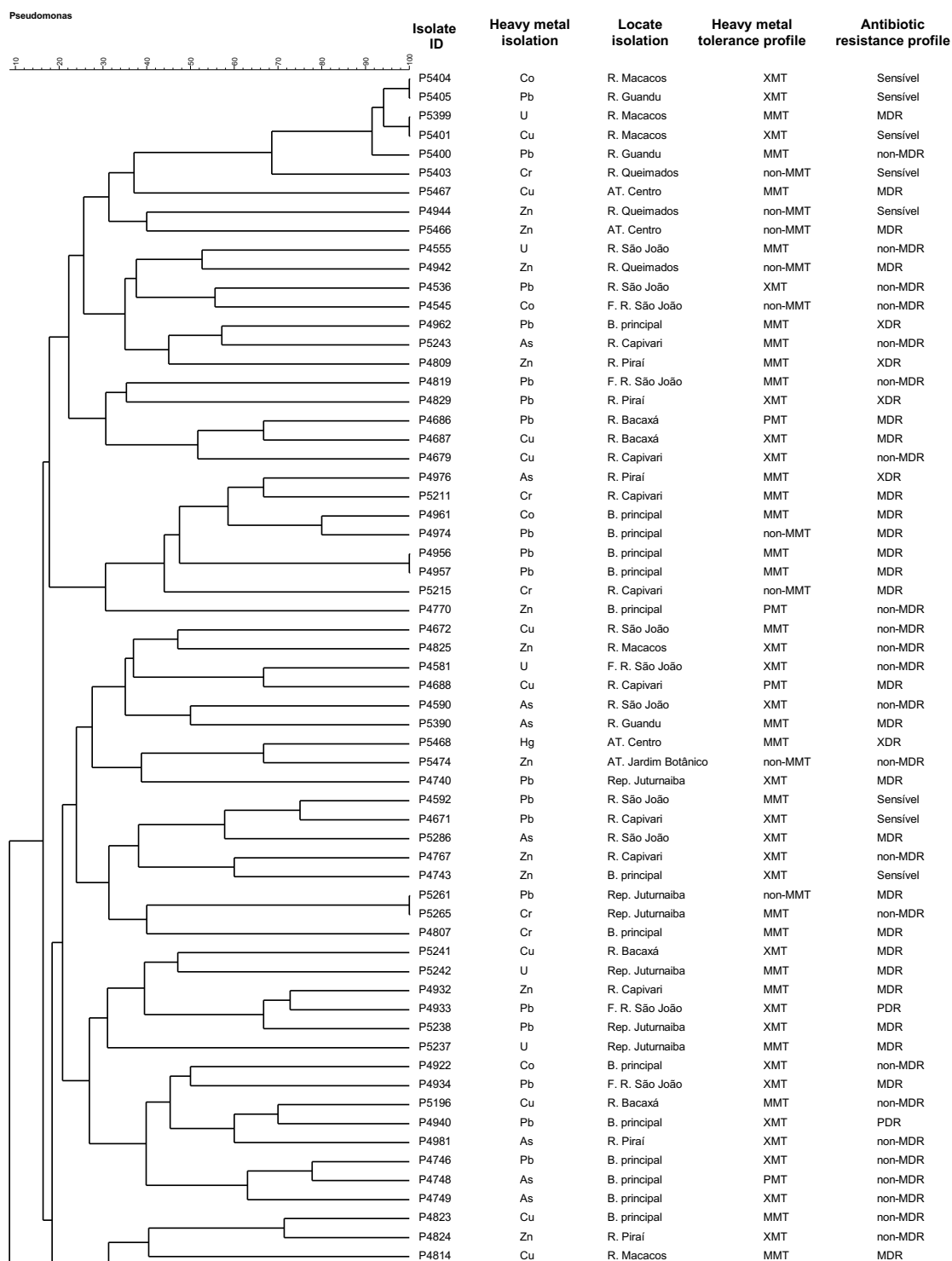
tet(43)	1		
tet(C)	1		
tet(D)	8	1	2
tet(H)	1		
tet(K)	1		
tet(L)	2		
tet(V)	3		
tet(W/N/W)	1		
tet(Z)	1		1
tet36	2	1	3
tet37	3	1	1
tet44	1	1	1
tetA(46)	3		
tetA(48)	3		
tetA(60)	2		2
tetB(46)	3		
tetB(48)			1
tetB(60)	2		
tetB(P)			1
tetM	3	2	1
tetO	1		2
tetQ	4	3	2
tetS			4
tetT		1	2
tetW	1		2
tetX	2		2
tlrC	14	2	9
tsnR	4	2	1
ugd			1
vanA		1	
vanB	2		1
vanC			1
vanD			1
vanE	2		
vanF	1		1
vanHA	1		
vanHB	1		2
vanHM	3	1	2
vanHO	5	1	2
vanKI	1		
vanL	1		1

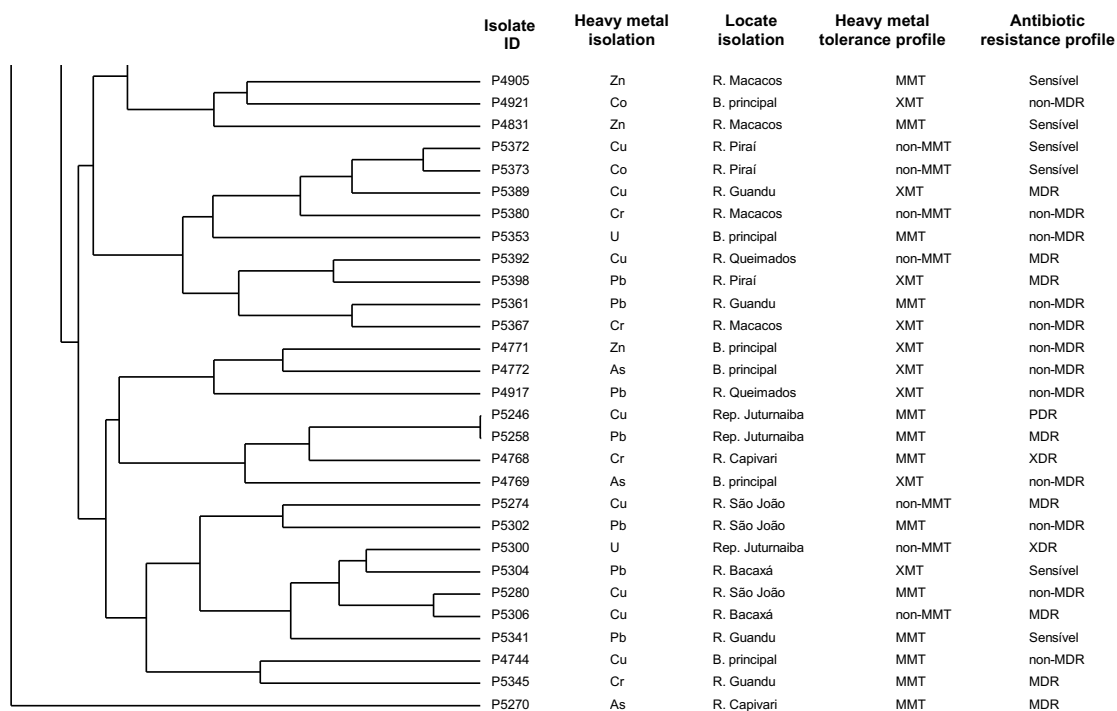
vanN		1	
vanO	3		2
vanRA	3		1
vanRB	5	1	3
vanRD	2		
vanRE	2		1
vanRF	9		1
vanRG		1	
vanRI	1		
vanRL			1
vanRM	6		
vanRN		1	
vanRO	12	3	10
vanSA	3		2
vanSB	13	1	1
vanSC	1		
vanSD	27	3	8
vanSE	6		2
vanSF	1		
vanSG	2		2
vanSL	2		1
vanSN			2
vanSO	3	1	2
vanTC			1
vanTE	1		
vanTG			1
vanTN		1	
vanUG	3	1	1
vanWB	1		
vanWG	1		1
vanXD	1		
vanXYE		1	
vanXYG	2	1	
vanYF	1		
vanZA	2		1
vanZF	2		1
vatB	1		
vatC			1
vatE			1
vatF	1		
vatH	2	1	2

vgaA	12	4	
vgaALC	15	2	3
vgaB	18	1	4
vgaD	15	2	4
vgaE	13	2	
ykkC	2		1
ykkD	1		
YojI	5		3

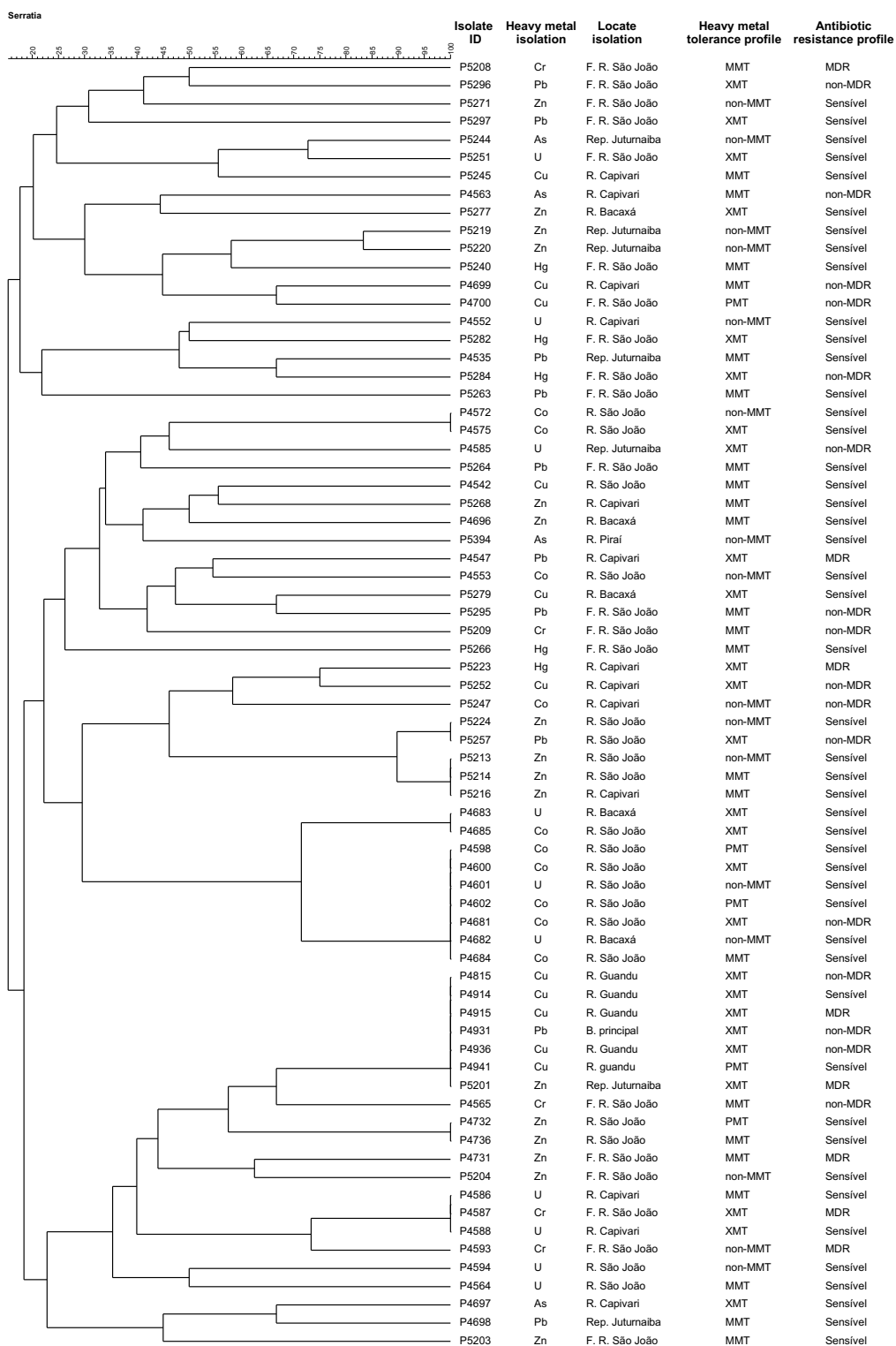
APÊNDICE B - DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE DO PERFIL DE BANDAS DAS LINHAGENS BACTERIANAS

Figura 44 - Dendrograma de similaridade completo do perfil de bandas das linhagens de *Pseudomonas* spp.



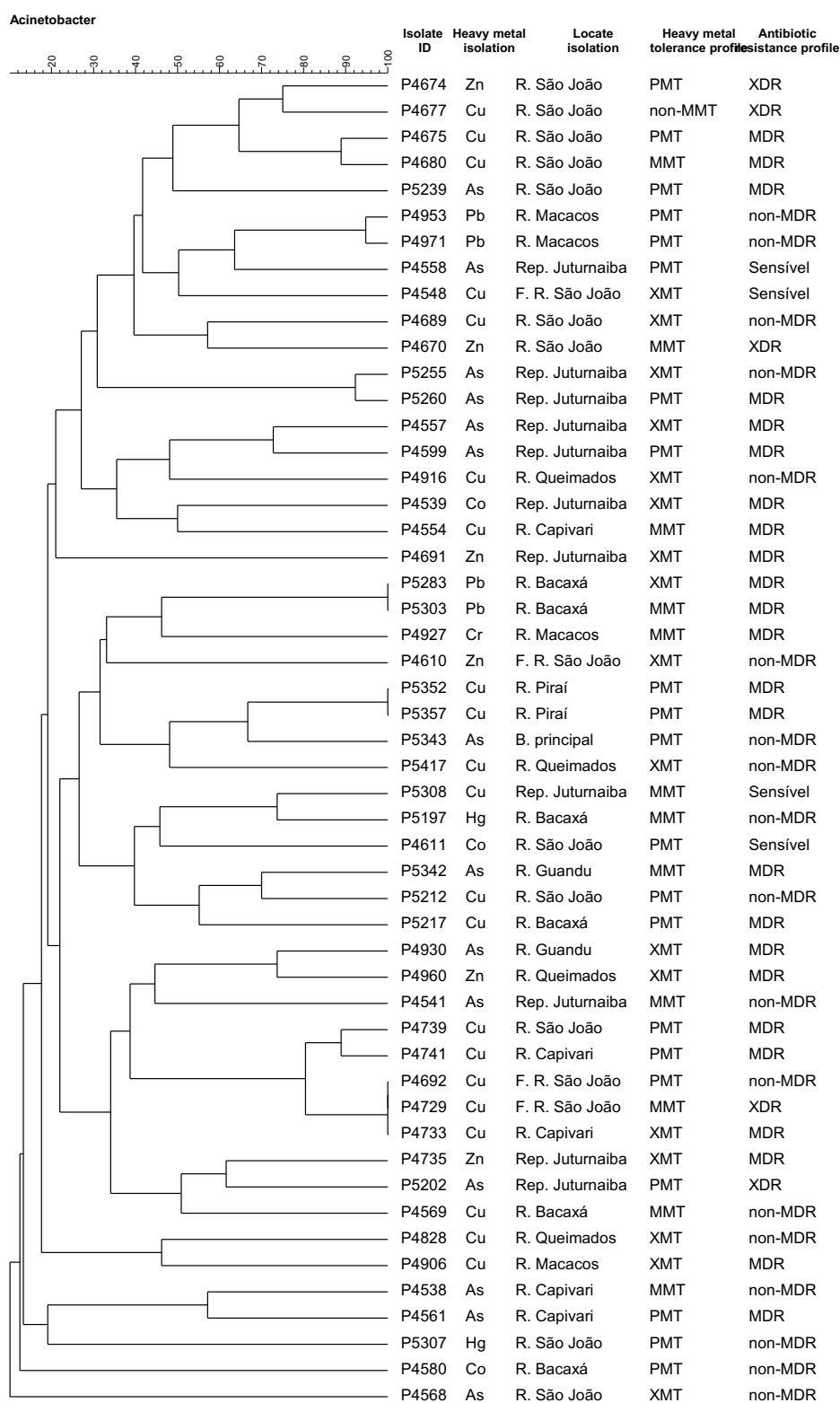


Fonte: (Do autor, 2019).

Figura 45 - Dendrograma de similaridade completo do perfil de bandas das linhagens de *Serratia* spp.

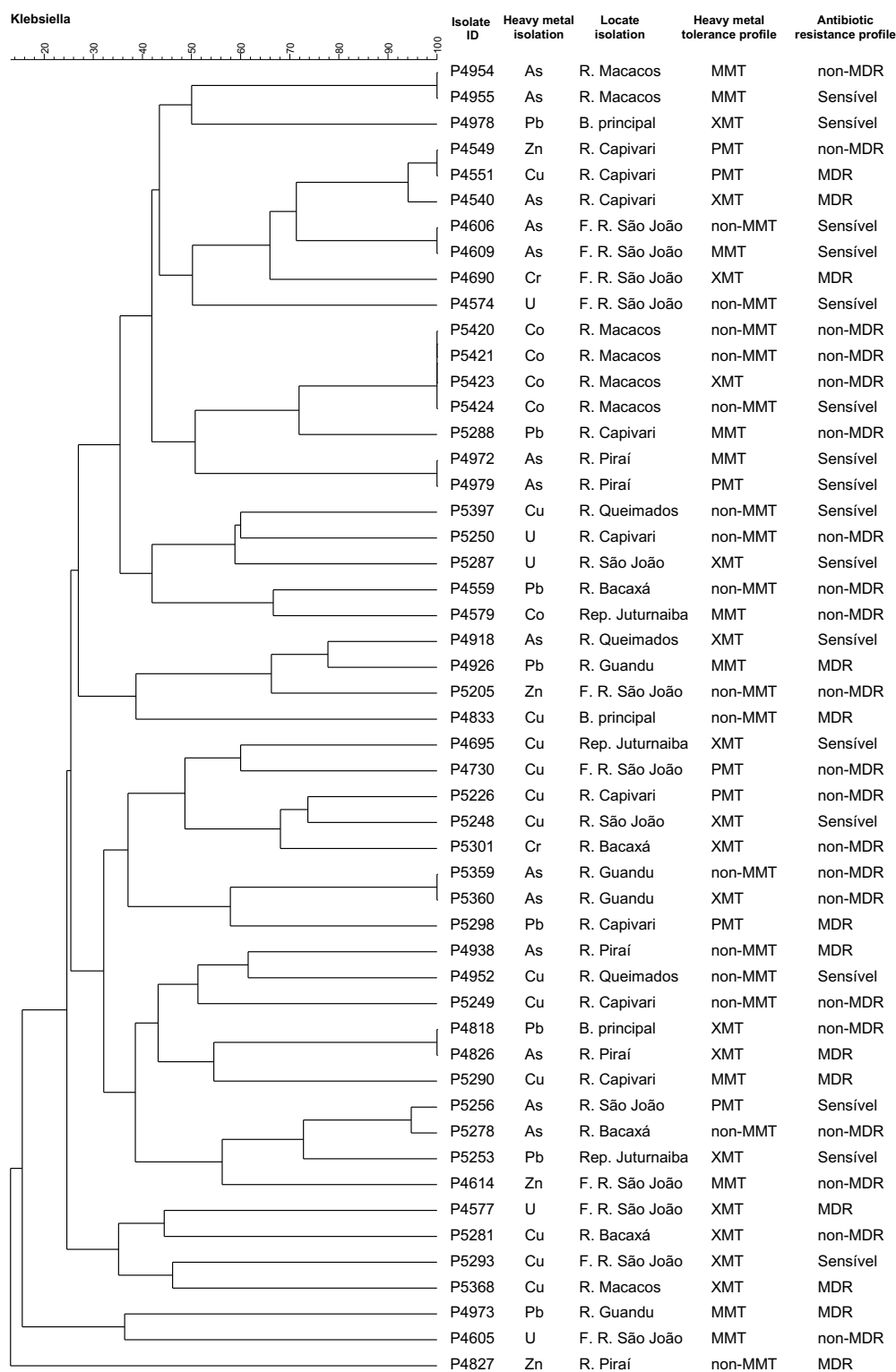
Fonte: (Do autor, 2019).

Figura 46 - Dendrograma de similaridade completo do perfil de bandas das linhagens de *Acinetobacter* spp.



Fonte: (Do autor, 2019).

Figura 47 - Dendrograma de similaridade completo do perfil de bandas das linhagens de *Klebsiella* spp.



Fonte: (Do autor, 2019).

APÊNDICE C - ARTIGO PUBLICADO EM AUTORIA PRINCIPAL

Fecal pollution source tracking in waters intended for human supply based on archaeal and bacterial genetic markers

Kayo Bianco, Camila Barreto, Samara Sant'Anna Oliveira, Leonardo Henriques Pinto, Rodolpho Mattos Albano, Catia Chaia Miranda and Maysa Mandetta Clementino

ABSTRACT

The determination of fecal pollution sources in aquatic ecosystems is essential to estimate associated health risks. In this study, we evaluate eight microbial source tracking (MST) markers including host-specific *Bacteroidales* and *Methanobrevibacter* spp. for discrimination between human, bovine, equine, and swine fecal contamination in waters intended for human supply. Overall, the novel host-specific archaeal and bacterial primers proposed in this study demonstrated high sensitivity and specificity. Markers for the Archaea domain were more prevalent in the fecal and water samples studied. We conclude that the investigations regarding the sources of fecal pollution in public water supplies can contribute to improve the quality of human health. To our knowledge, this is the first analysis using both archaeal and bacterial fecal MST markers on tropical water bodies of Rio de Janeiro city, Brazil.

Key words | *Bacteroidales*, fecal pollution, *Methanobrevibacter* spp., microbial source tracking, water quality

Kayo Bianco
Camila Barreto
Samara Sant'Anna Oliveira
Catia Chaia Miranda
Maysa Mandetta Clementino (corresponding author)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, INCQS/FIOCRUZ,
Av. Brasil, 4365 – Manguinhos,
Rio de Janeiro,
RJ,
Brazil
E-mail: maysa.mandetta@incqs.fiocruz.br

Leonardo Henriques Pinto
Rodolpho Mattos Albano
Centro Biomédico do Hospital Universitário
Antônio Pedro,
Universidade Estadual do Rio de Janeiro, UERJ,
Rua Felipe Camarão, 58 – Vila Isabel,
Rio de Janeiro,
RJ,
Brazil

INTRODUCTION

Concerns about water quality have increased in recent years, partly due to frequent contamination of coastal and inland water resources by sewage carrying waterborne pathogens. Waterborne diseases are mainly caused by enteric pathogenic micro-organisms, which are transmitted primarily by the fecal–oral route (USDA 2012). Consequently, this situation has been aggravated in recent years due to frequent contamination of drinking, recreational, and irrigation waters by emerging pathogens such as *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*, Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7, *Vibrio cholera*, among others (WHO 2006).

Fecal pollution can reach water bodies through discharge of fecal waste or raw sewage, wastewater from livestock, hospitals, slaughterhouses, and industrial activities, among other sources (USEPA 2005). The possibility of animal waste reaching underground sources of drinking

water represents a significant public health threat. In addition, aquifers worldwide are experiencing increasing pollution threats from urbanization, industrial development, agricultural activities, and mining enterprises. Groundwater is a vital natural resource for the economic and secure provision of potable water supply in both urban and rural settings (Foster *et al.* 2002).

Owing to the economic development of metropolitan regions, the exploitation of environmental resources impacts on water availability in rivers, reservoirs, and other water sources, both in terms of quantity and quality. Consequently, there is increasing pollution of waterbodies located in the vicinity of urban regions where popular demand for proper pollution control is ever increasing (Gonçalves 2009). Thus, the monitoring of raw water is of fundamental importance in the water treatment station operational

routine, since water quality is dynamic in time and space (Carmo *et al.* 2008; Di Bernardo & Paz 2008). This dynamism has a direct influence in water treatment processes, as contaminated waters require complex procedures that generally lead to increases in water prices.

Worldwide, water quality is evaluated using culture-based enumeration of fecal indicator bacteria (e.g., *E. coli*, *enterococci*) and, more recently, by quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) (USEPA 2012). However, neither of these approaches provide information about the source of fecal pollution since these organisms are normal inhabitants of the gastrointestinal tracts of several mammals, birds, and insects (Whitman *et al.* 2005; Doud & Zurek 2012). This apparent lack of reliability of traditional indicators has driven the development and implementation of complementary indicators to detect fecal pollution in aquatic environments as microbial source tracking (MST) procedures, resulting in a high diversity of microbial biomarkers (Malakoff 2002; Wu *et al.* 2008; Ahmed *et al.* 2013; Harwood *et al.* 2014).

The determination of fecal pollution sources in aquatic ecosystems is essential to estimate associated health risks and to provide measures to remediate polluted waters (Blanch *et al.* 2008). However, field studies for the determination of the origin of fecal pollution using various available microbiological biomarkers have shown that the current methods present limitations, indicating the need for other markers (Blanch *et al.* 2008; McQuaig *et al.* 2009; Ahmed *et al.* 2012).

Anaerobic micro-organisms constitute the major part of human and other animal microflora. Considering their complex nutritional requirements and inability to grow below 30 °C, which limits their survival in extra-enteric environments, anaerobes such as *Bifidobacterium* spp., *Clostridium perfringens*, *Methanobrevibacter* spp., and members of the order *Bacteroidales* have been currently used as alternative microbial indicators of recent fecal contamination (Stewart *et al.* 2003; Bonjoch *et al.* 2004; Ufnar *et al.* 2006). In addition, their presence can be correlated to host-specific sources of fecal pollution (Bernhard & Field 2000; Bower *et al.* 2005; Savichtcheva & Okabe 2006).

The *Bacteroidales* have been proposed as a host-specific fecal biomarker as they are abundant in the feces of many warm-blooded animals, including humans, and do not survive long in the environment (Bernhard & Field 2000; Meays *et al.* 2004; Dick *et al.* 2005). Other good candidates

are archaeal representatives of the genus *Methanobrevibacter* (order *Methanobacteriales*) that includes 16 known species. These microbes inhabit the intestinal tract of animals, decaying plants, and anaerobic sludge from wastewater treatment plants. As only a few species occur in more than one host, they could be seen as specific microbial indicators of fecal pollution in environmental samples (Lai *et al.* 2004; Lee *et al.* 2013). Within this context, a variety of other biomarkers have also been proposed to discriminate fecal pollution events in environmental waters (Scott *et al.* 2002; Martellini *et al.* 2005; Lamendella *et al.* 2007; Fremaux *et al.* 2009).

The main objective of this study was to evaluate the presence of fecal host-specific markers in water bodies intended for human consumption of Região dos Lagos, Rio de Janeiro, Brazil. The São João river is the main water body of the São João basin and together with Bacaxá and Capivari rivers flows to Juturnaíba dam that provides water supply throughout the Região dos Lagos (Figure 1). As in many developing countries, large parts of the Brazilian population have no regular access to improved sanitation. This situation is all the more blatant in rural areas. Thus, there is a lack of information about wastewater disposal sources and no quality control data. The suspected sources of fecal pollution in these waterbodies are animal husbandry waste from small farms in their vicinity with direct access to the reservoir, native and feral wildlife and, to a lesser extent, human recreational activities.

In this work, microbial indicators from biologically significant fecal pollution sources such as human, equine, bovine, and swine were implemented. The host-specificity and sensitivity of *Bacteroidales* and *Methanobrevibacter* markers were assessed in fecal samples from target and non-target host groups. Subsequently, environmental water samples from São João basin were evaluated.

METHODS

Fecal sampling

To determine the host-specificity and sensitivity of the markers, 49 fecal samples were collected from six host groups. Human feces ($n = 12$) were obtained from volunteers of the laboratory

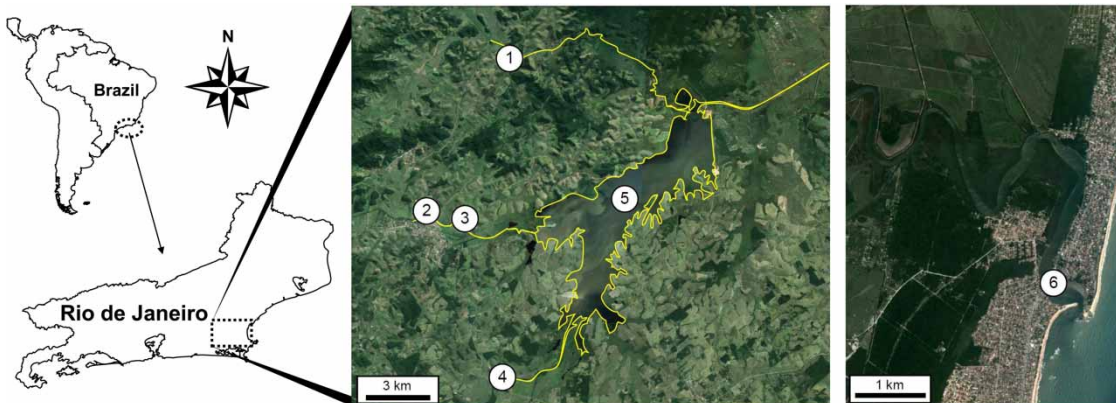


Figure 1 | Geographical location of the São João river basin in the northern state of Rio de Janeiro: (1) São João river, (2) Capivari river, (3) Capivari railway, (4) Bacaxá river, (5) Juturnaíba dam, (6) São João river mouth.

staff. Fecal samples of horse ($n = 12$), pig ($n = 8$), sheep ($n = 3$), chicken ($n = 3$), and cow ($n = 11$) came from two different farms in Mato Grosso do Sul, Brazil. Fresh animal stool samples (2–20 g) were taken in sterile Falcon tubes, maintained on ice and transported to the laboratory. Between 0.3 and 0.5 g of fecal material were resuspended in 1 mL of sodium phosphate buffer (PBS) (0.12 mol L^{-1} , pH 8.0). The diluted fecal mixture was mixed on a rotating platform to produce a homogeneous suspension and stored at -20°C .

Environmental water sampling

Environmental water samples ($n = 12$) were collected in two different seasons (November 2013 and May 2014) from Juturnaíba dam ($22^\circ 38' \text{S}/42^\circ 18' \text{W}$), São João river ($22^\circ 35' \text{S}/41^\circ 59' \text{W}$), São João river mouth ($22^\circ 35' \text{S}/41^\circ 59' \text{W}$), Capivari river ($22^\circ 38' \text{S}/42^\circ 24' \text{W}$), Capivari railway ($22^\circ 38' \text{S}/42^\circ 22' \text{W}$) and Bacaxá river ($22^\circ 42' \text{S}/42^\circ 21' \text{W}$) (Figure 1). Six of the 12 samples were collected in dry weather and the remaining six were collected following wet weather events. The water samples (5.0 L) were taken at a depth of approximately 15–20 cm below the surface in a sterile polyethylene bottle. All samples were stored on ice and conducted to the laboratory within 4 h. The enumeration of *E. coli* in 100 mL was carried out using the defined substrate method (Colilert, IDEXX), according to the protocol described in *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA 2012). Then, 4 L of each water sample were filtered through a $0.22 \mu\text{m}$ Stericup® system (Millipore). In case of filter clogging, additional filters were added. The

filters were placed in 2 mL microcentrifuge tubes with 1 mL of PBS and kept at -20°C overnight.

DNA extraction

The procedure used for DNA extraction was a modified version of previously described protocols (Ogram *et al.* 1987; Smalla *et al.* 1993). Briefly, tubes containing water sample filters and the homogeneous suspension of fecal samples were submitted to three cycles of freezing and thawing ($-70^\circ \text{C}/2 \text{ min}$, $65^\circ \text{C}/2 \text{ min}$). Then, an equal volume of glass beads (0.1 mm diameter) was added and the suspension was shaken three times for 80 s at maximum speed in a Bead-Beater. The liquid phase was extracted with phenol–chloroform [1:1 (v/v)] and chloroform–isoamyl alcohol [24:1 (v/v)]. The DNA was precipitated from the aqueous phase with three volumes of ethanol and after being dried the pellet was resuspended in $100 \mu\text{L}$ of deionized water. For further purification of the DNA, we used the Dneasy Tissue Kit (Qiagen GmgH, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions to remove possible PCR inhibitors (Clementino *et al.* 2007). Purified DNA from fecal and water samples was quantified in order to standardize the DNA concentration for further PCR reactions. These measures were obtained with a Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The possible presence of DNA amplification inhibitors in fecal and water samples was assessed by PCR reactions targeting *Bacteroidales* 16S rRNA gene with universal primers Bac32F and Bac708R (Bernhard & Field

2000) and *Methanobrevibacter* spp. *mcrA* gene with universal primers *mcrAf* and *mcrAr* (Luton *et al.* 2002). *Bacteroides fragilis* INCQS 00068/ATCC 25285 and *Methanobrevibacter smithii* INCQS A45D/DSM 11975 were used as positive control for *Bacteroidales* and *Methanobrevibacter* spp., respectively. *E. coli* INCQS 00043/ATCC 23229, *Klebsiella pneumoniae* INCQS 00629/ATCC BAA-1706, *Pantoea agglomerans* INCQS 00721/ATCC 33243 were used as negative control for both reactions. DNA templates that yielded negative results were diluted 1:10 with sterile distilled H₂O and re-tested. Approximately 25% of all fecal and water samples tested showed initial inhibition before dilution. All samples producing fragments of the expected sizes were further analyzed with the MST markers.

Primer development

PCR reactions for the detection of human- and equine-associated *Bacteroidales* were performed according to previously described protocols (Bernhard & Field 2000; Dick *et al.* 2005). However, there were no amplified fragments of the expected size even after several optimization procedures. To circumvent this issue, we designed new equine and human *Bacteroidales* specific oligonucleotides based on 16S rRNA sequences (AY212554 and AF233411, respectively) available in public databases. We also designed a new primer set for the detection of *M. gottschalkii* based on the *mcrA* gene (EU919431). The primers were designed using Primer-BLAST software (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) and synthesized by Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Primer specificity analysis was done *in silico* using BLASTn against the NCBI database and *In Silico*-PCR amplification against archaeal and bacterial genomic DNA (<http://insilico.ehu.es/PCR>).

Specificity, sensitivity, and limit of detection

MST primer sensitivity (*r*) and specificity (*s*) were tested using DNA from human, pig, horse, cow, sheep, and chicken feces. The *r* and *s* values were calculated according to the following formulas: $r = [TP / (TP + FN)]$ and $s = [TN / (TN + FP)]$, where TP is the number of samples that were positive for the PCR marker of their own species (true positive); FN is the number of samples that were negative for a

PCR marker of their own species (false negative); TN is the number of samples that were negative for a PCR marker of another species (true negative); and FP is the number of samples that were positive for a PCR marker of another species (false positive).

To determine the limit of detection (LOD) of the equine- and human-associated *Bacteroidales* and equine-associated *Methanobrevibacter* markers, serial dilutions (10^{-1} – 10^{-11}) from 20 ng of fecal DNA samples were made.

PCR conditions

PCR analysis was carried out in 50 µL amplification reaction mixtures containing 1 × PCR buffer (Invitrogen), 5% dimethyl sulfoxide (w/v), 200 µmol L⁻¹ dNTPs (Invitrogen), 2 U of Platinum *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen), 1 pmol of each primer, optimum MgCl₂ concentration (Table 1) and about 20 ng of DNA template. The cycling conditions consisted of an initial 95 °C step for 5 min and 40 cycles of amplification at 95 °C for 1 min, an annealing temperature specific for each primer set (Table 1) for 1 min, 72 °C for 1 min and a final elongation at 72 °C for 6 min. PCR products were loaded onto a 1% (v/v) agarose gel, and were separated by electrophoresis at 70 V for 2 h in 1 × TAE (40 mmol L⁻¹ Tris base, 20 mmol L⁻¹ sodium acetate, 1 mmol L⁻¹ EDTA, pH 8.0) buffer with a 100 bp DNA ladder (Invitrogen) as molecular weight standard. The gels were stained with ethidium bromide and gel images were digitalized with the Video Documentation System and analyzed with ImageMaster software (Amersham Pharmacia Biotech).

The reproducibility for amplification of host-specific *Bacteroidales* and archaeal markers was evaluated in triplicate PCR reactions with at least two fecal DNA samples from target hosts. In addition, for archaeal markers, DNA from the reference strains *Methanobrevibacter smithii* INCQS A45D/DSM 11975, *M. ruminantium* INCQS A36D/DSM 1093, and *M. gottschalkii* INCQS A49D/DSM 11977 were used as positive controls for human, bovine, and equine MST markers, respectively.

Host-specific *Bacteroidales* PCR fragments were purified using the QIAquick[®] PCR Purification kit (Qiagen GmgH, Hilden, Germany) and sequenced with the Big Dye Terminator Kit and analyzed on the ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Table 1 | Oligonucleotides, target genes, and PCR conditions

Primer	Sequence (5'-3')	Target	MgCl ₂ (mM)	Annealing temp (°C)	Product size (bp)	Reference
HuM113F	ACTCTTGGCCAGCCTTCTGA	16S rRNA/Human-associated <i>Bacteroidales</i>	1.5	57	290	This study
HuM403R	ACCCATAGGGCAGTCATCCT					
Mnif-342F	AACAGAAAACCCAGTGAAGAG	<i>nifH</i> / <i>Methanobrevibacter smithii</i>	2.0	58	222	Ufnar et al. (2006)
Mnif-363R	ACGTAAAGGCACTGAAAAACC					
CF128F	CCAACYTTCCCGWTACTC	16S rRNA/Bovine-associated <i>Bacteroidales</i>	1.5	56	464	Bernhard & Field (2000)
CF592R	AYMTCCCGTCTACGCTCC					Liu et al. (2012)
Mrnif-F	AATATTGCAGCAGCTTACAGTGAA	<i>nifH</i> / <i>Methanobrevibacter ruminantium</i>	2.0	56	336	Ufnar et al. (2007a)
Mrnif-R	TGAAAATCCTCCGCAGACC					
PF163F	GCGGATTAATACCGTATGA	16S rRNA/Swine-associated <i>Bacteroidales</i>	1.5	55	385	Dick et al. (2005)
PF548R	CCCAATAAATCCGGATAACG					This study
P23-2 F	TCTGCGACACCGGTAGCCATTGA	<i>mcrA</i> /P23-2 Clone	2.0	60	258	Ufnar et al. (2007b)
P23-2 R	ATACACTGGCGACATTCTTGAGGATTAC					
HoR201F	TGGGGATGCGTCTGATTAGC	16S rRNA/Equine-associated <i>Bacteroidales</i>	1.5	53	242	This study
HoR442R	CCCACACGTGGGTCACTTTA					
GoT285F	GCACAACTGGTTTAAGCGGA	<i>mcrA</i> / <i>Methanobrevibacter gottschalkii</i>	1.5	54	120	This study
GoT404R	GGAGAATACGTTAGCAGCACCA					

Electropherograms were converted to fasta format through Sequencher 3.0 software (Gene Codes Corporation, Ann Harbor, MI, USA). Nucleotide similarity searches were carried out online with BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) against GenBank (NCBI). The sequences reported in this study were submitted to GenBank/NCBI database under accession numbers KM924823–KM924826.

RESULTS

Enumeration of *E. coli*

Ten water samples showed *E. coli* levels within acceptable limits (0–920 MPN/100 mL) according to Brazilian

standards (CONAMA 2005). The two other samples, Capivari railway and São João river mouth, had *E. coli* counts above the recommended limit (1,119.9 and 2,682 MPN/100 mL, respectively).

Specificity, sensitivity, and LOD

Host-specificity and -sensitivity of human-, bovine-, equine-, and swine-associated markers were evaluated by screening 49 fecal samples from six host groups. The archaeal human marker was detected in all (12/12) human fecal DNA samples tested but not in non-target host groups (0/37). However, the *Bacteroidales* human marker was positive in eight of 12 human samples and one of 37 animal fecal DNA samples (Table 2). The bovine archaeal marker was positive for 10 of

Table 2 | Specificity assays for host-specific markers in fecal samples

Target	No. of samples tested	No. of positive PCR results							
		Human markers		Bovine markers		Swine markers		Equine markers	
		Archaea	Bacteria	Archaea	Bacteria	Archaea	Bacteria	Archaea	Bacteria
Human	12	12/12 (100%)	8/12 (67%)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Swine	8	ND	ND	ND	ND	8/8 (100%)	7/8 (91%)	ND	ND
Cow	11	ND	ND	(10/11) 91%	11/11 (100%)	ND	ND	ND	ND
Horse	12	ND	ND	ND	ND	ND	ND	12/12 (100%)	10/12 (83%)
Chicken	3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Sheep	3	ND	1/3 (33%)	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND, not detected.

11 bovine DNA samples while the *Bacteroidales* bovine marker was detected in all cow fecal samples analyzed (11/11). The swine archaeal marker was detected in all pig fecal samples (8/8) while the archaeal equine marker was amplified in all equine samples (12/12). On the other hand, the swine and equine *Bacteroidales* markers were detected in seven of eight and 10 of 12 of each host's samples, respectively (Table 2).

The overall sensitivity of the human-, swine-, and equine-associated archaeal markers to differentiate between its own host group and other animal fecal samples was 1 (maximum value of 1) as was the bovine-associated bacterial marker. Human-, equine-, and swine-associated *Bacteroidales* indicator sensitivity values were 0.67, 0.83, and 0.88, respectively, whereas for the bovine-associated archaeal marker it was 0.91. The specificity value for all archaeal markers and for swine- and equine-associated *Bacteroidales* markers was 1 (maximum value of 1). The specificity value for both human and bovine *Bacteroidales* markers was 0.97. All sensitivity and specificity results are given in Table 3.

The equine archaeal marker was able to amplify a visible fragment up to a dilution of 10^{-5} of horse fecal DNA. The LOD of the remaining biomarkers was established at a 10^{-2} DNA dilution. To determine the reproducibility of the assays, several replicates ($n = 5$) of serially diluted genomic DNA were tested.

Biomarker detection in water samples

M. smithii and *M. ruminantium* were detected in all (12/12) water samples while human- and ruminant-associated *Bacteroidales* markers were detected in nine and eight of 12 samples, respectively. The P23-2 clone (*mcrA* gene) was present in eight of 12 water samples and swine-associated *Bacteroidales* was present in all samples (12/12). The *M. gottschalkii* marker was found in 12 of 12 water samples, while the equine-associated *Bacteroidales* was detected in seven of 12 samples analyzed (Figure 2).

Table 3 | Sensitivity and specificity of the MST markers

Value	Human markers		Bovine markers		Swine markers		Equine markers	
	Archaea	Bacteria	Archaea	Bacteria	Archaea	Bacteria	Archaea	Bacteria
Sensitivity (r)	1	0.67	0.91	1	1	0.88	1	0.83
Specificity (s)	1	0.97	1	0.97	1	1	1	1

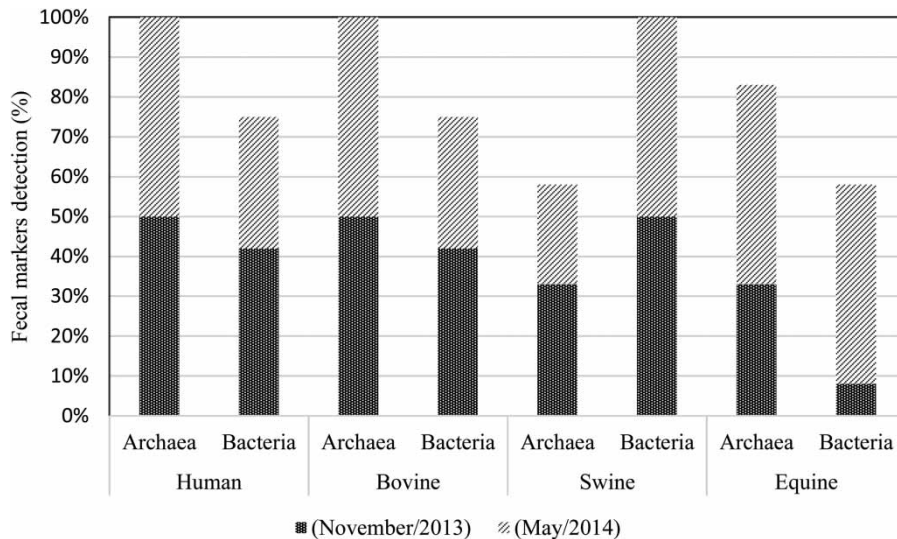


Figure 2 | Detection of biomarkers for different fecal sources.

16S rRNA sequences were analyzed by BLAST to search for sequence similarity with other sequences already available in the GenBank database. The 16S rRNA gene sequences of *Bacteroidales* markers showed 98% identity with those of bovine, human, and equine and 100% with porcine *Bacteroidales* sequences deposited in GenBank.

DISCUSSION

The aim of this study was to evaluate the presence of fecal host-specific markers in water bodies intended for human consumption. In order to increase the likelihood of identifying fecal contamination sources, novel specific molecular markers, including human-, swine-, and equine-associated *Bacteroidales* and *M. gottschalkii* were proposed (Table 1). In addition, previously described bovine-associated *Bacteroidales* and *M. smithii*, *M. ruminantium*, and swine-associated P23 clone markers were used (Bernhard & Field 2000; Ufnar et al. 2006, 2007a, b; Liu et al. 2012). To the best of our knowledge, this is the first analysis using both archaeal and bacterial fecal biomarkers on tropical water bodies of Rio de Janeiro city, Brazil.

The correlation between some MST markers and traditional fecal indicators is not well documented. A study in northwest France showed a significant correlation between *E. coli* concentrations and the presence of human

markers whereas no correlation was observed for other animal markers. Some inconsistencies between *E. coli* concentrations and some host-specific *Bacteroidales* in environmental samples have been found previously (Shanks et al. 2006; Gourmelon et al. 2007). In the present study, all 10 samples presenting *E. coli* levels that were within acceptable limits according to Brazilian standards (<1,000 MPN/100 mL), showed fecal contamination with at least five MST biomarkers. However, a sample with low and two others with high *E. coli* counts showed the presence of all eight host-specific markers.

Many hypotheses could explain a lack of correlation in some situations: differential fecal inputs, persistence and survival of *E. coli*, methanogens, and *Bacteroidales* in the environment and differences in detection methods, including molecular techniques for host-specific markers and culture for *E. coli* and enterococci (Brion et al. 2002; Cole et al. 2003; Shanks et al. 2006). To identify the origin of fecal contamination, which is currently determined by *E. coli* or enterococcus counts, more information is needed about the persistence of the biomarkers in the environment and their correlation to these fecal indicator bacteria (Long & Sobsey 2004; Shanks et al. 2006).

M. smithii and *M. ruminantium nifH* genes were detected in 100% (12/12) of the water samples while human and bovine *Bacteroidales* 16S rDNA sequences were detected in 75% (9/12) of the samples tested. In

addition, the human-associated archaeal marker showed higher specificity and sensitivity than the bacterial one. On the other hand, the bovine-associated archaeal marker showed higher specificity and lower sensitivity compared with the bacterial marker (Table 3).

A study conducted in Australia evaluated the host specificity and sensitivity of the *nifH* gene marker in fecal and wastewater samples from 11 animal species, including humans. The host specificity reported in this particular study was 96% while sensitivity of the marker for human-derived sewage was 81%. The prevalence of the marker in environmental water samples was relatively low compared with the others tested (*esp*, HF183, HPyVs, and adenoviruses). The authors concluded that this marker alone might not be sensitive enough to detect fecal pollution in environmental waters; however, its relatively high host specificity argues for its use in conjunction with other human markers (Ahmed *et al.* 2012). Nevertheless, we observed 100% of sensitivity and specificity for the human host *nifH* marker in our study, supporting its use in future investigations.

Our results also demonstrated that swine fecal contamination was observed in 100% (12/12) of the water samples by the amplification of the *Bacteroidales* marker compared to 66.6% (8/12) detected by the *mcrA* gene from methanogenic organisms. Nevertheless, the *mcrA* gene marker was more sensitive and specific than the swine-associated *Bacteroidales* marker. It is noteworthy that the equine-associated *mcrA* primers described in this study showed high specificity and sensitivity, being detected in 100% (12/12) of the water samples tested in contrast to 58.3% (7/12) using equine-associated *Bacteroidales* markers.

The environmental pollution caused by swine waste is a serious problem due to the high number of contaminants, causing a powerful degradation of air, soil, and mostly of water resources (surface and groundwater) (Seganfredo 2000). Pig waste has a high concentration of biodegradable matter, pathogenic micro-organisms (*Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Giardia lamblia*, *Taenia solium*), nitrogen, and minerals such as copper, zinc, and arsenic (Schmidt *et al.* 2007; Scanlon *et al.* 2013). In agricultural areas, and even urban areas, we can also observe equine husbandry and horse-breeding, producing about 7–8 kg/animal/day of waste (20% urine and 80% solid material), that is richer in

nitrogen than pig or cow feces (Matos 2005). Infections of humans with *Bacillus anthracis* and *Salmonella enterica* that cause anthrax and salmonellosis, respectively, and worms such as *Trichinella spirallis* have been associated with contaminated horse feces (Molinaro 2009).

Despite the importance of the São João river basin, little is known about its water body quality, where monitoring only started in May 2011. Moreover, there are no records of Juturnaiba dam water quality control. Although the dam is considered a wildlife sanctuary, the results of our study demonstrated the presence of fecal pollution from human, bovine, swine, and equine sources.

The novel archaeal and bacterial primers proposed in this study demonstrated high sensitivity and specificity. Interestingly, markers of the Archaea domain were more prevalent, in both the feces and water bodies studied. Nevertheless, a study in northwest France showed that host-specific *Bacteroidales* markers were found to be more sensitive than other biomarkers tested in environmental water samples, especially where low numbers of *E. coli* were found (Gourmelon *et al.* 2007).

Specificity and sensitivity of host-associated markers may vary according to the studied region and should be locally validated before their inclusion in regular water. Variations may occur due to diet or feeding differences and decay rates of the markers at different environmental conditions (Walters & Field 2006; Field & Samadpour 2007; Eichmiller *et al.* 2014). The bovine-associated marker *Bacteroidales* CF128, for instance, has been detected in $\leq 10\%$ of pig feces samples in Oregon and Ireland but was observed in $\geq 90\%$ of pig feces samples in France, Portugal, and the UK (Bernhard & Field 2000; Gawler *et al.* 2007).

The MST approach should be carried out using several water samples, with regular sampling intervals combined with conventional fecal indicator monitoring and also include samples taken in both dry and rainfall weather events. Our data suggest that the use of more than one MST marker to identify the source of fecal contamination is valuable because each of these methods has its strengths and weaknesses that can limit the usefulness of MST. The most commonly used marker, for example, *Bacteroides* HF183, is not entirely specific for human waste. However, it has the advantages of being widely distributed in the human population and being present at relatively high

concentration in wastewater (Carson *et al.* 2005; Gawler *et al.* 2007; Gourmelon *et al.* 2007; Ahmed *et al.* 2009).

Finally, we conclude that although MST tools are widely accepted as alternative methods to evaluate sources of pollution, threshold values have not yet been entirely determined to assess the microbial quality of a water body. Meanwhile, the investigations regarding the sources of fecal pollution in public water supplies can contribute to the implementation of better monitoring programs and remediation strategies in order to improve the quality of human health and ecosystems.

ACKNOWLEDGEMENTS

We gratefully acknowledge the Genome Sequencing Core-PDTIS/FIOCRUZ. We also would like to thank Dr Ivano de Filippis for his critical reading of the manuscript. This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), and INCQS/FIOCRUZ.

REFERENCES

- Ahmed, W., Goonetilleke, A., Powell, D., Chauhan, K. & Gardner, T. 2009 Comparison of molecular markers to detect fresh sewage in environmental waters. *Water Res.* **43** (19), 4908–4917.
- Ahmed, W., Sidhu, J. P. & Toze, S. 2012 Evaluation of the *nifH* gene marker of *Methanobrevibacter smithii* for the detection of sewage pollution in environmental waters in Southeast Queensland, Australia. *Environ. Sci. Technol.* **46** (1), 543–550.
- Ahmed, W., Sritharan, T., Palmer, A., Sidhu, J. P. S. & Toze, S. 2013 Evaluation of bovine feces-associated microbial source tracking markers and their correlations with fecal indicators and zoonotic pathogens in a Brisbane, Australia, reservoir. *Appl. Environ. Microbiol.* **79** (8), 2682–2691.
- APHA (American Public Health Association), AWWA (American Water Works Association), WEF (Water Environment Federation) 2012 *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 22nd edn. APHA, Washington, DC.
- Bernhard, A. E. & Field, K. G. 2000 Identification of non-point sources of fecal pollution in coastal waters by using host-specific 16S ribosomal DNA genetic markers from fecal anaerobes. *Appl. Environ. Microbiol.* **66** (4), 1587–1594.
- Blanch, A. R., Lucena, F., Payán, A. & Jofre, J. 2008 Minimal requirements for parameters to be used in the development of predictive models for microbial source tracking: somatic coliphages and phages infecting *Bacteroides* as examples. *J. Environ. Detect.* **1** (1), 2–21.
- Bonjoch, X., Balleste, E. & Blanch, A. R. 2004 Multiplex PCR with 16S rRNA gene targeted primers of *Bifidobacterium* spp. to identify sources of fecal pollution. *Appl. Environ. Microbiol.* **70** (5), 3171–3175.
- Bower, P. A., Scopel, C. O., Jensen, E. T., Depas, M. M. & McLellan, S. L. 2005 Detection of genetic markers of fecal indicator bacteria in Lake Michigan and determination of their relationship to *Escherichia coli* densities using standard microbiological methods. *Appl. Environ. Microbiol.* **71** (12), 8305–8313.
- Brion, G. M., Meschke, J. S. & Sobsey, M. D. 2002 F-specific RNA coliphages: occurrence, types, and survival in natural waters. *Water Res.* **36** (9), 2419–2425.
- Carmo, R. F., Bevilacqua, P. D. & Bastos, R. K. X. 2008 Drinking water quality surveillance: qualitative approach of hazard identification. *Eng. Sanit. Ambient.* **13** (4), 426–434.
- Carson, C. A., Christiansen, J. M., Yampara-Iquise, H., Benson, V. W., Baffaut, C., Davis, J. V., Broz, R. R., Kurtz, W. B., Rogers, W. M. & Fales, W. H. 2005 Specificity of a *Bacteroides thetaiotaomicron* marker for human feces. *Appl. Environ. Microbiol.* **7** (8), 4945–4949.
- Clementino, M. M., Fernandes, C. C., Vieira, R. P., Cardoso, A. M., Polycarpo, C. R. & Martins, O. B. 2007 Archaeal diversity in naturally occurring and impacted environments from a tropical region. *J. Appl. Microbiol.* **103** (1), 141–151.
- Cole, D., Long, S. C. & Sobsey, M. D. 2003 Evaluation of F+ RNA and DNA coliphages as source-specific indicators of fecal contamination in surface waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **69** (11), 6507–6514.
- CONAMA (Brazilian National Environmental Council) 2005 Resolution n. 357: On the classification of water bodies and environmental guidelines for its categorization, as well as it establishes conditions and standards for effluent release, and provides other measures. DOU n. 053, pp. 58–63.
- Di Bernardo, L. & Paz, L. P. S. 2008 *Selection of Water Treatment Technology*, Vol. 1, 1st edn. LDiBe, São Paulo, Brazil.
- Dick, L. K., Bernhard, A. E., Brodeur, T. J., Santo Domingo, J. W., Simpson, J. M., Walters, S. P. & Field, K. G. 2005 Host distributions of uncultivated fecal *Bacteroidales* bacteria reveal genetic markers for fecal source identification. *Appl. Environ. Microbiol.* **71** (6), 3184–3191.
- Doud, C. W. & Zurek, L. 2012 *Enterococcus faecalis* OG1RF: pmV158 survives and proliferates in the house fly digestive tract. *J. Med. Entomol.* **49** (1), 150–155.
- Eichmiller, J. J., Bajer, P. G. & Sorensen, P. W. 2014 The relationship between the distribution of common carp and their environmental DNA in a small lake. *PLoSOne* **9** (11), e112611.
- Field, K. G. & Samadpour, M. 2007 Fecal source tracking, the indicator paradigm, and managing water quality. *Water Res.* **41** (16), 3517–3538.

- Foster, S., Hirata, R., Gomes, D., D'elia, M. & Paris, M. 2002 *Groundwater Quality Protection: A Guide for Water Service Companies, Municipal Authorities and Environment Agencies*. The World Bank, Washington, DC, p. 114.
- Fremaux, B., Gritzfeld, J., Boa, T. & Yost, C. K. 2009 Evaluation of host-specific *Bacteroidales* 16S rRNA gene markers as a complementary tool for detecting fecal pollution in a prairie watershed. *Water Res.* **43** (19), 4838–4849.
- Gawler, A. H., Beecher, J. E., Brandão, J., Carroll, N. M., Falcão, L., Gourmelon, M., Masterson, B., Nunes, B., Porter, J., Rince, A., Rodrigues, R., Thorp, M., Walters, J. M. & Meijer, W. G. 2007 Validation of host-specific *Bacteroidales* 16S rRNA genes as markers to determine the origin of faecal pollution in Atlantic Rim countries of the European Union. *Water Res.* **41** (16), 3780–3784.
- Gonçalves, R. F. 2009 *Water and Energy Conservation in Private and Public Systems of Water Supply*. ABES, Rio de Janeiro, Brazil.
- Gourmelon, M., Caprais, M. P., Segura, R., Le Mennec, C., Lozach, S., Piriou, J. Y. & Rince, A. 2007 Evaluation of two library independent microbial source tracking methods to identify sources of fecal contamination in French estuaries. *Appl. Environ. Microbiol.* **73** (15), 4857–4866.
- Harwood, V. J., Staley, C., Badgley, B. D., Borges, K. & Korajkic, A. 2014 Microbial source tracking markers for detection of fecal contamination in environmental waters: relationships between pathogens and human health outcomes. *FEMS Microbiol. Rev.* **38** (1), 1–40.
- Lai, M. C., Lin, C. C., Yu, P. H., Huang, Y. F. & Chen, S. C. 2004 *Methanocalculus chunghsingensis* sp. nov., isolated from an estuary and a marine fishpond in Taiwan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54** (1), 183–189.
- Lamendella, R., Domingo, J. W. S., Oerther, D. B., Vogel, J. R. & Stoeckel, D. M. 2007 Assessment of fecal pollution sources in a small northern-plains watershed using PCR and phylogenetic analyses of *Bacteroidetes* 16S rRNA gene. *FEMS Microbiol. Ecol.* **59** (3), 651–660.
- Lee, J. H., Kumar, S., Lee, G. H., Chang, D. H., Rhee, M. S., Yoon, M. H. & Kim, B. C. 2013 *Methanobrevibacter boviskoreani* sp. nov., isolated from the rumen of Korean native cattle. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **63** (11), 4196–4201.
- Liu, R., Chan, C. F., Lun, C. H. & Lau, S. C. 2012 Improving the performance of an end-point PCR assay commonly used for the detection of *Bacteroidales* pertaining to cow feces. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **93** (4), 1703–1713.
- Long, S. C. & Sobsey, M. D. 2004 A comparison of the survival of F + RNA and F + DNA coliphages in lake water microcosms. *J. Water Health* **2** (1), 15–22.
- Luton, P. E., Wayne, J. M., Sharp, R. J. & Riley, P. W. 2002 The *mcrA* gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. *Microbiology* **148** (11), 3521–3530.
- Malakoff, D. 2002 Microbiologists on the trail of polluting bacteria. *Science* **295** (5564), 2352–2353.
- Martellini, A., Payment, P. & Villemur, R. 2005 Use of eukaryotic mitochondrial DNA to differentiate human, bovine, porcine and ovine sources in fecally contaminated surface water. *Water Res.* **39** (4), 541–548.
- Matos, A. T. 2005 *Management and Treatment of Agroindustrial Waste* (Series. Didactic Notebooks No. 31). AEAGRI, Viçosa, p. 128.
- McQuaig, S. M., Scott, T. M., Lukasik, J. O., Paul, J. H. & Harwood, V. J. 2009 Quantification of human polyomaviruses JC Virus and BK Virus by TaqMan quantitative PCR and comparison to other water quality indicators in water and fecal samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **75** (11), 3379–3388.
- Meays, C. L., Broersma, K., Nordin, R. & Mazumder, A. 2004 Source tracking fecal bacteria in water: a critical review of current methods. *J. Environ. Manage.* **73** (1), 71–79.
- Molinario, E. M. 2009 *Methods and Procedures of Training for Health Laboratory Professionals*, Vol. 4. EPSJV/IOC, Rio de Janeiro, Brazil.
- Ogram, A., Saylor, G. S. & Barkay, T. 1987 The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *J. Microbiol. Methods* **7**, 57–66.
- Savichtcheva, O. & Okabe, S. 2006 Alternative indicators of fecal pollution: relations with pathogens and conventional indicators, current methodologies for direct pathogen monitoring and future application perspectives. *Water Res.* **40** (13), 2463–2476.
- Scanlon, K. A., Cagney, C., Walsh, D., McNulty, D., Carroll, A., Mcnamara, E. B., McDowell, D. A. & Duffy, G. 2013 Occurrence and characteristics of fastidious *Campylobacteraceae* species in porcine samples. *Int. J. Food Microbiol.* **163** (1), 6–13.
- Schmidt, G. A., Legrande, A. N. & Hoffmann, G. 2007 Water isotope expressions of intrinsic and forced variability in a coupled ocean-atmosphere model. *J. Geophys. Res.* **112** (D10), D10103, doi: 10.1029/2006JD007781.
- Scott, T. M., Rose, J. B., Jenkins, T. M., Farrah, S. R. & Luhasik, J. 2002 Microbial source tracking: current methodology and future directions. *Appl. Environ. Microbiol.* **68** (12), 5796–5803.
- Seganfredo, M. A. 2000 *The environmental issue in the use of pig manure as a soil fertilizer*, Technical Circular Letter 22. Embrapa Swine and Poultry, Santa Catarina, Brazil.
- Shanks, O. C., Nietch, C., Simonich, M., Younger, M., Reynolds, D. & Field, K. G. 2006 Basin-wide analysis of the dynamics of fecal contamination and fecal source identification in Tillamook Bay, Oregon. *Appl. Environ. Microbiol.* **72** (8), 5537–5546.
- Smalla, K., Cresswell, N., Mendonca-Hagler, L. C., Wolters, A. & van Elsas, J. D. 1993 Rapid DNA extraction protocol from soil for polymerase chain reaction-mediated amplification. *J. Appl. Bacteriol.* **74**, 78–85.
- Stewart, J. R., Ellender, R. D., Gooch, J. A., Jiang, S., Myod, P. & Weisberg, S. B. 2003 Recommendations for microbial source tracking: lessons from a methods comparison study. *J. Water Health* **1** (4), 225–231.

- Ufnar, J. A., Wang, S. Y., Christiansen, J. M., Yampara-Iquise, H., Carson, C. A. & Ellender, R. D. 2006 *Detection of the nifH gene of Methanobrevibacter smithii: a potential tool to identify sewage pollution in recreational waters*. *J. Appl. Microbiol.* **101** (1), 44–52.
- Ufnar, J. A., Wang, S. Y., Ufnar, D. F. & Ellender, R. D. 2007a *Methanobrevibacter ruminantium as an indicator of domesticated-ruminant fecal pollution in surface waters*. *Appl. Environ. Microbiol.* **73** (21), 7118–7121.
- Ufnar, J. A., Ufnar, D. F., Wang, S. Y. & Ellender, R. D. 2007b *Development of a swine specific fecal pollution marker based on host differences in methanogen mcrA genes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **73** (16), 5209–5217.
- USDA 2012 *Introduction to Waterborne Pathogens in Agricultural Watersheds*. United States Department of Agriculture, Washington, DC.
- USEPA 2005 *Microbial Source Tracking Guide Document, EPA 600-R-05-064*. Office of Research and Development, United States Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- USEPA 2012 *Method 1611: Enterococci in Water by TaqMan[®] Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) Assay, EPA-821-R-12-008*. Office of Water, United States Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- Walters, S. P. & Field, K. G. 2006 *Persistence and growth of fecal Bacteroidales assessed by bromodeoxyuridine immunocapture*. *Appl. Environ. Microbiol.* **72** (7), 4532–4539.
- Whitman, R. L., Byers, S. E., Shively, D. A., Ferguson, D. M. & Byappanahalli, M. 2005 *Occurrence and growth characteristics of Escherichia coli and enterococci within the accumulated fluid of the northern pitcher plant (Sarracenia purpurea L.)*. *Can. J. Microbiol.* **51** (12), 1027–1037.
- WHO 2006 *Guidelines for Drinking Water Quality: Incorporating First Addendum*, Vol. 1, 3rd edn. World Health Organization, Geneva.
- Wu, J., Yue, J., Hu, R., Yang, Z. & Zhang, L. 2008 *Use of caffeine and human pharmaceutical compounds to identify sewage contamination*. *World Acad. Sci. Eng. Technol.* **44**, 438–442.

First received 22 December 2014; accepted in revised form 10 April 2015. Available online 1 June 2015

APÊNDICE D - ARTIGOS PUBLICADOS EM CO-AUTORIA

Detection of human fecal contamination by *nifH* gene quantification of marine waters in the coastal beaches of Rio de Janeiro, Brazil

Samara Sant'Anna Oliveira¹ · Marcos Henrique Ferreira Sorgine² · Kayo Bianco¹ · Leonardo Henriques Pinto³ · Camila Barreto¹ · Rodolpho Mattos Albano³ · Alexander Machado Cardoso⁴ · Maysa Mandetta Clementino¹

Received: 22 September 2015 / Accepted: 15 September 2016
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

Abstract The identification of fecal pollution in aquatic ecosystems is one of the requirements to assess the possible risks to human health. In this report, physicochemical parameters, *Escherichia coli* enumeration and *Methanobrevibacter smithii* *nifH* gene quantification were conducted at 13 marine waters in the coastal beaches of Rio de Janeiro, Brazil. The pH, turbidity, dissolved oxygen, temperature, and conductivity, carried out by mobile equipment, revealed varied levels due to specific conditions of the beaches. The bioindicators' enumerations were done by defined substrate method, conventional, and real-time PCR. Six marine beach sites (46 %) presenting *E. coli* levels in compliance with Brazilian water quality guidelines (<2500 MPN/100 mL) showed *nifH* gene between 5.7×10^9 to 9.5×10^{11} copies. L⁻¹ revealing poor correlation between the two approaches. To our knowledge, this is the first inquiry in qPCR using *nifH* gene as a biomarker of human-specific sources of sewage pollution in marine waters

in Brazil. In addition, our data suggests that alternative indicator *nifH* gene could be used, in combination with other markers, for source tracking studies to measure the quality of marine ecosystems thereby contributing to improved microbial risk assessment.

Keywords Human fecal pollution · *Methanobrevibacter smithii* · Marine water quality · *nifH* gene · qPCR · Fecal indicator

Introduction

Water is essential to life and to the maintenance of ecosystems. The assurance of a plentiful supply of water is essential for all ecological processes with a direct influence on human health, quality of life and development. Thus, maintaining the quality of water resources has been one of the biggest challenges of this century, mainly due to the indiscriminate use and recurrent contamination (Wimalawansa and Wimalawansa 2014). Waterbodies are susceptible to contamination from a range of point and nonpoint sources with potential contributions from wildlife, domesticated animals, and/or humans. Sources of fecal pollution may include discharge of raw sewage, surface runoff, slaughterhouses, and industrial activities (Oliveira and Cunha 2014).

Recreational water users can be exposed to a range of disease-causing microorganisms; however, waters contaminated with human feces are regarded as a greater risk to human health, as they are more likely to contain human-specific enteric pathogens, including *Salmonella enterica* serovar *Typhi*, *Shigella* spp., hepatitis A virus, and Norwalk-group viruses. Despite these, animals can also serve as reservoirs for a variety of enteric pathogens as various serotypes of *Salmonella* spp.,

Responsible editor: Philippe Garrigues

✉ Maysa Mandetta Clementino
maysa.mandetta@incqs.fiocruz.br

- ¹ Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Avenida Brasil, 4365, Maginhos, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil
- ² Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Bioquímica Médica, Ilha do Fundão, Cidade Universitária, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil
- ³ Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Avenida 28 de setembro, 87, Vila Isabel, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil
- ⁴ Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, UEZO, Av. Manuel Caldeira de Alvarenga, 1203, Campo Grande, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Escherichia coli, and *Cryptosporidium* spp. (Fewtrell and Kay 2015).

Microbiological water quality has been evaluated frequently by means of fecal indicator bacteria such as total coliforms, thermotolerant coliforms, *E. coli* and enterococci. However, the ubiquitous nature of these microorganisms and the lack of discriminatory power, and low correlation with pathogens such as *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. and human enterovirus, and sub or overestimated counts, especially in tropical environments, brought the need for alternative methods (Field and Samadpour 2007).

Microbial source tracking (MST) is one of the different names given to the process of identifying the particular source of fecal contamination in water (Stoeckel and Harwood 2007). Over the last decade, several MST techniques have been developed to discriminate between human and non-human sources of fecal contamination in recreational waters, including different animal species (Scott et al. 2005; Foley et al. 2009; Eckburg et al. 2005; Johnston et al. 2010).

Several anaerobic microorganisms such as *Bifidobacterium* spp., *Clostridium perfringens*, *Methanobrevibacter* spp., and members of the order Bacteroidales are currently being used as alternative microbial indicators of recent fecal contamination. This is due to their higher abundance compared with traditional indicators, inability to grow in extra-enteric environments, and high specificity (Santo Domingo et al. 2007; Stewart-Pullaro et al. 2006; Ufnar et al. 2006; Ballesté et al. 2010).

The archaeal genus *Methanobrevibacter* belongs to the order Methanobacteriales and includes 16 known species found in animal intestinal tracts, anaerobic sludge, and sewage treatment plants (Lai et al. 2004). *Methanobrevibacter smithii* is a methanogen known to colonize human intestine and vaginal tract. Due to its host specificity and high concentrations in human intestine, it may be effective as an indicator for human fecal pollution in environmental waters (Ufnar et al. 2006). The *nifH* gene of *M. smithii* is grouped on the pseudo *nif* cluster found only in methanogens and does not encode a functional nitrogenase. Thus, it can be considered as a specific target for methanogens such as *M. smithii* (Ufnar et al. 2006).

Several strategies have been developed to detect and quantify fecal pollution in water environments; most of them based on qPCR assays toward for determination of specific microorganisms from animal gut, mainly using 16S rRNA gene (Bernhard et al. 2003; Scott et al. 2005; Fong et al. 2005; McQuaig et al. 2009).

The *nifH* marker appeared to be highly host-specific and has been used to detect sewage pollution in environmental waters in California, Mississippi, and Florida, in the USA (Ahmed et al. 2012). However, its host specificity in other countries is not well known. Thus, the aim of this study was to detect the presence of human fecal contamination at 13 coastal recreation beaches by standard methods, in

combination with the quantification of alternative bioindicator *nifH* gene in marine waters of Rio de Janeiro, Brazil.

Methods

Environmental water sampling

The collection points included the following: Prainha beach (sea and stream water) (23° 04' 08.97" S/43° .50' 57.77" W), Leblon beach (22° 98' 75.13" S, 43° 22' 21.1" W), Leblon channel (22° .98' 68.32" S/43° .21' 54.74" W), Copacabana beach (22° 58' 31.2" S/43° 11' 12.6" W), Ramos pool (22° 50' 22.8" S/43° 14' 59.9" W), São Bento beach (22° 82' 31.62" S/43° 18' 97.7" W), Bica beach (22° 81' 93.44" S/43° 20' 05.42" W), Engenhoca beach (22° 82' 13.22" S/43° 17' 05.87" W), Guanabara beach (22° 79' 07.42" S/43° 16' 50.29" W), São Francisco beach (22° 92' 67.77" S/43° 10' 42.79" W), Seca beach (22° 88' 81.95" S/42° 34' 00.43" W), and Pontinha beach (22° 93' 94.24" S/42° 28' 16.78" W) (Fig. 1). Five liters from superficial water samples were collected in triplicate at sites that were about 2 m distant from each other, taken from a depth of approximately 30 cm below the water surface and mixed, in order to get a representative sample. All samples were stored in sterile polyethylene bottles on ice and transported to the laboratory within 4 h. Physicochemical parameters, temperature, pH, conductivity, dissolved oxygen (DO), turbidity, and salinity of the samples were analyzed using Water Quality Checker U-10 (HORIBA). The enumeration of *E. coli* was carried out using the defined substrate method (Colilert, IDEXX), according to the protocol described in Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA 2012). Then, 4 L of each water sample were filtered through a 0.22- μ m Stericup® system (Millipore). In the event of filter clogging, additional filters were added. The filters were placed in 2-mL microcentrifuge tubes with 1 mL of PBS and kept at -20 °C overnight.

DNA extraction

The procedure used for DNA extraction was a modified version by Bianco et al. 2015 of previously described protocols (Ogram et al. 1987; Smalla et al. 1993). Briefly, tubes containing water sample filters and PBS were submitted to 3 cycles of freezing and thawing (-70 °C/2 min, 65 °C/2 min). Then, an equal volume of glass beads (0.1-mm diameter) was added and the suspension was shaken three times for 80 s at maximum speed in a Bead-Beater. The liquid phase was extracted with phenol–chloroform [1:1 (v/v)] and chloroform–isoamyl alcohol [24:1 (v/v)]. The DNA was precipitated from the aqueous phase with three volumes of ethanol and after drying, the pellet was dissolved in 100 μ L of sterile deionized water. For further purification of the DNA, we used the QIAquick® PCR

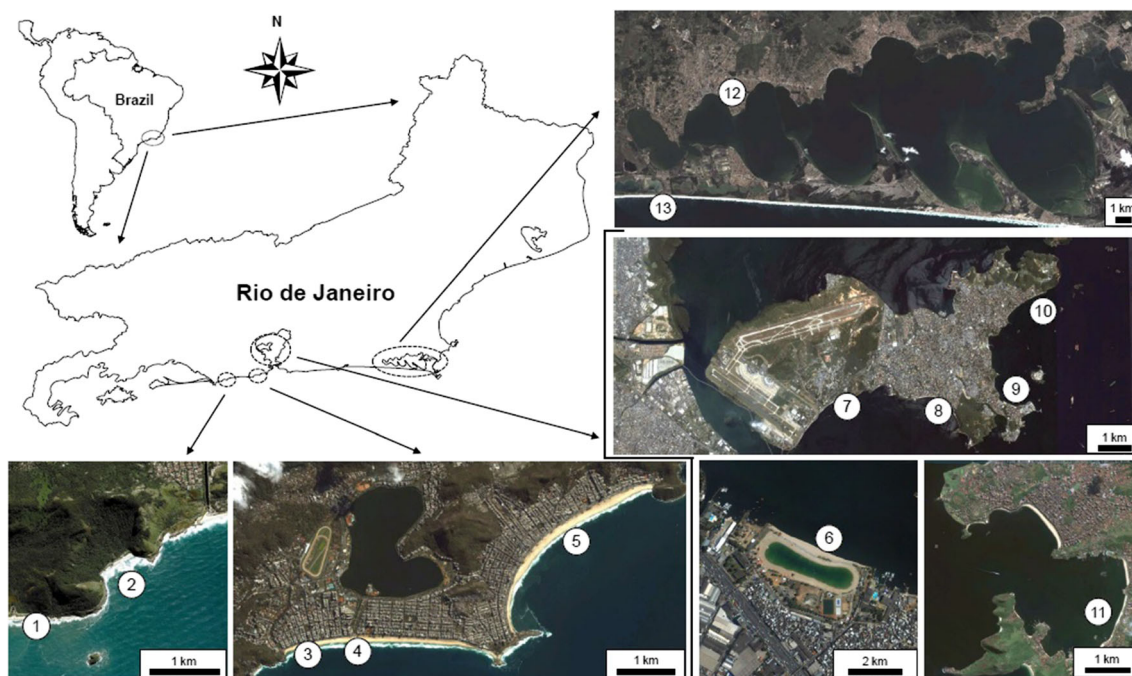


Fig. 1 Geographic coordinates of collection sites: (1) Prainha beach (sea) (2) Prainha beach (stream water), (3) Leblon beach, (4) Leblon channel, (5) Copacabana beach, (6) Ramos pool, (7) São Bento beach, (8) Bica

beach, (9) Engenho beach, (10) Guanabara beach, (11) São Francisco beach, (12) Seca beach, (13) Pontinha beach

Purification kit (Qiagen GmgH, Hildeithalln, Germany), according to the manufacturer's instructions to remove possible PCR inhibitors (Clementino et al. 2007). Purified DNA from the water samples was quantified with a Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, USA), according to the manufacturer's instructions in order to standardize the DNA concentration for further PCR reactions.

Conventional PCR

PCR analysis was carried out in 50- μ L amplification reaction mixtures containing $\times 1$ PCR buffer (Invitrogen Co. Carlsbad, CA, USA), 5 % dimethyl sulfoxide (*w/v*), 200- μ M dNTPs, 2 U of Platinum *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen Co. Carlsbad, CA, USA), 0.5 μ M of primer Mnif 342F (5'-AACAGAAAACCCAGTGAAGA-3') and Mnif 363R (5'-GACGTAAAGGCACTGAAAAACC-3') (Ufnar et al. 2006), 2.5 mM of $MgCl_2$, and 20 ng of DNA template. The cycling conditions consisted of an initial 95 $^{\circ}C$ step for 5 min and 35 cycles of amplification at 92 $^{\circ}C$ for 1 min, 58 $^{\circ}C$ of annealing temperature for 30 s, 72 $^{\circ}C$ for 1 min, and a final elongation at 72 $^{\circ}C$ for 6 min. PCR products were loaded onto a 1.5 % (*v/v*) agarose gel, and were separated by electrophoresis at 70 V for 2 h in $\times 1$ TAE (40 mmol L⁻¹ Tris base, 20 mmol L⁻¹ sodium acetate, 1 mmol L⁻¹ EDTA, pH 8.0) buffer with a 100 bp DNA ladder (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA) as a molecular weight standard. The gels were stained with ethidium bromide, and images were digitalized

with the Video Documentation System and analyzed with Image-Master software (Amersham Pharmacia Biotech). In a previous study, we established the host specificity and sensitivity of human-associated marker that were evaluated by screening 49 fecal samples from six host groups. The *nifH* gene was detected in all (12/12) human fecal DNA samples tested, but not in non-target host groups (0/37) (Bianco et al. 2015). The reproducibility of host-specific archaeal marker amplification was checked by triplicate PCR assays. In addition, genomic DNA (gDNA) from the reference strain *M. smithii* INCQS A45D/DSM 11975 was included as positive control.

Real-time PCR conditions

The detection and quantification *nifH* gene of *M. smithii* was done through a TaqMan-based qPCR assay, using primers Mnif202F (5'-GAAAGCGGAGGTCCTGAA-3'), Mnif353R (5'-CTGAAAAACCTCCGCAAAC-3'), and a hybridization Mnif probe ([FAM]CCGGACGTGGTGTAACAGTAG[BHQ-1]) targeting a 151 bp segment, designed and validated by Johnston et al. (2010). The reactions were processed in optical 96-well reaction plates (Applied Biosystems, Foster City CA, USA), the thermal cycling, and fluorescence detection were carried out in the Applied Biosystems 7500 fast Real-Time PCR System. The optimized reaction was performed in a total volume of 25 μ L containing $\times 1$ TaqMan® Universal Master Mix

II with UNG (Life Technologies), 800 nmol L⁻¹ of each primer and 240 nmol L⁻¹ of probe (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA). The final cycling conditions were an initial denaturation for 10 min at 95 °C, 45 cycles of denaturation for 10 s at 95 °C, and annealing/extension for 30 s at 57 °C. gDNA of *M. smithii* (INCQS A45D/DSM 11975) was used as positive controls; PCR-grade water was evaluated as no-template control.

Standard curve and qPCR inhibition assays

For construction of the standard curve, the stock concentration of *M. smithii* gDNA was determined with a Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen Co. Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions; plasmids containing amplified sequences *nifH* gene of *M. smithii* strain were constructed with the pGEM-T Easy Vector Systems (Promega), according to the manufacturer's instructions. Briefly, the fragments of *nifH* gene, 151 bp were amplified by conventional PCR with the primers already described above. The fragments were cloned into pGEM-T Easy Vector. DH5a *E. coli* were transformed with these constructions, and after expansion in culture, the plasmids were purified by the Minipreps DNA Purification System (Promega). The stock concentration was determined with a Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen Co. Carlsbad, CA, USA), according to the manufacturer's instructions, and the number of copies was calculated from the molecular weight of the plasmid and insert known, as follows:

$$\text{DNA (copy)} = \frac{6.02 \times 10^{23} (\text{copy/mol}) \times \text{DNA amount (g)}}{\text{DNA length (dp)} \times 660 (\text{g/mol/dp})}$$

The CT values were plotted against the logarithm of their initial template copy numbers. Each standard curve was generated by a linear regression of the plotted points. From the slope of each standard curve, PCR amplification efficiency (E) was calculated according to the equation (Rasmussen 2001): $E = 10^{-1/\text{slope}-1}$. These plasmids were used as external standards and 11-point tenfold serial dilution was run in triplicate to a final concentration, ranging from 4.5×10^5 to 4.5×10^{15} copies L⁻¹. Besides, the standard curve also served as positive controls for all the samples analyzed; for negative control, a strain of *Klebsiella pneumoniae* was used INCQS 629 (ATCC BAA-1706). The commercially available TaqMan® Exogenous Internal Positive Control Reagent was added to verify the presence of inhibitors in reactions according to the manufacturer's instructions. The internal positive control DNA is measured with VIC-labeled probe, allowing it to be discriminated from the gDNA *M. smithii* detected with the FAM-labeled probe. Data acquisition and analysis were done using sequence

detection system software (version Software v2.0, Applied Biosystems).

Results

Physicochemical parameters

The physicochemical parameters showed variations among the different samples. The pH of the 13 seawater samples analyzed ranged between 5.1–8.8; turbidity showed high values in Ramos pool and São Francisco beach that may be related to the very low depth (Ramos pool) and dispersion of particulate matter as a result of sea currents, or churning of the sea during the tidal cycle (São Francisco beach). Dissolved oxygen levels were highest in Leblon channel and Ramos pool, probably due to aeration, which is essential for organic matter biodegradation. The temperature of the sampled sites remained between 20 and 27 °C favoring the presence of mesophilic forms. Salinity was maintained between 2.0 and 4.0 ‰. Low salinity values may be related to the discharge of sewage. Conductivity was highest in Seca beach and lowest in Engenhoca beach. Conductivity values are directly proportional to the amount of ionized substances dissolved in the water column (Table 1).

Enumeration of *E. coli*

According to the auditing standards (CONAMA, 357/2005), Prainha seawater and Prainha stream water, Ramos pool, San Francisco Beach, Seca beach, and Pontinha beach were considered suitable according to water quality guidelines (<2500 MPN/100 mL), presenting 1119.9, 1299.7, 1119.9, 791.5, 99.2, and 211.4 MPN/100 mL, respectively. The other seven beach water samples were classified as inappropriate for recreational activities, with *E. coli* levels above the acceptable limits (Table 2).

M. smithii Detection by conventional PCR

The *nifH* gene was detected in 11 out of the 13 samples analyzed showing a fragment of approximately 222 bp compatible with *M. smithii* positive control. The samples from Ramos pool and São Bento beach did not produce amplification for the expected fragment (Table 2).

Detection and quantification of *nifH* gene *M. smithii* by qPCR

The amplification of *nifH* gene showed a fragment of 151 bp as expected. The slope of the standard curves varied between -3.32 and -3.37 for all real-time PCR

Table 1 Physical-chemical parameters of the sampling sites

Sampling site	pH	Conductivity (ms/cm)	Turbidity (UNT)	D. O (mg/l)	Temperature (°C)	Salinity (‰)
Prainha beach (sea)	5.13	51.7	270	7.10	25.0	3.4
Prainha beach (stream water)	5.40	48.7	233	8.76	22.6	2.0
Leblon beach	7.00	49.3	122	8.51	24.1	3.8
Leblon (channel)	8.80	50.7	231	13.57	21.0	3.2
Copacabana beach	7.90	47.5	110	5.30	24.0	3.8
Ramos pool	6.40	23.6	645	10.30	22.0	3.3
São Bento beach	7.80	40.0	180	9.80	27.0	3.6
Bica beach	6.50	37.4	236	5.08	20.0	2.3
Engenhoca beach	6.28	14.6	277	9.08	21.0	3.5
Guanabara beach	7.90	25.0	238	8.55	23.0	3.0
São Francisco beach	8.30	64.8	465	6.08	23.0	4.0
Seca beach	8.27	71.4	380	6.42	25.0	4.0
Pontinha beach	5.40	25.0	213	7.80	26.6	3.3

assays performed, and the correlation coefficient was always higher than 0.99 while the efficiency ranged from 98 to 107 %. The efficiency of the IPC curve reactions was similar to that obtained with standard curve of *M. smithii*. As expected, the IPC indicated a wide range of inhibition in the majority seawater samples; thus, the DNA samples were diluted and reanalyzed by a correction factor to calculate the real target number. The *nifH* gene was detected and quantified in 12 seawater samples, ranging from 5.7×10^9 to 9.5×10^{11} copies L^{-1} , on Leblon beach and Prainha (stream water) beach, respectively. São Bento beach sample showed no amplification in qPCR reactions (Table 2).

Discussion

Fecal pollution of recreational waters remain a significant public health issue, especially in developing countries, but with particular attention to human fecal sources due the host specificity of the pathogens.

In this study, 46 % of the marine water samples presenting *E. coli* counts in compliance with the Brazilian federal water quality guidelines showed the presence of *nifH* gene copies between 10^9 and $10^{11} L^{-1}$. qPCR yielded higher human fecal pollution marker values than either culture method, likely reflecting that qPCR measures the presence of genetic

Table 2 The traditional indicators, PCR and the qPCR results on water samples

Sampling site	<i>E. coli</i> (NMP/100 mL)	Recreational activity	Conventional PCR ^a	qPCR (Copies L^{-1}) ^a
Bica beach	>2419.6	Improper	D	6.1×10^9
Copacabana beach	>2419.6	Improper	ND	7.5×10^9
Engenhoca beach	>2419.6	Improper	D	2.0×10^{10}
Guanabara beach	>2419.6	Improper	D	1.5×10^{11}
Leblon channel	>2419.6	Improper	D	1.2×10^{11}
Leblon beach	>2419.6	Improper	D	5.7×10^9
Pontinha beach	211.4	Proper	D	1.8×10^{10}
Prainha beach (sea)	1119.9	Proper	D	6.8×10^9
Prainha beach (stream water)	1299.7	Proper	D	9.5×10^{11}
Ramos pool	1119.9	Proper	ND	2.2×10^{10}
São Bento beach	>2419.6	Improper	D	ND
São Francisco beach	791.5	Proper	D	7.0×10^{10}
Seca beach	99.2	Proper	D	1.6×10^{10}

^a D detected, ND not detected

material while the culture methods measure viable cells. However, Haugland et al. (2005) found significant correlations between the enumeration methods when fecal contamination is recent and in high concentrations, probably because there is reduced time for decoupling of cellular metabolism and DNA presence. In addition, DNA is not as sensitive to sunlight as culturable cells, and does not degrade as quickly after UV exposure (Walters et al. 2009).

A study in northwest France showed a significant correlation between *E. coli* counts and the presence of human markers, whereas no correlation was observed for other animal markers (Gourmelon et al. 2007). This result is not surprising, since many alternative indicators and human pathogens have shown low correlations with traditional indicator bacteria, usually attributed to fecal differential inputs, persistence, and survival of *E. coli*, among others (Savichtcheva and Okabe 2006; Cole et al. 2003; Shanks et al. 2006; Boehm et al. 2009). The traditional microorganisms used for many years as water quality indicators are not limited only to humans, but are also present in the intestines of other warm-blooded animals (Harwood et al. 2014). This way, although the correlation between fecal indicators is not clear, fecal indicators are significant predictor of potential risk, despite that their concentrations rarely correlate perfectly with other pathogens.

Our results showed that *nifH* marker was detected in the marine water samples analyzed by both endpoint PCR and qPCR, respectively. However, it could not be detected in São Bento beach by qPCR but was positive for conventional PCR, while the opposite was observed in Ramos pool. On the other hand, *nifH* gene was revealed in all environmental water samples (16/16) with known or spiked sewage inputs (Johnston et al. 2010), but the same was not observed in Southeast Queensland, Australia, where it was not detected in 181 (96 %) of 188 fecal and wastewater samples (Ahmed et al. 2012). These discrepancies may be attributed to the variability in nucleic acid extraction and sample inhibition and the sensitivity among PCR endpoint and qPCR methods.

Regarding physical/chemical parameters, our data revealed higher temperatures in some samples relating to the shallow depth and the degree of turbulence of the water where these samples were collected. A reduction in salinity and conductivity levels was also observed probably due to an increase of rainfall, evaporation and, particularly, to the release of organic matter due to the mixing of fresh water and salt water (Schmiegelow 2004). High acidification levels in both collection points of Prainha beach could be related to the discharge of organic matter. It is a recognized fact that in the presence of sufficient nutrient levels, *E. coli* grows in seawater almost as well as it does in rich culture media. In fact, it has been shown that in nutrient-enriched seawater, *E. coli* competed successfully with other marine bacterial strains (Jannasch 1968). In addition, an acidic pH (5.1–5.4) was found to be most

favorable for *E. coli* survival (in the 5.0–9.0 range) in seawater and pH around 8, contributes to the deleterious effects on *E. coli* survival (Rozen and Belkin 2001). However, this has not been observed in this study, where the samples with higher *E. coli* counts presented higher pH levels (7.0–8.8). The evaluation of physical and chemical conditions of marine waters allows us to profile current environmental conditions, revealing potential environmental problems (Lebaron et al. 2015).

Our results demonstrated that 46 % of the marine beach presenting *E. coli* levels in compliance with water quality guidelines (<2500 MPN/100 mL) showed *nifH* gene between 5.7×10^9 and 9.5×10^{11} copies L⁻¹ revealing poor correlation between the approaches adopted. A recent work pooling data from 36 sites across the USA has suggested that an empirical relationship can be developed between qPCR and culture-based measurements (Whitman et al. 2010). These data suggest this correlation may be influenced by environmental factors like pollution, abiotic factors, climatic alterations, and bioindicator behavior, under these different conditions.

The application of multiple markers to detect any potential source is essential, as each way has its particular strengths and weaknesses, with regard to other issues that can limit the usefulness of MST. For example, the most thoroughly vetted marker, *Bacteroides* HF183, is not completely specific for human waste, although it was found to be the most effective marker human fecal contamination in the California-based study (Layton et al. 2013).

However, it has the advantages of being broadly distributed among human populations, and to be present at a relatively high concentration in sewage. Other human-associated microorganisms, such as HPyVs and pathogenic viruses, are less concentrated in sewage and are therefore difficult to detect in dilute samples even at levels where pathogens may be present. However, their specificity engenders great confidence in the finding of human sewage pollution, when detected (Harwood et al. 2014).

Tropical environment, such as Brazil, research in this area is still scarce and to our knowledge, this is the first qPCR assay using *M. smithii* as a biomarker in marine waters. Although *M. smithii* is found only in 30 % of the population, its concentration in human feces can vary between 10^7 and 10^{10} cell per gram (dry weight) and it is highly prevalent in mixed sewage (Ufnar et al. 2006). Thus, it is possible to conclude that for each 4 L of seawater analyzed in this study, we observed 1 g of *M. smithii*.

Furthermore, our data reinforces that application of the *nifH* marker could be an alternative indicator of environmental degradation of marine beaches that have nonpoint sources of human fecal pollution once traditional fecal indicators were not associated with health risks. Although microbial source tracking tools are widely accepted as alternative methods to evaluate sources of pollution, threshold values have not yet been entirely determined to assess the microbial quality of

waterbodies (Scott et al. 2002). Therefore, the occurrence of fecal pathogens and markers can increase your likelihood of predicting their occurrence in aquatic systems and serves as the basis for source water protection and the control of pathogenic organisms in the environment. Thus, the knowledge of the source of fecal pollution is essential to assess possible health risks, as well as determine preventive or remedial measures to resolve the issue.

In the light of the importance of the subject area for health, we conclude that the adoption of *nifH* gene detection as a marker needs the development of new standards and should focus on extensive field tests of real-time approaches at different beaches. This should increase confidence in management guidelines based on risk of fecal pollution and contribute to the implementation of better monitoring and remediation programs, in order to improve the quality of human health and ecosystems.

Acknowledgments We gratefully acknowledge the Genome Sequencing Core-PDTIS/FIOCRUZ. This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), and INCQS/FIOCRUZ.

References

- Ahmed W, Sidhu JPS, Toze S (2012) Evaluation of the *nifH* gene marker of *Methanobrevibacter smithii* for the detection of sewage pollution in environmental waters in Southeast Queensland, Australia. *Environmental science & technology* 46(1):543–550
- American Public Health Association–APHA; American Water Works Association–AWWA; Water Environment Federation–WEF (2012). Standard methods for the examination of water and wastewater. 22th ed. Washington DC.
- Ballesté E, Bonjoch X, Belanche LA, Blanch AR (2010) Molecular indicators used in the development of predictive models for microbial source tracking. *Appl Environ Microbiol* 76(6):1789–1795
- Bernhard AE, Goyard T, Simonich MT, Field KG (2003) Application of a rapid method for identifying fecal pollution sources in a multi-use estuary. *Water Res* 37:909–913
- Bianco K, Barreto C, Oliveira SS, Pinto LH, Albano RM, Miranda CC, Clementino MM (2015) Fecal pollution source tracking in waters intended for human supply based on archaeal and bacterial genetic markers. *J Water Health* 13(4):985–995
- Boehm AB, Ashbolt NJ, Colford JM, Dunbar LE, Fleming LE, Gold MA, Hansel JA, Hunter PR et al (2009) A sea change ahead for recreational water quality criteria. *J Water Health* 7:9–20
- Clementino MM, Fernandes CC, Vieira RP, Cardoso AM, Polycarpo CR, Martins OB (2007) Archaeal diversity in naturally occurring and impacted environments from a tropical region. *J Appl Microbiol* 103(1):141–151
- Cole D, Long SC, Sobsey MD (2003) Evaluation of F ϕ RNA and DNA coliphages as source-specific indicators of fecal contamination in surface waters. *Appl Environ Microbiol* 69(11):6507–6514
- Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE et al (2005) Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 308:1635–1638
- Fewtrell L, Kay D (2015) Recreational water and infection: a review of recent findings. *Current Environmental Health Reports* 2(1):85–94
- Field KG, Samadpour M (2007) Fecal source tracking, the indicator paradigm, and managing water quality. *Water Res* 41(16):3517–3538
- Foley SL, Lynne AM, Nayak R (2009) Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gram-negative bacterial foodborne pathogens. *Infect Genet Evol* 9(4):430–440
- Fong TT, Griffin DW, Lipp EK (2005) Molecular assays for targeting human and bovine enteric viruses in coastal waters and their application for library-independent source tracking. *Appl Environ Microbiol* 71(4):2070–2078
- Goumelson M, Caprais MP, Ségura R, Le Menec C, Lozach S, Piriou JY, Rincé A (2007) Evaluation of two library-independent microbial source tracking methods to identify sources of fecal contamination in French estuaries. *Appl Environ Microbiol* 73(15):4857–4866
- Harwood VJ, Staley C, Badgley BD, Borges K, Korajkic A (2014) Microbial source tracking markers for detection of fecal contamination in environmental waters: relationships between pathogens and human health outcomes. *FEMS Microbiol Rev* 38(1):1–40
- Haugland RA, Siefing SC, Wymer LJ, Brenner KP, Dufour AP (2005) Comparison of Enterococcus measurements in freshwater at two recreational beaches by quantitative polymerase chain reaction and membrane filter culture analysis. *Water Res* 39:559–568
- Jannasch HW (1968) Competitive elimination of Enterobacteriaceae from seawater. *Appl Microbiol* 16:1616–1618
- Johnston C, Ufnar JA, Griffith JF, Gooch JA, Stewart JR (2010) A real-time qPCR assay for the detection of the *nifH* gene of *Methanobrevibacter smithii*, a potential indicator of sewage pollution. *J Appl Microbiol* 109(6):1946–1956
- Lai MC, Lin CC, Yu PH, Huang YF, Chen SC (2004) *Methanocaldococcus chunghsingensis* sp. Nov., isolated from an estuary and a marine fishpond in Taiwan. *Int J Syst Evol Microbiol* 54:183–118
- Layton BA, Cao Y, Ebentier DL, Hanley K, Ballesté E, Brandão J, Byappanahalli M, Converse R, Farnleitner AH, Gentry-Shields J, Gidley ML, Goumelson M, Lee CS, Lee J, Lozach S, Madi T, Meijer WG, Noble R, Peed L, Reischer GH, Rodrigues R, Rose JB, Schriever A, Sinigalliano C, Srinivasan S, Stewart J, Werfhorst LC, Wang D, Whitman R, Wuertz S, Jay J, Holden PA, Boehm AB, Shanks O, Griffith JF (2013) Performance of human fecal anaerobe-associated PCR-based assays in a multi-laboratory method evaluation study. *Water Res* 47(Issue 18):6897–6908
- Lebaron P, Coumoyer B, Lemarchand K, Nazaret S, Servais P (2015) Environmental and human pathogenic microorganisms. In: *Environmental microbiology: fundamentals and applications*. Springer, Netherlands, pp. 619–658
- McQuaig SM, Scott TM, Lukasik JO, Paul JH, Harwood VJ (2009) Quantification of human polyomaviruses JC virus and BK virus by TaqMan quantitative PCR and comparison to other water quality indicators in water and fecal samples. *Appl Environ Microbiol* 75:3379–3388
- Ogram A, Saylor GS, Barkay T (1987) The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *J Microbiol Methods* 7:57–66
- Oliveira BSSD, Cunha ACD (2014) Correlation between water quality and precipitation variability in the southern state of Amapá. *Rev Ambient Água* 9(2):261–275
- Rasmussen R (2001) In: Meuer S, Wittwer C, Nakagawara K (eds) *Quantification on the LightCycler*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 21–34
- Rozen Y, Belkin S (2001) Survival of enteric bacteria in seawater. *FEMS Microbiol Rev* 25(5):513–529
- Santo Domingo JW, Bambic DG, Edge TA, Wuertz S (2007) Quo vadis source tracking? Towards a strategic framework for environmental monitoring of fecal pollution. *Water Res* 41:3539–3552
- Savichtcheva O, Okabe S (2006) Alternative indicators of fecal pollution: relations with pathogens and conventional indicators, current

- methodologies for direct pathogen monitoring and future application perspectives. *Water Res* 40:2463–2476
- Schmiegelow, J. M. M. (2004). *The Blue Planet: An Introduction Marine Science*. Brazil.
- Scott TM, Rose JB, Jenkins TM, Farrah SR, Luhasik J (2002) Microbial source tracking: current methodology and future directions. *Appl Environ Microbiol* 68:5796–5803
- Scott TM, Jenkins TM, Lukasik J, Rose JB (2005) Potential use of a host associated molecular marker in *Enterococcus faecium* as an index of human fecal pollution. *Environ Sci Technol* 1(39):283–287
- Shanks OC, Nietch C, Simonich M, Younger M, Reynolds D, Field KG (2006) Basin-wide analysis of the dynamics of fecal contamination and fecal source identification in fecal pollution source tracking in waters intended for human supply journal of water and health in Tillamook Bay, Oregon. *Appl Environ Microbiol* 72(8):5537–5546
- Smalla K, Cresswell N, Mendonca-Hagler LC, Wolters A, van Elsas JD (1993) Rapid DNA extraction protocol from soil for polymerase chain reaction-mediated amplification. *J Appl Bacteriol* 74:78–85
- Stewart-Pullaro J, Daugomah JW, Chestnut DE, Graves DA, Sobsey MD, Scott GI (2006) F+ RNA coliphage typing for microbial source tracking in surface waters. *J Appl Microbiol* 101(5):1015–1026
- Stoeckel DM, Harwood VJ (2007) Performance, design, and analysis in microbial source tracking studies. *Appl Environ Microbiol* 73(8):2405–2415
- Ufnar JA, Wang SY, Christiansen JM, Yampara-Iquise H, Carson CA, Ellender RD (2006) Detection of the *nifH* gene of *Methanobrevibacter smithii*: a potential tool to identify sewage pollution in recreational waters. *J Appl Microbiol* 101(1):44–52
- Walters SP, Yamahara KM, Boehm AB (2009) Persistence of nucleic acid markers of health-relevant organisms in seawater microcosms. *Water Res* 43:4929–4939
- Whitman RL, Ge Z, Nevers MB, Boehm AB, Chern EC, Haugland RA, White EM (2010) Relationship and variation of qPCR and culturable enterococci estimates in ambient surface waters are predictable. *Environ Sci Technol* 44:5049–5054
- Wimalawansa SA, Wimalawansa SJ (2014) Impact of changing agricultural practices on human health: chronic kidney disease of multifactorial origin in Sri Lanka. *Wudpecker J Agric Res* 3(5):110–124

Detection of antimicrobial resistance genes in beta-lactamase- and carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* by patient surveillance cultures at an intensive care unit in Rio de Janeiro, Brazil

Detecção de genes de resistência a antimicrobianos em Klebsiella pneumoniae produtoras de betalactamases e carbapenemases por culturas de vigilância de pacientes em uma unidade de terapia intensiva no Rio de Janeiro, Brasil

Claudia Flores¹; Célia Maria C. P. A. Romão¹; Kayo Bianco¹; Catia Chaia de Miranda¹; Angela Breves¹; Ana Paula S. Souza²; Rosana Maria R. Santos²; Bianca O. Fonseca²; Ivano de Filippis¹; Maysa M. Clementino¹

1. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde-Fundação Oswaldo Cruz (INCQS-Fiocruz), Rio de Janeiro, Brazil. 2. Hospital Federal da Lagoa, Rio de Janeiro, Brazil.

ABSTRACT

Introduction: The increasing incidence of multi-resistant microorganisms has been considered a public health problem. One of the routines included in hospital practice is the screening of colonized and/or infected patients. **Objective:** The aim of this study was to evaluate the genetic variability and clonal relationships of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *K. pneumoniae*, from surveillance cultures, at an intensive care unit, in Rio de Janeiro, Brazil. **Material and methods:** Seventy *K. pneumoniae* isolates were obtained from rectal swabs (March 2013 to March 2014). Antimicrobial susceptibility was assessed by VITEK 2 System. Resistant genes *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} and *bla*_{NDM} were investigated by polymerase chain reaction (PCR); genetic diversity, by Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR (ERIC-PCR). **Results:** Strains showed high resistance rates to ceftipime (94%), ceftazidime (96%), ertapenem (61%), imipenem (54%) meropenem (43%) and ciprofloxacin (69%). The most prevalent genes were *bla*_{SHV} (69%), *bla*_{TEM} (63%), *bla*_{OXA-1} (60%), *bla*_{KPC} (57%), *bla*_{CTX-M-15} (47%), *bla*_{OXA-48} (16%). Genes *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} and *bla*_{NDM} were not detected. Twenty nine profiles of resistance genes were observed, with 23% carrying at least five genes. A great genetic diversity (68 ERIC profiles) was also observed among the strains. **Conclusion:** Although no clonal relationship was observed within the isolates, this study revealed alarming data on the antimicrobial resistance deficiently monitored for preventive purposes in Brazil. Our data allow us to conclude that the inclusion of surveillance cultures in health facilities is a recommended strategy aiming particularly at preventing the spread of resistance genes in the hospital environment and, consequently, reducing morbidity and mortality.

Key words: infection control; epidemiological surveillance; *Klebsiella pneumoniae*; beta-lactamases; molecular typing.

INTRODUCTION

Healthcare-associated infections (HAIs) are a serious problem of public health and exert great impact on morbidity, mortality, length of hospital stay, and costs of diagnostic and therapeutic procedures. There are also effects on patients, their families and the community in general, such as the withdrawal from social life and work, with the resulting social, psychological and economical burden^(1,2).

The increased incidence of multidrug-resistant microorganisms is considered one of the main factors influencing the treatment of these infections. At intensive care units (ICU), high indices of bacterial resistance are observed, especially due to excessive use of antibiotic agents. Understanding the resistance profile of hospital microbiota against antibiotics is fundamental for prevention and control of nosocomial infections⁽³⁾.

Bacteria can develop resistance to antibacterial drugs by means of some mechanisms already well disclosed in the literature,

such as alteration in the target site (penicillin-binding proteins [PBPs]), efflux pump, decreased expression of porins (outer-membrane proteins [OMPs]) and beta-lactamase production⁽⁴⁾. The production of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) is the main resistance mechanism among bacteria of the *Klebsiella* genus. They are able to hydrolyze broad-spectrum beta-lactams, such as third- and fourth-generation cephalosporins, monobactams, but not cephamycins and carbapenems, such as, for example, temoneira enzyme 3 (TEM-3) and sulphhydryl variable 2 (SHV-2). TEM-2 and SHV-1 are not ESBLs, because they hydrolyze just penicillins and first- and second-generation cephalosporins^(5,6).

The prevalence of ESBL in *Klebsiella pneumoniae* is increasing worldwide⁽⁷⁻⁹⁾. Global data show that the frequency of ESBL-producing *K. pneumoniae* was 44% in South America, 33% in Europe, 22% in Asia and 12% in the United States⁽¹⁰⁾. Nowadays, the major concerns, however, are the *K. pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing strains, once these enzymes are responsible for resistance to all available beta-lactam antibiotics⁽¹¹⁾.

The frequencies of the genes responsible for the production of ESBL and carbapenemases vary among themselves and among the bacterial species. These variations make each region have its own characteristics⁽¹²⁾. Resistance is acquired by vertical/horizontal transfer of genes such as *bla*_{CTX-M}, *bla*_{KPC} and *bla*_{NDM}, frequently associated with plasmids^(13,14).

One of the routines included in hospital practice is the screening of patients from several inpatient units (ICU, wards) for colonization and/or infection, by collecting materials such as nasal, oral and rectal swabs at admission and during treatment. This measure is called surveillance culture, and it is aimed at avoiding dissemination of these agents⁽¹⁵⁻¹⁷⁾. The screening specimens of primary surveillance that have been recommended by the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) and by the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) are stools or the rectal swab⁽¹⁸⁾.

OBJECTIVES

The objective of the present study was to investigate antimicrobial susceptibility profiles and to research the frequencies of genes responsible for ESBL and carbapenemases-producing *K. pneumoniae* based on active surveillance cultures at an ICU, besides assessing the genetic diversity of these isolates

to verify the presence of cross contamination among patients and possible epidemiological implications.

MATERIAL AND METHODS

Study site and population

Samples of rectal material were collected with sterile swabs from 1,474 adult and pediatric inpatients of the ICU of a federal hospital in Rio de Janeiro, from March 2013 to March 2014 for surveillance cultures.

The study was approved by the Research Ethics Committee of Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) (346.653).

Sample processing

The swabs were streaked on CHROMagar ESBL (Paris, France); the plates, incubated at 36°C ± 1°C for 24/48 hours. Bacterial isolates that presented metallic blue or pink colonies, suggestive of ESBL-producing enterobacteria, were selected and streaked on MacConkey agar.

Phenotypic identification/antimicrobial susceptibility profile (antibiogram)

Identification and antimicrobial susceptibility testing (AST) were performed by the VITEK[®] 2 system (BioMérieux). The GN Test Kit cards were used for identification, and AST-239 and AST-105 cards, for antibiogram, according to the manufacturer's instructions.

Molecular identification to confirm the *K. pneumoniae* species

The genomic deoxyribonucleic acid (DNA) was extracted using the DNeasy Blood & Tissue Handbook (QIAGEN[®]), according to instructions by the manufacturer. The identity of *K. pneumoniae* isolates was confirmed by means of amplification of 16S-23S intergenic region of the ribosomal ribonucleic acid (rRNA) genes⁽¹⁹⁾. Amplification conditions were: an initial denaturation cycle at 95°C for 5 minutes, followed by 30 cycles of 95°C for 1 minute, annealing temperature of 56°C and 72°C for 2 minutes, and a final extension cycle at 72° for 10 minutes. The fragments were analyzed by gel electrophoresis of 1.5% agarose in buffer Tris borate ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)-0.5× for 1 hour, at 60 V with ethidium bromide (3 mg/ml). The gel was analyzed using the ImageQuant 300 Imager (GE).

Detection of resistance genes

The following resistance genes were investigated: *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M15}, *bla*_{OXA-1} and *bla*_{NDM}, frequently detected in enterobacteria, and also genes *bla*_{VIM} and *bla*_{IMP}, which despite being rarely found in enterobacteria, are reported to occur in *K. pneumoniae*^(20, 21).

The mixture for the polymerase chain reaction (PCR) had its final volume of 25 µl, containing 1× PCR Master Mix (Promega); 15 pmol of each starter; around 20 ng of template DNA and Gibco® water. The cycle conditions consisted of an initial step at 95°C for 5 minutes and 35 amplification cycles at 95°C for 1 minute, adequate annealing temperature (Table 1) during 1 minute, and 72°C for 1 minute and a final elongation at 72°C for 6 minutes. Amplification was carried out in an Eppendorf Mastercycler EP thermal cycler. PCR products were visualized on a 2% agarose gel (Sigma-Aldrich), in 1× Tris-acetate-EDTA buffer, stained with 0.3 ng/ml ethidium bromide. The molecular weight standard 100 bp DNA Ladder (Invitrogen) was used. Analysis was performed with the ImageQuant 300 (GE). *K. pneumoniae* INCQS 00628 (ATCC BAA 1705) (*bla*_{KPC} positive), INCQS 00629 (ATCC BAA 1706) (*bla*_{KPC} negative), INCQS 00532 (ATCC 700603) (ESBL positive), INCQS P4475 (*bla*_{NDM} positive), *E. coli* INCQS 00325 (ATCC 35218) (ESBL positive) and INCQS 00033 (ATCC 25922) (ESBL negative) were used as reference.

Sequencing and identity analysis

PCR products were purified using the QIAquick® PCR Purification Kit (QIAGEN), according to the manufacturer, and subjected to sequencing with the Big Dye Terminator Kit by capillary

electrophoresis in an ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) (Platform PDTIS/Fiocruz). Chromatograms were converted to FASTA format through software Sequencher 5.0 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI). Similarity between nucleotide sequences were determined using the Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/>), at GenBank (National Center for Biotechnology Information [NCBI]).

Clonal characterization of isolates

Enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR (ERIC-PCR) is a used for typing the isolates using (ERIC-PCR), using primer ERIC-2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAAGCG-3') and amplification conditions according to the previously described protocol⁽²⁸⁾. Amplification products were analyzed as described before; and the band patterns, with the BioNumerics software version 6.6 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). The dendrogram was built using the Dice index and the unweighted pair-group method using arithmetic averages (UP-GMA)⁽²⁹⁾.

RESULTS

Identification of isolates

Among the 1,474 samples of collected rectal material, 318 were selected that presented color suggestive of ESBL production on CHROMagar. Among these, 75 presented metallic blue color; and 48, pink color. The metallic blue isolates were phenotypically

TABLE 1 – Detection of beta-lactamase genes by PCR

Gene	Sequence (5'-3')	Annealing (°C)	Fragment (pb)	Reference
<i>bla</i> _{KPC-2}	TGTCAGTGTATCGCCGTC CTCAGTGCTCTACAGAAAACC	55	863	Yigit <i>et al.</i> (2001) ⁽²²⁾
<i>bla</i> _{OXA-48}	TGTTTTTGGTGGCATCGAT GTAAMRATGCTTGGTTCCG	58	177	Monteiro <i>et al.</i> (2012) ⁽²³⁾
<i>bla</i> _{SHV-1}	ATTGTGCGCTTCTTTACTCGC TTTATGCGGTTACCTTTGACC	55	1080	Jemina <i>et al.</i> (2008) ⁽²⁴⁾
<i>bla</i> _{CTX-M15}	GGTTAAAAATCACTGCGTC TTGGTGACGATTTTAGCCGC	54	863	Barguiga <i>et al.</i> (2011) ⁽²⁵⁾
<i>bla</i> _{TEM-1}	ATAAAATCTTGAAGACGAAA GACAGTTACCAATGCTTAATCA	55	1051	Barguiga <i>et al.</i> (2011) ⁽²⁵⁾
<i>bla</i> _{IMP}	GAAGCGCTTTATGTTTCATAC GTACGTTTCAAGAGTGATGC	58	587	Pitout <i>et al.</i> (2005) ⁽²⁶⁾
<i>bla</i> _{VIM}	GTTTGGTCGCATATCGCAAC AATGCGCAGCACCAGGATAG	58	389	Pitout <i>et al.</i> (2005) ⁽²⁶⁾
<i>bla</i> _{OXA-1}	CGCAAATGGCACCAGATTCAAC TCCTGCACCAGTTTCCCATACAG	60	464	Mulvey <i>et al.</i> (2011) ⁽²⁷⁾
<i>bla</i> _{NDM-1}	GGTGATGCCCGGTGAAATC ATGCTGCGCCTTGGGGAACG	58	660	Mulvey <i>et al.</i> (2011) ⁽²⁷⁾

PCR: polymerase chain reaction.

identified as *K. pneumoniae*, suggestive of ESBL production. The 48 pink isolates, suggestive of *Escherichia coli*, were not included in this work. Among the 75 isolates phenotypically identified as *K. pneumoniae*, 70 were confirmed as *K. pneumoniae* by PCR.

Antimicrobial susceptibility

The *K. pneumoniae* isolates presented high percentages of antimicrobial resistance. In relation to carbapenems, resistance was observed to ertapenem, 61% (43/70); to imipenem, 54% (38/70); and to meropenem, 43% (30/70) (**Figure 1**).

Detection of beta-lactamase genes

The genes *bla_{KPC-2}*, *bla_{OXA-1}* and *bla_{OXA-48}* were found in 56% (39/70), 60% (42/70) and 16% (11/70) of the studied isolates, respectively. The genes *bla_{TEM-1}*, *bla_{SHV-1}* and *bla_{CTX-M15}* were also detected. The genes *bla_{VIM-1}*, *bla_{IMP-1}* and *bla_{NDM-1}* were not found (**Figure 2**); two isolates did not present the investigated genes.

Seventeen percent (12/70) of the isolates presented just one investigated gene; 22% (15/70), two genes; 17% (12/70), three genes; 19% (13/70), four genes; 20% (14/70), five genes; and 3% (2/70), six investigated resistance genes. In relation to the studied genes, 29 resistance profiles were observed (**Table 2**).

Typing of *K. pneumoniae* strains

Sixty-eight isolates exhibiting at least one resistance gene were subjected to ERIC-PCR. Genetic polymorphism was verified among the isolates, with 68 genotypes. However, strains with percent identity above 90% (KP15 and KP29; KP12 and KP46; KP31 and KP28; KP27 and KP45) were found (**Figure 3**).

TABLE 2 – Resistance profile of *K. pneumoniae* isolates according to the detected genes

Resistance profile	Resistance genotype	n°. of isolates/(%)
I	No gene	2 (2.9%)
II	<i>bla_{SHV-1}</i>	3 (4.3%)
III	<i>bla_{OXA-1}</i>	2 (2.9%)
IV	<i>bla_{KPC-2}</i>	6 (8.6%)
V	<i>bla_{TEM-1}</i>	1 (1.4%)
VI	<i>bla_{KPC-2}</i> and <i>bla_{SHV-1}</i>	2 (2.9%)
VII	<i>bla_{TEM-1}</i> and <i>bla_{SHV-1}</i>	7 (10%)
VIII	<i>bla_{KPC-2}</i> and <i>bla_{OXA-1}</i>	1 (1.4%)
IX	<i>bla_{TEM-1}</i> and <i>bla_{OXA-48}</i>	3 (4.3%)
X	<i>bla_{TEM-1}</i> and <i>bla_{OXA-1}</i>	1 (1.4%)
XI	<i>bla_{CTX-M}</i> and <i>bla_{OXA-1}</i>	1 (1.4%)
XII	<i>bla_{KPC-2}</i> , <i>bla_{TEM-1}</i> and <i>bla_{SHV-1}</i>	2 (2.9%)
XIII	<i>bla_{KPC-2}</i> , <i>bla_{SHV-1}</i> and <i>bla_{OXA-1}</i>	1 (1.4%)
XIV	<i>bla_{KPC-2}</i> , <i>bla_{TEM-1}</i> and <i>bla_{CTX-M15}</i>	1 (1.4%)
XV	<i>bla_{KPC-2}</i> , <i>bla_{TEM-1}</i> and <i>bla_{OXA-1}</i>	1 (1.4%)
XVI	<i>bla_{TEM-1}</i> , <i>bla_{CTX-M15}</i> and <i>bla_{OXA-1}</i>	1 (1.4%)
XVII	<i>bla_{SHV-1}</i> , <i>bla_{CTX-M15}</i> and <i>bla_{OXA-48}</i>	1 (1.4%)
XVIII	<i>bla_{TEM-1}</i> , <i>bla_{SHV-1}</i> and <i>bla_{CTX-M15}</i>	1 (1.4%)
XIX	<i>bla_{TEM-1}</i> , <i>bla_{SHV-1}</i> and <i>bla_{OXA-1}</i>	2 (2.9%)
XX	<i>bla_{SHV-1}</i> , <i>bla_{CTX-M15}</i> and <i>bla_{OXA-1}</i>	2 (2.9%)
XXI	<i>bla_{KPC-2}</i> , <i>bla_{TEM-1}</i> , <i>bla_{SHV-1}</i> and <i>bla_{OXA-1}</i>	2 (2.9%)
XXII	<i>bla_{KPC-2}</i> , <i>bla_{SHV-1}</i> , <i>bla_{OXA-1}</i> and <i>bla_{OXA-48}</i>	2 (2.9%)
XXIII	<i>bla_{KPC-2}</i> , <i>bla_{SHV-1}</i> , <i>bla_{CTX-M15}</i> and <i>bla_{OXA-1}</i>	2 (2.9%)
XXIV	<i>bla_{KPC-2}</i> , <i>bla_{TEM-1}</i> , <i>bla_{CTX-M15}</i> and <i>bla_{OXA-1}</i>	3 (4.3%)
XXV	<i>bla_{SHV-1}</i> , <i>bla_{CTX-M15}</i> , <i>bla_{OXA-1}</i> and <i>bla_{OXA-48}</i>	2 (2.9%)
XXVI	<i>bla_{TEM-1}</i> , <i>bla_{SHV-1}</i> , <i>bla_{CTX-M15}</i> and <i>bla_{OXA-1}</i>	2 (2.9%)
XXVII	<i>bla_{KPC-2}</i> , <i>bla_{TEM-1}</i> , <i>bla_{SHV-1}</i> , <i>bla_{CTX-M15}</i> and <i>bla_{OXA-1}</i>	13 (18.6)
XXVIII	<i>bla_{TEM-1}</i> , <i>bla_{SHV-1}</i> , <i>bla_{CTX-M15}</i> , <i>bla_{OXA-1}</i> and <i>bla_{OXA-48}</i>	1 (1.4%)
XXIX	<i>bla_{KPC-2}</i> , <i>bla_{TEM-1}</i> , <i>bla_{SHV-1}</i> , <i>bla_{CTX-M15}</i> , <i>bla_{OXA-1}</i> and <i>bla_{OXA-48}</i>	2 (2.9%)

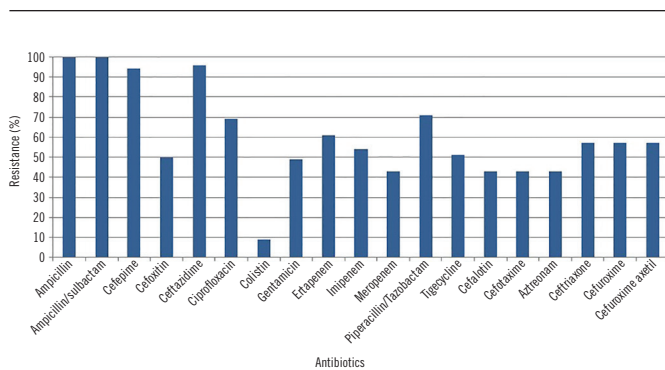


FIGURE 1 – Antimicrobial resistance in isolates of ESBL-producing *K. pneumoniae*. ESBL: extended-spectrum beta-lactamases.

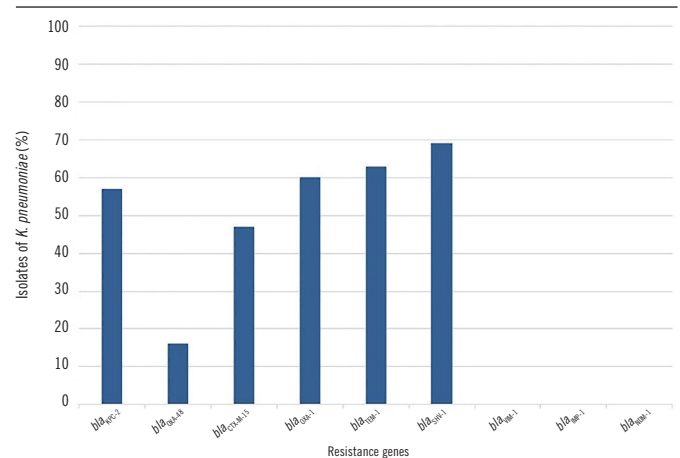


FIGURE 2 – Antibiotic resistance genes detected in ESBL-producing *K. pneumoniae*. ESBL: extended-spectrum beta-lactamases.

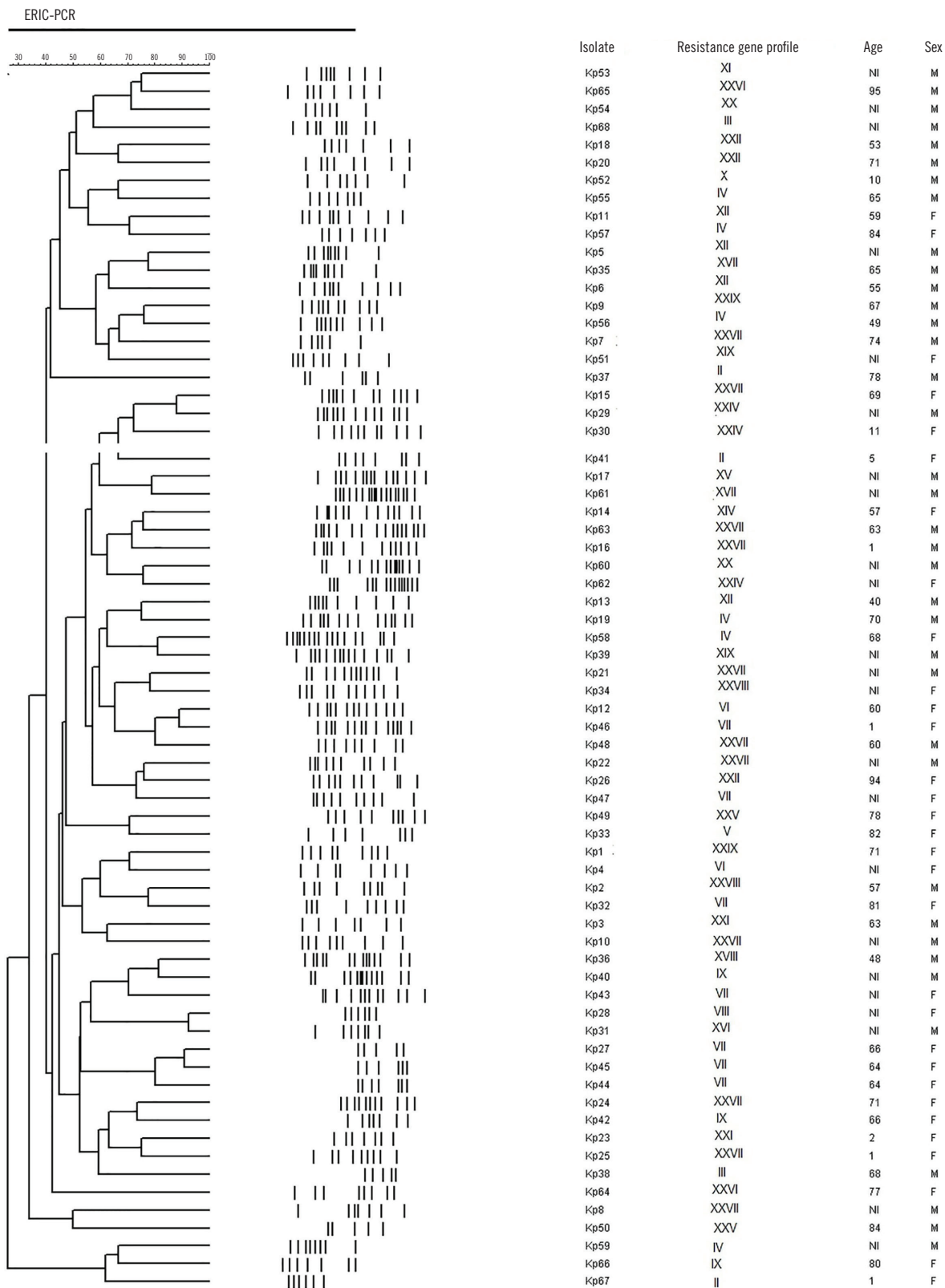


FIGURE 3 – Molecular typing of *K. pneumoniae* isolated by ERIC-PCR. The dendrogram was built with the *Bionumerics* software 6.6 (Applied Maths) based on the Dice similarity coefficient and by means of the UP-GMA⁽²⁷⁾

ERIC-PCR: Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-Polymerase Chain Reaction; UP-GMA: unweighted pair-group method with arithmetic averages; NI: not informed; F: female; M: male.

DISCUSSION

Monitoring ICU patients is very important because, despite comprising a small subgroup of hospitalized individuals (5%-10%), they present average risk for infection 5 to 10 times higher than inpatients of other sectors^(30, 31). In Brazil, the prevalence of isolated ESBL-producing *K. pneumoniae* is approximately 50%, with potential to cause severe morbidity and mortality⁽³¹⁾.

In the current study, the *K. pneumoniae* isolates presented high resistance percentages to third- and fourth-generation cephalosporins and to carbapenems. The same was verified in a study based on surveillance cultures from ICU inpatients (69 perianal specimens), in which 37% of the *K. pneumoniae* isolates presented resistance to carbapenems⁽³²⁾. Elevated indices of resistance were also observed, but in clinical isolates of the *Klebsiella-Enterobacter* group (58%), in Minas Gerais⁽³³⁾.

The production of beta-lactamase enzymes in enterobacteria has been detected in several parts of the world, as in Trinidad and Tobago, where clinical isolates of *K. pneumoniae* presented genes *bla*_{TEM} (84.3%), *bla*_{SHV} (34.5%) and *bla*_{CTX-M} (58.8%); and in Iran, with *bla*_{SHV} (87.5%), *bla*_{TEM} (12.4%) and *bla*_{CTX-M} (24.8%)^(34, 35). These genes were simultaneously found in *E. coli* (6%) and *K. pneumoniae* (28.5%) from clinical cultures in Iran⁽³⁶⁾. The dissemination of *bla*_{KPC} genes has been described in several European countries and in the Asian region of the Pacific Ocean^(37, 38). In South America, KPC strains have been reported in several countries, such as Argentina⁽³⁹⁾, Colombia⁽⁴⁰⁾ and Brazil^(41, 42). The presence of *bla*_{KPC} in *K. pneumoniae* in five Brazilian states – Rio de Janeiro, Espírito Santo, Minas Gerais, Goiás and Pernambuco (2006-2009) –, was revealed in studies of the surveillance network on bacterial resistance in hospital infection⁽⁴³⁾.

It is worth emphasizing the importance of surveillance cultures in the programs of HAIs control. The comparative analysis between the number of surveillance cultures and clinical cultures demonstrated that the presence of KPC enzyme was more frequently observed in surveillance cultures. Besides, cultures grown at patients' admission and weekly (58%) were superior to those conducted just at admission (15%)⁽³²⁾.

In Rio de Janeiro, a study at the ICU of Instituto Nacional de Cardiologia demonstrated that the most frequent species in active surveillance were *E. coli* (21.95%) and *K. pneumoniae* (34.1%). The presence of beta-lactamases was revealed in 58% of the rectal swab isolates, encoded by genes *bla*_{TEM} (54%), *AmpC* (50%), *bla*_{SHV} (25%) and *bla*_{CTX-MI} (29%)⁽⁴⁴⁾. Our results exhibited high

percentages of genes *bla*_{KPC} (56%) and *bla*_{OXA-1} (60%), and 16% of *bla*_{OXA-48}. The genotypes *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM} and *bla*_{OXA-48} were similarly detected from surveillance cultures, in Canada⁽⁴⁵⁾.

Our data also reveal that 8.6% (6/70) of isolates presented resistance to carbapenems, and absence of genes *bla*_{KPC} and *bla*_{OXA-48}. According to Poulou *et al.* (2013)⁽⁴⁶⁾, this resistance may probably be associated with other mechanisms, such as loss or alteration of outer-membrane porins. An outbreak caused by a clonal lineage of *K. pneumoniae* CTX-M-15 was described at an ICU in Greece. This lineage presented resistance to ertapenem, attributed to the interruption of the *OmpK35* gene and to the presence of a porin variant, *OmpK36*⁽⁴⁶⁾.

Genes *bla*_{VIM} and *bla*_{IMP}, prevalent in non-glucose-fermenting Gram-negative bacteria, such as *Pseudomonas aeruginosa*⁽⁴⁷⁾, were not detected in the present study, although IMP-producing members of the *Enterobacteriaceae* family have been identified, mainly in China, Japan, and Australia; and VIM-producing ones in Italy and Greece⁽⁴⁸⁾. Recently, the coexistence of ESBL-producing *K. pneumoniae* lineages and other carbapenemases has been described in Colombia (KPC-2/VIM-24)⁽⁴⁰⁾, Italy (KPC-2/VIM-1)⁽⁴⁹⁾, and China (KPC-2/IMP)⁽²¹⁾, among others.

In the present investigation, strains of *K. pneumoniae* were detected with up to six genes responsible for beta-lactamase production. Similar results were observed in 24 strains of ESBL-producing *K. pneumoniae*, in Recife, Brazil, where 46% carried three resistance genes. This accumulation of genes may cause limitations to the therapeutical options available for treatment of infections caused by *K. pneumoniae* and *E. coli*⁽⁵⁰⁾.

In relation to molecular typing, our results demonstrated low epidemiological relationship among isolates, different antimicrobial susceptibility patterns and resistance gene profiles. A study by Cabral *et al.* (2012)⁽⁵⁰⁾ also revealed great diversity among strains of *K. pneumoniae*, presenting similarities up to 60% in 18 isolates analyzed. Yet, six strains presented the same band pattern by ERIC-PCR, indicating clonal dissemination in the hospital where the research was conducted⁽⁵⁰⁾.

The high levels of genetic diversity revealed here suggests the absence of cross contamination among ICU inpatients. However, it is necessary to highlight that our study presents some limitations (absence of data on collection periodicity at admission and/or during hospitalization). In spite of the low clonal relationship, the presence of ESBL and KPC-producing *K. pneumoniae* may represent high potential for dissemination of resistance among patients. It is noteworthy that colonization with potential pathogens is almost always a prerequisite for the development of nosocomial infections⁽¹⁸⁾.

CONCLUSION

Although no significant epidemiological relationship was demonstrated, the main contribution of this study was the disclosure of alarming data on the presence of *K. pneumoniae*, carrying genes responsible for ESBL and carbapenemase production during preventive monitoring, a still limited approach in Brazilian health services. Controls based exclusively in clinical cultures may not detect most patients who harbor resistant organisms. The inclusion of surveillance cultures is a recommended strategy, aimed principally at preventing the dissemination of resistance genes in hospital environments, and, consequently, at reducing morbidity and mortality. The data generated in this study indicate the importance of adopting measures of continuous prevention to control the spread of ESBL- and carbapenemase-

producing microorganisms in hospital settings and in the community. Measures such as active surveillance, rational use of antimicrobials, isolation precautions, hand hygiene, and education for health personnel are fundamental for the success of HAI prevention and control programs.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the direction, the staff of the Hospital Infection Control Committee (CCIH), and the Microbiology Laboratory of Hospital Federal da Lagoa. We also thank INCQS/Fiocruz, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) for financial support.

RESUMO

Introdução: O aumento da incidência de microrganismos multirresistentes é considerado um dos principais problemas de saúde pública. Uma das rotinas incluídas na prática hospitalar é a busca de pacientes colonizados e/ou infectados. **Objetivo:** Avaliar a variabilidade genética e as relações clonais de *K. pneumoniae* produtoras de betalactamases de espectro estendido (ESBL) em culturas de vigilância de unidade de terapia intensiva (UTI) no Rio de Janeiro, Brasil. **Materiais e métodos:** Setenta isolados obtidos a partir de swab retal, (março/2013 a março/2014). O perfil de suscetibilidade a antibióticos foi avaliado pelo sistema VITEK 2. Foram pesquisados os genes de resistência: bla_{SHV}, bla_{TEM}, bla_{OXA-1}, bla_{KPC}, bla_{OXA-48}, bla_{CITX-M-15}, bla_{VIM}, bla_{IMP} e bla_{NDM} pela reação em cadeia da polimerase (PCR). A diversidade genética foi avaliada por Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR (ERIC-PCR). **Resultados:** Foram detectados altos percentuais de resistência a cefepime (94%), ceftazidima (96%), ertapenem (61%), imipenem (54%) meropenem (43%) e ciprofloxacino (69%). Os genes prevalentes foram: bla_{SHV} (69%), bla_{TEM} (63%), bla_{OXA-1} (60%), bla_{KPC} (57%), bla_{CITX-M-15} (47%), bla_{OXA-48} (16%). Os genes bla_{VIM}, bla_{IMP} e bla_{NDM} não foram detectados. Foram observados 29 perfis em relação aos genes de resistência, com 23% apresentando pelo menos cinco genes. Uma grande diversidade genética (68 perfis) foi observada entre as cepas. **Conclusão:** Embora não tenha sido observada relação clonal entre os isolados, este estudo revelou dados alarmantes quanto à resistência microbiana em monitoramento preventivo, abordagem ainda pouco adotada no Brasil. Nossos dados permitem concluir que a inclusão de culturas de vigilância nas unidades de saúde é uma estratégia recomendada, visando principalmente à prevenção da disseminação dos genes de resistência no ambiente hospitalar e, conseqüentemente, redução da morbimortalidade.

Unitermos: infecção hospitalar; monitoramento epidemiológico; *Klebsiella pneumoniae*; betalactamases; tipagem molecular.

REFERENCES

- Oliveira AC, Cardoso CS, Mascarenhas D. Precauções de contato em unidade de terapia intensiva: fatores facilitadores e dificultadores para adesão dos profissionais. Rev Esc Enferm USP [Internet]. 2010 Mar; 44(1): 161-5. Available at: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0080-62342010000100023&script=sci_arttext.
- Meyer G, Picoli SU. Fenótipos de β-lactamases em *Klebsiella pneumoniae* de hospital de emergência de Porto Alegre. J Bras Patol Med Lab [Internet]. 2011 Fev; 47(1): 25-31. Available at: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1676-24442011000100003&script=sci_arttext.
- Paim RSP, Lorenzini E. Perfil de resistência antimicrobiana de uma instituição hospitalar de médio porte da região nordeste do Rio Grande do Sul. II Congresso de Pesquisa e Extensão da FSG; 2014 Maio 27-29; Caxias do Sul, RS, Brasil.
- Drawz SM, Bonomo RA. Three decades of β-lactamase inhibitors. Clin Microbiol Rev. 2010 Jan; 23(1): 160-201. PubMed PMID: 20065329.
- Bush K, Jacoby AG. Updated functional classification of β-lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 2010 Mar; 54(3): 969-76.

6. Garcia CS, Gandara MP, Garcia FJC. Betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias distintas de *Escherichia coli* y *Klebsiella*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010; 28(Supl 1): 12-8.
7. Ardanuy C, Liñares J, Domínguez MA, Hernández-Allés S, Benedí VJ, Martínez-Martínez L. Outer membrane profiles of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates from clinical samples and activities of cephalosporins and carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998 Mar; 42(7): 1636-40. PubMed PMID: 9660996.
8. Dienstmann R, Picoli SU, Meyer G, Schenkel T, Steyer J. Avaliação fenotípica da enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) em Enterobacteriaceae de ambiente hospitalar. *J Bras Patol Med Lab*. 2010 Fev; 46(1): 23-7.
9. Gürkntke S, Kohler C, Steinmetz I, et al. Molecular epidemiology of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-positive *Klebsiella pneumoniae* from bloodstream infections and risk factors for mortality. *J Infect Chemother*. 2014; 20(12): 817-9. PubMed PMID: 25224765.
10. Ejaz H, Ul-Haq I, Mahmood S, Zafar A, Javed MM. Detection of extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae*: comparison of phenotypic characterization methods. *Pak J Med Sci*. 2013 May-Jun; 29(3): 768-72. PubMed PMID: 3809290.
11. Naas T, Cuzon G, Villegas MV, Lartigue MF, Quinn JP, Nordmann P. Genetic structures at the origin of acquisition of the β -lactamase bla_{KPC} gene. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Apr; 52(4): 1257-63. PubMed PMID: 18227185.
12. Bayram A, Balci I. Patterns of antimicrobial resistance in a surgical intensive care unit of a university hospital in Turkey. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2006 out; 6: 155. Available at: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2334-6-155.pdf>.
13. Stalder T, Barraud O, Casellas M, Dagot C, Ploy MC. Integron involvement in environmental spread of antibiotic resistance. *Front Microbiol*. 2012 Apr 9; 3: 119.
14. Elgorriaga-Islas E, Guggiana-Nilo P, Domínguez-Yévenes M, et al. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinant aac (6')-Ib-cr among ESBL producing enterobacteria isolates from Chilean hospitals. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2012 Oct; 30(8): 466-8. PubMed PMID: 22542083.
15. Vrioni G, Daniil I, Voulgari E, et al. Comparative evaluation of a prototype chromogenic medium (ChromID CARBA) for detecting carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in surveillance rectal swabs. *J Clin Microbiol*. 2012; 50(6): 1841-6. PubMed PMID: 22461675.
16. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Nota técnica n. 01/2013: medidas de prevenção e controle de infecções por enterobactérias multiresistentes. Brasília; 2013.
17. Centers for Disease Control and Prevention Health Alert Network. 2013. CDC Health Advisory: new carbapenem-resistant Enterobacteriaceae warrant additional action by healthcare providers. CDC Health Alert Network, Atlanta, GA. Available at: <http://www.bt.cdc.gov/HAN/han00341asp>.
18. Schechner V, Kotlovsky T, Kazma M, et al. Asymptomatic rectal carriage of bla_{KPC} producing carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: who is prone to become clinically infected? *Clin Microbiol Infect*. 2013; 19(5): 451-6. PubMed PMID: 22563800.
19. Liu Y, Liu C, Zheng W, et al. PCR detection of *Klebsiella pneumoniae* in infant formula based on 16S-23S internal transcribed spacer. *Int J Food Microbiol*. 2008; 125(3): 230-5. PubMed PMID: 1857924.
20. Steinmann J, Kaase M, Gatermann S, et al. Outbreak due to a *Klebsiella pneumoniae* strain harbouring KPC-2 and VIM-1 in a German university hospital, July 2010 to January 2011. *Euro Surveill*. 2011 Aug 18; 16(33).
21. Liu Y, Wan LG, Deng Q, Cao XW, Yu Y, Xu QF. First description of NDM-1-, KPC-2-, VIM-2- and IMP-4-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in a single Chinese teaching hospital. *Epidemiol Infect*. 2015 Jan; 143(2): 376-84.
22. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001; 45(4): 1151-61. PubMed PMID: 11257029.
23. Monteiro J, Santos AF, Asensi MD, Peirano G. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 Jan; 53(1): 333-4.
24. Jemima SA, Verghese S. Multiplex PCR for $bla_{(CTX-M)}$ & $bla_{(SHV)}$ in the extended spectrum β -lactamase (ESBL) producing gram-negative isolates. *Indian J Med Res* [Internet]. 2008 Set; 128(3): 313-7. Available at: <http://medind.nic.in/iby/t08/i9/iby08i9p313.pdf>.
25. Bargaigua A, El Otmani F, Talmi M, et al. Prevalence and genotypic analysis of plasmid mediated β -lactamases among urinary *Klebsiella pneumoniae* isolates in Moroccan community. *J Antibiot (Tokyo)*. 2013; 66(1): 11-6. PubMed PMID: 23093031.
26. Pitout JD, Laupland KB. Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis*. 2008 Mar; 8(3): 159-66. PubMed PMID: 18291338.
27. Mulvey MR, Grant JM, Plewes K, Roscoe D, Boyd DA. New Delhi metallo- β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*, Canada. *Emerg Infect Dis*. 2011 Jan; 17(1): 103-6. PubMed PMID: 21192866.
28. Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res*. 1991 Dec; 19(24): 6823-31. PubMed PMID: 329316.
29. Van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, et al. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin Microbiol Infect Dis*. 2007; 13(3): 1-46. PubMed PMID: 17716294.
30. Barros ML, Bento CNJ, Caetano AJ, et al. Prevalência de micro-organismo e sensibilidade antimicrobiana de infecções hospitalares em unidade de terapia intensiva de hospital público no Brasil. *Rev Ciênc Farm Básica Apl* [Internet]. 2012; 33(3): 429-35. Available at: http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/Cien_Farm/article/viewFile/2211/1267.
31. Perna SGGT, Puiatti MA, Perna DH, Pereira NMM, Couri MG, Ferreira CMD. Prevalência de infecção hospitalar pela bactéria do gênero *Klebsiella* em uma unidade de terapia intensiva. *Rev Soc Bras Clin Med* [Internet]. 2015 Abr-Jun; 13(2): 119-23. Available at: <http://files.bvs.br/upload/S/1679-1010/2015/v13n2/a4740.pdf>.
32. Calfee D, Jenkins SG. Use of active surveillance cultures to detect asymptomatic colonization with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in intensive care unit patients. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2008 Oct; 29(10): 966-8. PubMed PMID: 18754738.

33. Carvalho R, Filho GPP. Epidemiologically relevant antimicrobial resistance phenotypes in pathogens isolated from critically ill patients in a Brazilian University Hospital. *Braz J Microbiol* [Internet]. 2015 dez; 39(4): 623-30. Available at: <http://www.scielo.br/pdf/bjm/v39n4/arq05.pdf>.
34. Akpaka PE, Legall B, Padman J. Molecular detection and epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase genes prevalent in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *E coli* from Trinidad and Tobago. *West Indian Med J*. 2010; 59(6): 591-6. PubMed PMID: 21702229.
35. Ghafourian S, Sadeghifard N, Sekawi Z, et al. Antimicrobial pattern and clonal dissemination of extended-spectrum β -lactamase producing *Klebsiella* spp. isolates. *Am J Infect Dis*. 2010; 6(4): 110-21.
36. Moosavian M, Deiham B. Distribution of TEM, SHV and CTX-M genes among ESBL-producing Enterobacteriaceae isolates in Iran. *African J Microbiol* [Internet]. 2012 Jul; 6(26): 5433-9. Available at: http://www.academicjournals.org/article/article1380879634_Moosavian%20and%20Deiham.pdf.
37. Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA, et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis*. 2013 Sep; 13(9): 785-96.
38. Nordmann P, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. *Clin Microbiol Infect*. 2014 Sep; 20(9): 821-30.
39. Pasteran FG, Otaegui L, Guerriero L, et al. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-2, Buenos Aires, Argentina. *Emerg Infect Dis*. 2008 Jul; 14(7): 1178-80.
40. Rojas LJ, Mojica MF, Blanco VM, et al. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* coharboring KPC and VIM carbapenemases in Colombia. *Antimicrob Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Feb; 57(2): 1101-2.
41. Peirano G, Seki LM, Val Passos VL, Pinto MC, Guerra LR, Asensi MD. Carbapenem-hydrolysing β -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. *J Antimicrob Chemother*. 2009 Feb; 63(2): 265-8.
42. Fehlberg LC, Carvalho AM, Campana EH, Gontijo-Filho PP, Gales AC. Emergence of *Klebsiella pneumoniae*-producing KPC-2 carbapenemase in Paraíba, Northeastern Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2012; 16(6): 577-80.
43. Seki LM, Pereira PS, Souza MP, et al. Molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Brazil: the predominance of sequence type 437. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011 Jun; 70(2): 274-7. PubMed PMID: 21397425.
44. Vasques MR, Bello AR, Lamas CC, Correa J, Pereira JA. β -lactamase producing enterobacteria isolated from surveillance swabs of patients in a cardiac intensive care unit in Rio de Janeiro, Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2011 Jan-Feb; 15(1): 28-33. PubMed PMID: 21412586.
45. Lee TD, Adie K, McNabb A, et al. Rapid detection of KPC, NDM, and OXA-48-like carbapenemases by real-time PCR from rectal swab surveillance samples. *J Clin Microbiol*. 2015; 53(8).
46. Poulou A, Voulgari E, Vrioni G, et al. Outbreak caused by an ertapenem-resistant, CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* sequence type 101 clone carrying an OmpK36 porin variant. *J Clin Microbiol*. 2013 Oct; 51(10): 3176-82. PubMed PMID: 23850951.
47. Toval F, Guzmán-Marte A, Madriz V, Somogyi T, Rodríguez C, García F. Predominance of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates carrying blaIMP and blaVIM metallo- β -lactamases in a major hospital in Costa Rica. *J Med Microbiol*. 2015 Jan; 64(Pt 1): 37-43.
48. Nordmann P, Nass T, Poirel L. Global spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2011 Oct; 17(10): 1791-8. Available at: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/17/10/11-0655_article.
49. Perilli M, Bottoni C, Grimaldi A, et al. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* harbouring blaKPC-3 and blaVIM-2 from central Italy. *Diagn Microbiol Infect*. 2013 Feb; 75(2): 218-21.
50. Cabral AB, Melo RC, Maciel MA, Lopes AC. Multidrug resistance genes, including blaKPC and blaCTX-M-2, among *Klebsiella pneumoniae* isolated in Recife, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2012; 45(5): 572-8. PubMed PMID: 23152339.

CORRESPONDING AUTHOR

Maysa Mandetta Clementino

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; Fundação Oswaldo Cruz; Av. Brasil, 4.365; 21045-900; Rio de Janeiro-RJ, Brasil; Phone.: +55 (21) 3865-5236; Fax: +55 (21) 2290-0915; e-mail: maysa.mandetta@incqs.fiocruz.br

Perfil de resistência aos antibióticos e prevalência dos genes *qacEΔ1* e *sul1* em *Pseudomonas aeruginosa* de efluente hospitalar

Antibiotic resistance pattern and prevalence of *qacEΔ1* and *sul1* genes in *Pseudomonas aeruginosa* from hospital wastewater

Rosa Maria Pinto Novaes^{1,II}

Mariana de Melo Rodrigues Sobral^I

Camila Barreto^I

Ana Paula Alves Nascimento^I

Mychelle Alves Monteiro^I

Bernardete Ferraz Spisso^I

Kayo Bianco^I

Célia Maria Carvalho Pereira
Araujo Romão^I

Maysa Mandetta Clementino^{I,*}

RESUMO

Introdução: Efluentes hospitalares representam riscos à saúde pública e ambiental devido à presença de microrganismos patogênicos, drogas e produtos químicos. *Pseudomonas aeruginosa* é um patógeno oportunista frequentemente encontrado no ambiente hospitalar. **Objetivo:** Avaliar o resistoma de isolados de *P. aeruginosa* da estação de tratamento de esgoto hospitalar (ETEH) de um complexo hospitalar na cidade do Rio de Janeiro. **Método:** Vinte isolados dos cinco estágios da ETEH foram identificados como *P. aeruginosa* pelo sequenciamento do gene 16S rRNA. A suscetibilidade aos antibióticos foi determinada segundo o CLSI e os genes *qacEΔ1* e *sul1* foram detectados pela PCR. Resíduos de sulfonamidas foram pesquisados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial. **Resultados:** Foi demonstrada a presença de sulfametoxazol em nível inferior a 50 ng·L⁻¹, resistência às sulfonamidas (80%) seguida pelas quinolonas (50%) e 13 perfis de suscetibilidade aos antimicrobianos. Os genes *qacEΔ1-sul1* foram detectados em 100% dos isolados, sugerindo a presença de integrons de classe 1 em toda a ETEH. **Conclusões:** Os resultados sinalizaram limitações no tratamento e a propagação de genes de resistência nas etapas da ETEH. Esses dados contribuem com órgãos competentes no desenho de ações preventivas frente aos impactos negativos à saúde pública.

PALAVRAS-CHAVE: Efluente Hospitalar; *Pseudomonas aeruginosa*; Bactérias Multirresistentes; Integron de Classe 1

ABSTRACT

Introduction: Hospital effluents may pose great environmental risk due to the presence of pathogenic microorganisms, drugs and chemical components. *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen frequently found in hospital environment. **Objective:** To evaluate the resistome of *P. aeruginosa* from the hospital wastewater treatment plant (HWTP) in a hospital complex of Rio de Janeiro city. **Method:** Twenty isolates from the five stages of the HWTP were identified as *P. aeruginosa* by 16S rRNA gene sequencing analysis. Susceptibility to antibiotics was determined according to CLSI and *qacEΔ1* and *sul1* genes were detected by PCR. Sulphonamide residues were investigated by high performance liquid chromatography coupled to sequential mass spectrometry. **Results:** The sulfamethoxazole has been demonstrated at a level below 50 ng L⁻¹. Sulfonamide resistance (80%) has been demonstrated followed by quinolone class (50%) and 13 susceptibility patterns to antimicrobials. The *qacEΔ1-sul1* genes were detected in 100% of isolates suggesting the presence of class 1 integrons in the whole HWTP. **Conclusions:** The results signaled limitations of HWTP and propagation of resistance genes in all stages of the HWTP. These data also contribute to the environmental sanitary surveillance in the design of prevention actions against negative impact on the public health.

KEYWORDS: Hospital Sewage; *Pseudomonas aeruginosa*; Multidrug-Resistant Bacteria; Class 1 Integrons

^I Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

^{II} Subsecretaria de Vigilância, Fiscalização Sanitária e Controle de Zoonoses (SubVISA), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

* E-mail: maysa.mandetta@incqs.fiocruz.br



INTRODUÇÃO

O desenvolvimento e a propagação da resistência aos antibióticos entre bactérias são considerados uma ameaça para a saúde humana e ambiental. Muitos estudos têm demonstrado a importância de cenários ambientais, como por exemplo, água e solo, no ciclo da resistência aos antibióticos na natureza^{1,2}.

As águas residuais provenientes de hospitais e encaminhadas para a estação de tratamento de efluente hospitalar (ETE) contêm em sua composição altas concentrações de bactérias, nutrientes, oxigênio, produtos químicos, metais pesados, agentes antimicrobianos e outras drogas não metabolizadas³. Esse ambiente proporciona o aumento da pressão seletiva e, com isso, a transferência horizontal e a disseminação de genes de resistência e de organismos resistentes para o meio ambiente^{4,5,6}.

Dentre as bactérias encontradas em efluentes hospitalares, a *Pseudomonas aeruginosa* se destaca como um patógeno nosocomial oportunista geralmente envolvido em infecções hospitalares⁷. É conhecido não só por seu metabolismo versátil, mas também por sua excepcional capacidade de se adaptar e colonizar uma ampla variedade de ambientes (águas, solo, rizosfera, animais). Além disso, sua resistência natural (intrínseca) e adquirida a uma ampla gama de agentes antimicrobianos resulta no surgimento de cepas resistentes a múltiplos fármacos^{8,9}. Essa multirresistência tem sido extensivamente descrita e envolve diferentes mecanismos, tais como sistemas bombas de efluxo, baixa permeabilidade da membrana, alteração do alvo do agente antimicrobiano, alteração de proteínas da membrana externa, produção de β-lactamases e outras enzimas^{6,10}.

No Brasil, estudos referentes à avaliação de perfis de suscetibilidade aos antimicrobianos em isolados bacterianos de efluentes hospitalares revelaram a presença de linhagens multidroga resistentes em todas as etapas do sistema e até mesmo após o tratamento^{1,6,11,12}. Além disso, outro estudo revelou a presença de cepas produtoras de enzimas β-lactamases de espectro estendido (ESBL), *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC) e metalo-β-lactamases (MBL)¹³. Miranda et al.¹¹ detectaram os genes *blaSHV*, *blaCTX-M-1*, *blaCTX-M-2* e *blaTEM*, *blaVIM*, *blaSPM* e *blaKPC* em isolados clínicos e na ETE de um mesmo hospital. O gene *blaSPM-1* é o mais prevalente no Brasil, sua disseminação epidemiológica em amostras ambientais no sul do Brasil foi confirmada em isolados de *P. aeruginosa* de um efluente hospitalar e em água superficial do rio receptor¹⁴.

Problemas associados à baixa suscetibilidade microbiana aos antibióticos datam de longo tempo. A resistência às sulfonamidas surgiu logo após sua introdução na prática clínica (1930) e pode ter sido resultado de mutações no sítio-alvo ou por aquisição de genes de resistência à antissintetase (*sul*)^{15,16}. Essa resistência é primariamente mediada pelos genes *sul1*, *sul2* e *sul3* que codificam a *dihydropteroate synthetase* (DHPS) e que apresenta baixa afinidade às sulfonamidas^{17,18}. Diversas espécies bacterianas abrigam esses genes, localizados em transposons ou em plasmídeos autotransfeteáveis ou mobilizáveis com ampla gama de hospedeiros; eles apresentam resistência antibiótica múltipla, que é cosseleccionada por sulfonamidas^{19,20}.

O gene *sul1* faz parte do segmento 3' conservado do integron de classe 1, enquanto o gene *sul2* aparece associado com genes que conferem resistência à estreptomicina. Em alguns estudos, 70% da resistência à sulfonamida poderiam ser conferidas a esses genes²¹. Posteriormente, a disseminação de *sul3*, detectado em uma cepa de *Escherichia coli* na Suíça, parece estar relacionado com transposons²². O sistema integron/cassete é tido como um dos melhores exemplos de captura e expressão de novos genes^{23,24}, ocupando lugar de destaque na pesquisa de resistência aos antibióticos e biocidas^{25,26}.

A resistência bacteriana aos antibióticos é um problema global e vem progressivamente aumentando com o uso indiscriminado e crescente de substâncias com ação antimicrobiana. Em contrapartida, a resistência aos biocidas é uma questão emergente, uma vez que essas substâncias são amplamente utilizadas na descontaminação, desinfecção e esterilização visando o controle da disseminação de microrganismos^{27,28}.

Dentre essas substâncias, os compostos quaternários de amônio (QAC) são utilizados rotineiramente como antissépticos e desinfetantes em ambientes domésticos, veterinários, industriais e hospitalares^{29,30}. Esses compostos são biodegradáveis em condições aeróbicas e, assim, suas concentrações nos diversos ambientes podem flutuar continuamente. No esgoto, efluentes de estação de tratamento de esgoto, águas superficiais e sedimentos geralmente encontram-se em concentrações subinibitórias, tornando esses ambientes seletivos, o que pode resultar na emergência e disseminação de microrganismos com suscetibilidade diminuída a esses compostos entre diferentes gêneros microbianos, incluindo patógenos de interesse médico³¹.

Dentre os mecanismos de resistência aos QAC, a expressão de bombas de efluxo por *P. aeruginosa* pode abranger sistemas de efluxo multidroga, incluindo as proteínas QacE e QacEA1. O gene *qacEA1* está incluído no segmento conservado 3' do integron de classe I, inicialmente descrito como uma variante do gene *qacE*³².

Até o momento, diversos genes *qac* foram descritos, como *qacA*, *qacB*, *smr* (antigos *qacC* e *qacD*), *qacE*, *qacF*, *qacG*, *qacH*, *qacI* e *qacZ*. Em bactérias Gram-negativas, como enterobactérias e *P. aeruginosa*, o gene *qacE* (incluindo a variante atenuada *qacEA1*) é amplamente difundido. Esses genes também podem ser encontrados em outras espécies, como *Aeromonas* spp., *Vibrio* spp. e *Acinetobacter* spp³³. Isto se deve à alta prevalência de integrons de classe I, que em bactérias Gram-negativas geralmente incluem o gene *qacEA1*³⁴. Desta forma, existe a preocupação de que a exposição de microrganismos a compostos quaternários de amônio pode selecionar isolados resistentes a diversos antimicrobianos, favorecendo o surgimento de cepas multirresistentes^{27,35}. Publicações recentes descrevem o aumento nos níveis de resistência associados aos genes *qac*, demonstrando a diminuição do poder de eficácia de compostos como cloreto de benzalcônio e clorhexidina^{36,37}. Além disto, os genes *qacEA1* e *qacE* têm sido detectados em águas superficiais³⁸ e em ambientes poluídos com QAC³⁹.



Este estudo teve como objetivo avaliar os perfis de resistência aos antibióticos em *P. aeruginosa* isoladas de uma ETEH e investigar a presença de genes de resistência aos compostos quaternários de amônio e sulfonamidas (*qacE*, *qacEA1* e *qacEA1-sul1*) associados ao cassete de genes do *integron* de classe I.

MÉTODOS

Local de estudo e obtenção de amostras

O estudo foi realizado na ETEH que atende um complexo hospitalar localizado na Barra da Tijuca, no Rio de Janeiro, Brasil (22°59'42.36"S 43°21'49.62"O). Este complexo é formado por duas unidades de saúde que possuem um total de 322 leitos e realizam 30 mil atendimentos mensais. A estação de tratamento deste complexo tem capacidade para tratar 220 m³ de esgoto por dia. A coleta foi realizada em dezembro de 2010, quando foram retiradas alíquotas (500 mL de cada ponto) dos cinco pontos correspondentes às etapas do tratamento do efluente (Figura 1). As alíquotas foram coletadas em frascos estéreis de polietileno, refrigeradas a 4°C e transportadas para o laboratório.

Dosagens dos parâmetros físicos e químicos

Os parâmetros físicos e químicos, temperatura, pH, condutividade, oxigênio dissolvido (OD), turbidez, salinidade e cloro das amostras foram analisados utilizando os equipamentos portáteis *Water Quality Checker U-10* (Horiba) e medidor de cloro (Homis), respectivamente.

Deteção de antimicrobianos por cromatografia

A metodologia de extração das sulfonamidas foi baseada no método oficial da *United States - Environmental Protection Agency* (U.S. EPA) - Método 1694⁴⁰ e no método descrito por Monteiro et al.⁴¹. Uma alíquota de 25 mL de amostra filtrada foi acidificada com HCl concentrado para ajuste do pH a 2,5. Em seguida foram adicionados 25 mg de Na₂EDTA e prosseguiu-se para a etapa de extração por fase sólida, empregando-se cartuchos Oasis HLB 500 mg/6 mL (Waters, Millford, MA), previamente condicionados com 5 mL de metanol, 5 mL de água ultrapura e 5 mL de água acidificada com HCl concentrado a pH 2,5. Após uma lavagem com duas porções de 2,5 mL de água ultrapura para eliminação de interferentes, aplicou-se vácuo por 2 minutos para secar o cartucho na pressão de

aproximadamente 35 kPa e, em seguida, os analitos foram eluídos com duas porções de 3 mL de metanol e em seguida com duas porções de 2 mL de solução de metanol:acetona (1:1, v/v). Cinco mL do eluato foram separados para análise das sulfonamidas e evaporados à secura com N₂ à temperatura de, no máximo, 47,5°C. O extrato seco contido no tubo de centrifuga foi reconstituído com 1 mL do solvente de reconstituição (80:20 [v/v] de 0,1% v/v de ácido fórmico em água e metanol). Em seguida, foi agitado em vórtex, filtrado em filtro de fibra de vidro/nylon 0,2 µm e transferido para *vial*, para injeção no sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplado à Espectrometria de Massas Sequencial (LC-MS/MS)⁴¹. O sistema de LC-MS/MS é composto de cromatógrafo a líquido de alta eficiência *Shimadzu Prominence* (com os seguintes módulos: bomba quaternária LC-20AD, desgaseificador de membrana DGU-20A5, autoamostrador SIL-20AC, forno de coluna CTO-20AC e controladora CBM-20A) e detector API5000 Applied Biosystems/MDS Sciex com fonte Turbo V® e sonda TurbolonSpray®, controlado pelo *software* Analyst versão 1.4.2 do mesmo fabricante. Os antimicrobianos foram separados a 25°C em coluna C18 (Pursuit™ RS, 2,0 mm x 100 mm x 3 µm - Agilent), com coluna de guarda do mesmo tipo (2,0 mm x 3 µm). As fases móveis utilizadas no programa de eluição gradiente foram 0,1% v/v de ácido fórmico em água (fase móvel A), 0,1% v/v de ácido fórmico em acetonitrila (fase móvel B) e 0,1% v/v de ácido fórmico em metanol (fase móvel C). A programação de eluição gradiente, bem como os parâmetros do espectrômetro de massas encontram-se descritos em Monteiro et al.⁴¹.

Isolamento e identificação bioquímica de *P. aeruginosa*

Após homogeneização, alíquotas de 2 mL, de cada ponto da ETEH foram inoculadas em 5 mL de caldo nutriente e incubadas por 24 h a 37°C. A alíquota da etapa ETEH 1 também foi inoculada em meio de cultura líquido Lethen (DIFCO™) e incubada por 72 h a 37°C. Em seguida, as culturas bacterianas foram semeadas por esgotamento em ágar nutriente e ágar cetrimide (DIFCO™), e incubadas nas mesmas condições. A coloração de Gram e provas bioquímicas convencionais foram realizadas para identificação das cepas, de acordo com o Manual Bergey's⁴². Bastonetes Gram-negativos (BGN) foram submetidos às seguintes provas bioquímicas: Sulfureto, Indol e Motilidade (SIM), catalase, oxidase, OF-glicose, xilose, manitol, lactose, lisina, arginina, ornitina descarboxilase, gelatina e incubação a 42°C.

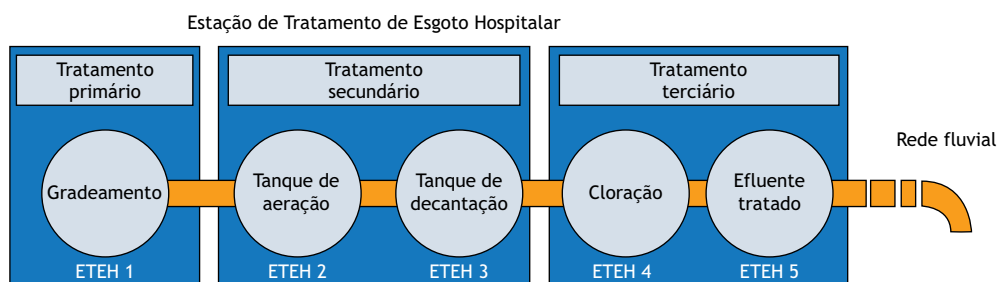


Figura 1. Esquema da estação de tratamento de esgoto do complexo hospitalar (Hospital Municipal Lourenço Jorge e Maternidade Leila Diniz).



Extração de DNA e identificação molecular

Os isolados, previamente identificados fenotipicamente foram certificados por metodologia molecular. A extração do DNA genômico foi realizada utilizando o *kit Dnaeasy® Blood&Tissue* (Qiagen GmgH, Hilden, Germany), de acordo com as instruções do fabricante. A identificação de isolados foi confirmada pela amplificação do gene que codifica a subunidade 16S do rRNA específico de *P. aeruginosa*. As reações foram realizadas com 50 µL de mistura de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) nas seguintes condições: 50 ng de DNA molde, 50 pmol de cada iniciador (PA-SS-F e PA-SS-R) descritos por Spilker et al.⁴³, 0,2 mmol.l⁻¹ de cada desoxinucleotídeo trifosfatado (dNTPs), 1X PCR *buffer* (pH 9,0), 2,5 mmol.l⁻¹ MgCl₂ e 2U de *Taq Platinum DNA Polymerase* (Invitrogen) (Tabela 1). Foram utilizadas como controle das PCR as cepas de referência *P. aeruginosa* INCQS 0024 (ATCC 29336) e *E. coli* INCQS 0033 (ATCC 25922). Os produtos da PCR foram analisados após eletroforese por 1 h a 50 V em gel de agarose 1% no tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5X, que foi corado com brometo de etídio (3 mg/mL). Utilizou-se o 100 bp DNA *ladder* (Invitrogen) como padrão de peso molecular. Após a eletroforese, a imagem do gel foi visualizada pelo *software* de vídeo documentação ImageQuant 300 (GE *Healthcare*). A especificidade dos iniciadores e da PCR foi estabelecida anteriormente com cepas de referência. O fragmento foi purificado com o *kit QIAquick PCR Purification* (Qiagen) e sequenciado com o *kit BigDye® Terminator Cycle Sequencing Standard Version 3.1* (Applied Biosystems™), por eletroforese capilar em aparelho ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems™), na Plataforma do Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (PDTIS/Fiocruz). A análise de similaridade das sequências foi realizada pelo programa BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), no *GenBank*.

Suscetibilidade aos antibióticos

O perfil de suscetibilidade aos antibióticos foi determinado pela técnica de disco-difusão (método de Kirby-Bauer), segundo os

critérios estabelecidos pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI)⁴⁴. A turvação das suspensões utilizadas para testes de sensibilidade foi ajustada em solução salina estéril (NaCl 0,85%) para a obtenção do padrão de turbidez 0,5 na escala de McFarland e foram inoculadas em meio ágar Mueller-Hinton (DIFCO). Os isolados obtidos foram testados quanto à resistência frente a 13 antimicrobianos (CEFAR®). Os antibióticos empregados foram os seguintes: Piperacilina/tazobactam (PPT-110 µg), ticarcilina/ácido clavulânico (TIC-85 µg), ceftazidima (CAZ-30 µg), cefepime (CPM-30 µg), imipenem (IPM-10 µg), meropem (MER-10 µg), aztreonam (ATM-30 µg), gentamicina (GEN-10 µg), tobramicina (TOB-10 µg), sulfonamida (SUL-300 µg), ciprofloxacina (CIP-5 µg), norfloxacina (NOR-10 µg) e polimixina B (POL-300 UI). O controle de qualidade dos discos de antibióticos foi realizado usando-se as cepas de referência *P. aeruginosa* INCQS 00099 (ATCC 853), *Staphylococcus aureus* INCQS 00015 (ATCC 25923) e *E. coli* INCQS 00033 (ATCC 25922). Foram estabelecidos três padrões de resistência (Sensível - S, Resistente - R e Multidroga resistente - MDR) para os isolados analisados⁴⁵.

Detecção dos genes *qacE*, *qacEΔ1* e *qacEΔ1-sul1*

A mistura da PCR teve o volume final de 50 µL contendo os seguintes reagentes: 50 ng de DNA molde, 50 pmol de cada iniciador (Tabela 1), 0,2 mmol.l⁻¹ de cada dNTP, 1X PCR *buffer* (pH 9,0), 1,5 mmol.l⁻¹ MgCl₂ e 1U de *Taq Platinum DNA Polymerase* (Invitrogen). Os programas utilizados para cada iniciador estão descritos na Tabela 1. Foi utilizada como controle positivo do gene *qacEΔ1*, *P. aeruginosa* 531-95²⁷ (*Genbank* GU182337). O produto da PCR foi analisado em gel de eletroforese por 1 h a 50 V em gel de agarose 1% no tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5X, que foi corado com brometo de etídio (3 mg/mL). Utilizou-se o 100 bp DNA *ladder* (Invitrogen) como padrão de peso molecular. Após a eletroforese, a imagem do gel foi realizada usando-se o *software* de vídeo documentação ImageQuant 300 (GE *Healthcare*).

Tabela 1. Iniciadores e programas de amplificação utilizados.

Gene alvo	Iniciadores	Sequência	Programa	Tamanho do Fragmento	Referência	
16S rRNA	PA-SS_F	5'-GGGGATCTTCGACCTCA-3'	95°C - 2' 94°C - 20'' 55°C - 1' 72°C - 1'	25X	956 pb	43
<i>P. aeruginosa</i>	PA-SS_R	5'-TCCTTAGAGTGCCACCG-3'	72°C - 7'			
<i>qacE</i>	F1N	5'-GCCCTACACAAATTGGGAGA-3'	94°C - 3' 94°C - 30'' 57°C - 90''	30X	319 pb	46
	R2B	5'-TACTACACCACTAAGTATGA-3'	72°C - 1' 72°C - 10'			27
<i>qacEΔ1</i>	FQ1	5'-CCCGAATTCATGAAAGGTGG-3'	94°C - 3' 94°C - 30'' 57°C - 90''	35X	350 pb	35
	FQ2	5'-TATAAGCTTTCACCTGGCG-3'	72°C - 1' 72°C - 10'			
<i>qacEΔ1</i> e <i>sul1</i>	P1_Qdelta1	5'-TAGCGAGGGCTTTACTAAGC-3'	94°C - 5' 94°C - 30'' 60°C - 1'	35X	800 pb	Este estudo
	<i>Sul1</i> R	5'-GCCGATCGCGTAAGTTCCG-3'	72°C - 2' 72°C - 7'			47

Pb: pares de bases



Tabela 2. Parâmetros físico-químicos.

Parâmetro	Pontos de Coleta da Estação de Tratamento de Esgoto Hospitalar					
	Resolução Conama n° 430/2011	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5
pH	5,0 a 9,0	7,6	7,9	8,2	8,4	8,4
Condutividade (mS/cm)	-	0,82	0,38	0,38	0,48	0,35
Turbidez (UNT ^a)	< 100	10	99	6	4	7
Oxigênio Dissolvido (mg/L)	-	4,5	9,2	9,3	9,2	3,7
Temperatura (°C)	< 40	29	29	29	29	29
Salinidade (%)	-	0	0	0	0	0
Cloro (ppm)	-	1,0	1,0	1,0	> 10	0,01

^a Unidades Nefelométricas de Turbidez; Conama: Conselho Nacional do Meio Ambiente; ppm: partes por milhão.

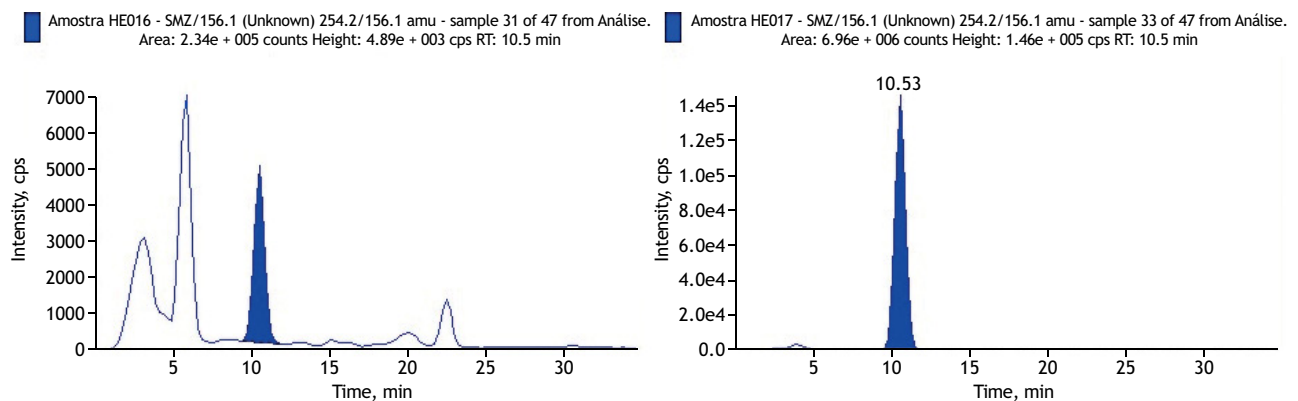


Figura 2a. Detecção de sulfametoxazol no afluente da ETEH (Amostra HE016) e no efluente tratado (Amostra HS017).

RESULTADOS

Dosagem dos parâmetros físico-químicos

O pH das amostras apresentou variação entre 7,6 e 8,4. A condutividade variou entre 0,82 mS/cm e 0,35 mS/cm. O índice de turbidez apresentou maior índice no ponto 2 (99 UNT) em face da injeção de O₂ e o índice de oxigênio dissolvido (DO) iniciou em 4,5 mg/L, posteriormente manteve índices entre 9,2-9,3 mg/L e reduziu para 3,7 mg/L no efluente tratado. A concentração de cloro ativo iniciou em 1,0 ppm, e teve um aumento significativo no ponto onde houve a adição do composto químico. A temperatura e o nível de salinidade permaneceram iguais em todos os pontos (Tabela 2).

Detecção de antimicrobianos por cromatografia

O antimicrobiano sulfametoxazol foi identificado em duas amostras, uma do afluente hospitalar da ETEH e outra do efluente tratado, ambas em concentração inferior a 50 ng·L⁻¹ (limite de quantificação do método) (Figura 2a). A Figura 2b apresenta a injeção de uma solução padrão contendo o sulfametoxazol que também foi injetada no LC-MS/MS, para fins de comparação.

Isolamento de *P. aeruginosa*

Foram isoladas 21 cepas de BGN, móveis; H₂S, indol e lactose negativas; xilose variáveis; oxidativas; manitol, lisina, arginina, ornitina, gelatina, catalase e crescimento a 42°C positivas.

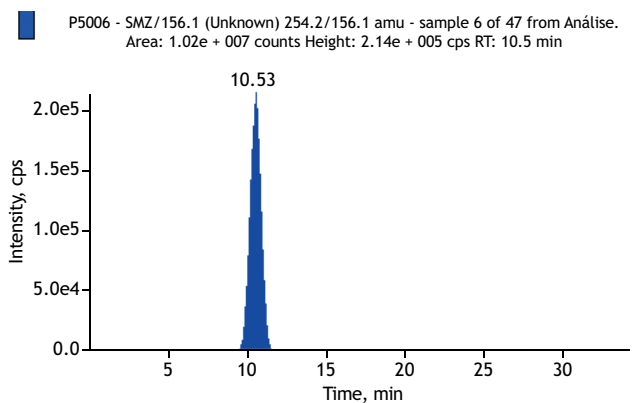


Figura 2b. Detecção de Sulfametoxazol em solução padrão.

A PCR das cepas de *P. aeruginosa* resultou na amplificação de um fragmento de 956 pb em 95% (20/21) das cepas.

Suscetibilidade aos antimicrobianos

A suscetibilidade aos antibióticos apresentou maiores percentuais de resistência às sulfonamidas e às quinolonas, seguido pelas outras três classes analisadas (Figura 3). A análise dos dados do antibiograma revelou 13 perfis de resistência distintos entre os isolados (Tabela 3). Quarenta e cinco por cento apresentaram o fenótipo MDR, destes 44% foram da etapa de cloração da estação (Figura 4).

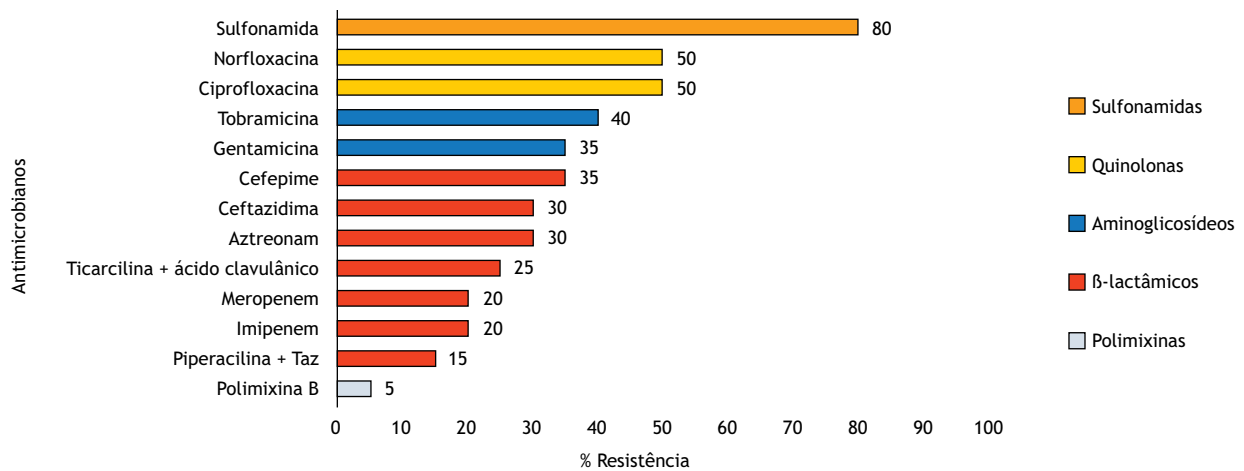
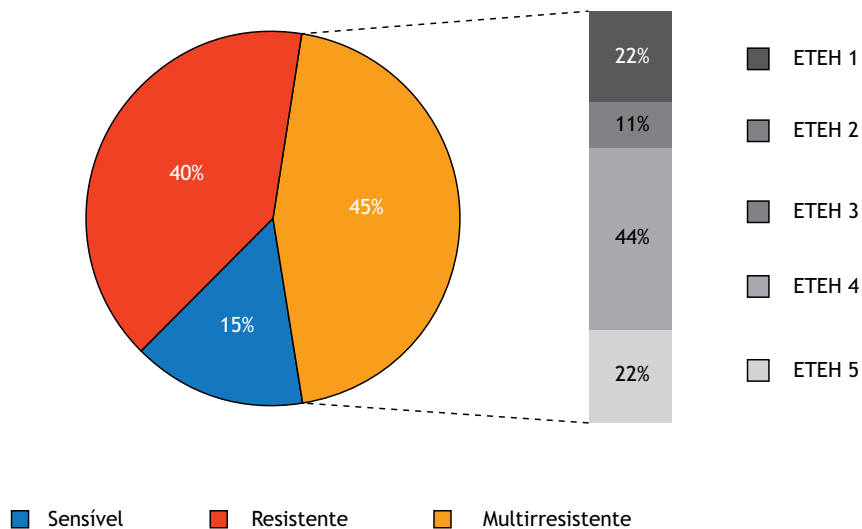


Figura 3. Suscetibilidade às classes de antibióticos nas cepas de *P. aeruginosa*.

Tabela 3. Perfil de resistência aos antimicrobianos das cepas de *P. aeruginosa* de acordo com o ponto de coleta das cepas.

Perfil	Resistência	N° de isolados	Origem
I	SUSCETÍVEL A TODOS	2	ETE 2, 3, 5
II	SUL	6	ETE 2, 5
III	TOB, CIP	1	ETE 3
IV	CAZ, CPM	1	ETE 5
V	GEN, NOR, SUL	1	ETE 2
VI	TOB, CIP, NOR, SUL	1	ETE 1
VII	TIC, ATM, CIP, NOR, SUL	1	ETE 1
VIII	CPM, GEN, TOB, ATM, CIP, NOR, SUL	2	ETE 5
IX	TIC, CAZ, CPM, ATM, CIP, NOR, SUL	1	ETE 1
X	CAZ, GEN, TOB, IPM, MER, CIP, NOR, SUL	1	ETE 4
XI	PPT, TIC, CAZ, CPM, GEN, TOB, IPM, MER, CIP, NOR, SUL	1	ETE 4
XII	PPT, TIC, CAZ, CPM, GEN, TOB, ATM, IPM, MER, CIP, NOR, SUL	1	ETE 4
XIII	PPT, TIC, CAZ, CPM, GEN, TOB, ATM, IPM, MER, CIP, NOR, SUL, POL	1	ETE 4

PPT: Piperacilina+Tazobactam; TIC: Ticarcilina + Ácido Clavulânico; CAZ: Ceftazidima; CPM: Cefepime; GEN: Gentamicina; TOB: Tobramicina; ATM: Aztreonam; IPM: Imipenem; MER: Meropenem; CIP: Ciprofloxacina; NOR: Norfloxacina; SUL: Sulfonamida; POL: Polimixina. ETEH: Estação de tratamento de esgoto hospitalar; ETEH 1: entrada do esgoto; ETEH 2: tanque de aeração; ETEH 3: tanque de decantação; ETEH 4: cloração; ETEH 5: efluente tratado.



ETE 1: entrada do esgoto; ETE 2: tanque de aeração; ETE 3: tanque de decantação; ETE 4: cloração; ETE 5: efluente tratado.

Figura 4. Fenótipos de suscetibilidade aos antimicrobianos dos isolados de *P. aeruginosa*.



Detecção dos genes *qacE*, *qacEA1* e *qacEA1-sul1*

As 20 cepas de *P. aeruginosa* foram submetidas à PCR para verificar a presença dos genes *qacE*, *qacEA1* e *qacEA1-sul1*. O gene *qacE* não foi detectado em nenhum dos isolados. No entanto, o gene *qacEA1* foi verificado em 90% (18/20) dos isolados analisados apresentando um fragmento de 400 pb. Enquanto os genes *qacEA1-sul1* amplificados em conjunto, apresentaram um fragmento único de aproximadamente 800 pb em 100% (20/20) das cepas. O fragmento da cepa *P. aeruginosa* P5520, utilizada como controle positivo da PCR, foi sequenciado e demonstrou identidade de 96%-98% com sequências do banco de dados. Esta sequência foi depositada no *GenBank* sob o número de acesso MF801598.

DISCUSSÃO

Os hospitais são considerados nichos ecológicos para bactérias resistentes aos antibióticos e desempenham um papel importante no surgimento e disseminação de resistência. Essas bactérias deixam hospitais por meio de pacientes colonizados e também através dos sistemas de tratamento de águas residuais⁴⁸.

No presente estudo, foram isoladas cepas de *P. aeruginosa* em todos os pontos de coleta da estação de tratamento de esgoto hospitalar, inclusive na etapa final na qual o efluente já se encontra tratado e apto a ser liberado para os corpos hídricos. Um fato intrigante foi a ausência de células viáveis de *P. aeruginosa*, na 1ª etapa da estação (chegada do afluente). Porém, a presença de crescimento bacteriano após cultivo em meio de cultura contendo inibidores de alguns princípios ativos de antissépticos e desinfetantes, nos permitiu constatar que os microrganismos estavam sob ação bacteriostática desses produtos e de outros antimicrobianos. Os QAC são um dos surfactantes mais utilizados na desinfecção do ambiente hospitalar e que quando liberados nos ambientes aquáticos apresentam ação antimicrobiana em concentrações relativamente baixas^{49,50}. Além da atividade bactericida e/ou bacteriostática, esses produtos podem aumentar a pressão seletiva e a resistência aos antibióticos e biocidas⁵¹.

Nossos resultados revelaram alta diversidade nos perfis de resistência e alta frequência de cepas MDR nas diferentes etapas do tratamento do esgoto hospitalar. O maior índice de cepas com fenótipo MDR no ponto da cloração, provavelmente está relacionado ao favorecimento da transferência de plasmídeos de resistência durante o processo de cloração, etapa crítica do tratamento. Desde a década de 1970, estudos sobre o efeito da cloração em bactérias resistentes aos antibióticos descrevem um aumento considerável de bactérias resistentes a múltiplos antibióticos na água e no esgoto^{52,53,54}. Além de apresentar o maior número de cepas MDR, no ponto ETEH 4 foi encontrado um isolado resistente a todos os antibióticos testados, inclusive à polimixina B, que é considerada altamente eficaz frente a cepas de *P. aeruginosa*, segundo o Programa de Vigilância Epidemiológica (SENTRY - 2001 a 2004)⁵⁵.

A presença de cepas MDR na etapa onde o efluente já se encontra tratado demonstra certa limitação do tratamento na eliminação

desses patógenos. Essa limitação pode estar associada ao tamanho da população microbiana inicial, aos diferentes estágios de desenvolvimento do microrganismo, à concentração do desinfetante, ao potencial hidrogeniônico do efluente (pH) e ao tempo de exposição ao desinfetante⁵⁶. A avaliação da suscetibilidade aos antibióticos de *Pseudomonas* spp. em afluentes e efluentes de uma estação de tratamento de esgoto demonstrou a presença de cepas resistentes aos antibióticos carbapenêmicos somente no efluente tratado⁵⁷.

Nossos resultados demonstraram claramente que as condições físico-químicas do ambiente e a presença de antimicrobianos provavelmente afetaram os fenótipos de suscetibilidade aos antibióticos dessas bactérias. Além disso, sabe-se que os antibióticos em concentrações subinibitórias podem ter um impacto sobre as funções celulares e alterar a expressão de fatores de virulência ou a transferência de genes de resistência aos antibióticos⁵⁸.

Por outro lado, a baixa suscetibilidade observada frente às sulfonamidas (80%), seguida pela ciprofloxacina e norfloxacina (50%), merece destaque. Embora não tivéssemos informações sobre as prescrições terapêuticas nesses hospitais, a presença de uma sulfonamida, a sulfametoxazol, tanto no esgoto bruto quanto no tratado, observada em nossos dados nos permite sugerir que a utilização de altas concentrações desses antimicrobianos pode interferir na indução de mutações na enzima DNA girase ou na superexpressão do sistema de efluxo, contribuindo para essa resistência^{17,59}. As sulfonamidas também podem resistir fortemente à biodegradação natural, como refletido na alta frequência de sua detecção em ambientes aquáticos. Pesquisadores do *U. S. Geological Service* (USGS) demonstraram a detecção de sulfametoxazol em rios e córregos com frequências de até 27%⁶⁰. Além disso, sua baixa tendência para partição em sedimentos permite que eles sejam transportados por longas distâncias em águas correntes. Perez et al.⁶¹ realizaram a avaliação da degradabilidade da sulfamethazine, sulfametoxazol e sulfatiazol em amostras de águas superficiais. Após mais de um mês, as sulfonamidas não foram degradadas por microrganismos de águas superficiais em um reator de batelada.

Considerando a composição do esgoto hospitalar e a baixa suscetibilidade encontrada às sulfonamidas em nossos isolados (60%), resolvemos investigar a presença dos genes *sul1*, *qacE* e *qacEA1*, que conferem resistência à sulfonamida e aos QAC, respectivamente. Verificamos então que a detecção do gene *sul1* não coincidiu com os resultados revelados pelo fenótipo, nos quais 80% dos isolados apresentaram resistência à sulfonamida e 100% deles apresentaram o gene *sul1*. Esse percentual de resistência pode ter ocorrido devido à ausência de expressão do gene *sul1*. Grape et al.⁶² demonstraram que dentre 105 isolados clínicos da família Enterobacteriaceae, 64 foram resistentes às sulfonamidas. O gene *sul1* foi encontrado em 14 isolados, o gene *sul2* em 23 isolados, os genes *sul1* e *sul2* foram simultaneamente detectados em 25 isolados e o gene *sul3* foi encontrado somente em dois isolados.

A distribuição dos genes *qacE* e *qacEA1* foi avaliada em isolados Gram-negativos de origem clínica e ambiental por Kazama et al.⁴⁶



O percentual de cepas positivas para esses dois genes em isolados clínicos de *P. aeruginosa* (n = 63) foi 65% para *qacEA1* e 24% para *qacE*. Já em cepas ambientais de *P. aeruginosa* (n = 5) a distribuição foi de 40% para *qacEA1* e nenhum para *qacE*. Outro estudo também detectou a presença de *qacEA1* em 48% dos isolados clínicos de *P. aeruginosa* (n = 60), sendo encontrado em 88% das cepas MDR e em 35% das não multirresistentes, o que reforça a associação da presença deste gene com a multirresistência aos antimicrobianos²⁷.

O presente estudo demonstrou a presença dos genes *qacEA1-sul1* em 100% dos isolados do esgoto hospitalar (45% MDR, 40% R e 15% S) e a ausência do gene *qacE*. Essa ausência, muito provavelmente, se deve à inserção do segmento contendo o gene de resistência à sulfonamida (*sul1*) próximo a região 3' do gene *qacE*, transformando-o em *qacEA1*³².

Os genes *qacEA1* e *sul1* estão frequentemente associados a integrons classe 1^{63,64,65}. A associação desses genes em integron classe 1 foi detectada em 97% de isolados de bactérias do gênero *Salmonella* em Portugal⁶⁶. Assumindo que a presença desses genes sugere fortemente a presença de um integron de classe 1, podemos concluir que estes elementos estão amplamente distribuídos nas diferentes etapas do sistema de tratamento desse esgoto hospitalar.

Compostos à base de QAC estão frequentemente presentes em formulações de biocidas catiônicos. Assim sendo, o uso desses produtos pode ter um papel importante, porém indireto, na seleção de bactérias resistentes aos antibióticos⁶⁷. Genes de resistência aos QAC, especialmente relacionados às bombas de efluxo, são amplamente encontrados em estabelecimentos de assistência à saúde humana e animal. Bombas de efluxo específicas ou multidrogas são importantes determinantes de resistência intrínseca e/ou adquirida aos antimicrobianos. Alguns desses elementos acomodam resistência a ambos antibióticos e biocidas. Este fato, ainda não bem compreendido, pode conduzir à seleção de organismos antibiótico-resistentes via seleção por biocidas^{31,68}.

A exposição a antibióticos, biocidas ou metais pesados e muitos outros fatores ambientais diferentes resulta em um aumento de células contendo integrons^{39,69,70}. Além disso, a exposição a diferentes antibióticos (aminoglicosídeos, β -lactâmicos, fluoroquinolonas, entre outros) facilita a recombinação de casete de genes; envolvendo ocasionalmente a superexpressão da integrase *IntI1* desencadeada pelo sistema SOS que induz a

desativação de *LexA*^{71,72}. A tendência atual, de uso mais amplo e indiscriminado de biocidas, pode conduzir à emergência de novos elementos genéticos, com consequências imprevisíveis para o bem-estar humano².

É evidente que, embora exista uma compreensão geral sobre as origens, os mecanismos de aquisição e a disseminação de genes de resistência aos antibióticos nas populações microbianas, ainda faltam muitos detalhes a serem esclarecidos a esse respeito. Esses aspectos pouco esclarecidos, em grande parte, ocorrem porque os estudos se concentram principalmente nas propriedades de patógenos de origem clínica e pouco esforço tem sido despendido para estabelecer o comportamento de cepas ambientais.

CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados foi possível concluir que a presença de *P. aeruginosa* resistente aos antibióticos em todas as etapas da ETEH do complexo hospitalar estudado tem caráter relevante na avaliação da eficiência do tratamento biológico de efluentes hospitalares. A detecção do maior percentual de cepas MDR na etapa de cloração sugere aumento da transferência horizontal e a disseminação de genes e organismos de resistência.

A presença de cepas de *P. aeruginosa* resistentes e de MDR no efluente tratado indica que o tratamento apresentou limitações na eliminação desses patógenos e alerta para os riscos à comunidade local, uma vez que o destino final desse efluente é um complexo lagunar utilizado como recreação e pesca de subsistência.

Embora com limitações em função do número reduzido de cepas estudadas, os resultados obtidos são altamente impactantes, pois foram detectadas cepas microbianas resistentes a antibióticos utilizados no tratamento de infecções graves, como as cefalosporinas de quarta geração, drogas carbapenêmicas e até resistência à polimixina, um dos últimos recursos no arsenal terapêutico antimicrobiano.

Os dados obtidos no presente estudo colaboram com a interpretação da eficiência do tratamento do resíduo líquido hospitalar. Além disso, poderão contribuir com a Vigilância Ambiental em Saúde no que se refere ao desenho de ações preventivas aos impactos negativos desses efluentes nos sistemas aquáticos e na saúde pública.

REFERÊNCIAS

1. Fuentefria DB, Ferreira AE, Corção G. Antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from hospital wastewater and superficial water: are they genetically related? *J Environ Manage*. 2011;92(1):250-5. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2010.09.001>
2. Gillings MR. Evolutionary consequences of antibiotic use for the resistome, mobilome and microbial pangenome. *Front Microbiol*. 2013;22;4:4. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00004>
3. Emmanuel E, Perrodin Y, Keck G, Blanchard JM, Vermande P. Ecotoxicological risk assessment of hospital wastewater: a proposed framework for raw effluents discharging into urban sewer network. *J Hazard Mater*. 2005;14;117(1):1-11. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2004.08.032>
4. Perron GG, Gonzalez A, Buckling A. The rate of environmental change drives adaptation to an antibiotic sink. *J Evol Biol*. 2008;21(6):1724-31. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2008.01596.x>



5. Rizzo L, Fiorentino A, Anselmo A. Advanced treatment of urban wastewater by UV radiation: effect on antibiotics and antibiotic-resistant *E. coli* strains. *Chemosphere*. 2013;92(2):171-6. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.03.021>
6. Santoro DO, Cardoso AM, Coutinho FH, Pinto LH, Vieira RP, Albano RM et al. Diversity and antibiotic resistance profiles of *Pseudomonads* from a hospital wastewater treatment plant. *J Appl Microbiol*. 2015;119(6):1527-40. <https://doi.org/10.1111/jam.12936>
7. Garcia LP, Zanetti-Ramos BG. Gerenciamento dos resíduos de serviços de saúde: uma questão de biossegurança. *Cad Saude Publica*. 2004;20(3):744-52. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2004000300011>
8. Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis*. 2002;1;34(5):634-40. <https://doi.org/10.1086/338782>
9. McGowan JE Jr. Resistance in nonfermenting gram-negative bacteria: multidrug resistance to the maximum. *Am J Med*. 2006;119(6 Suppl 1):S29-36.
10. Alekshun MN, Levy SB. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*. 2007;128(6):1037-50. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.004>
11. Miranda CC, Filippis I, Pinto LH, Coelho-Souza T, Bianco K, Cacci LC et al. Genotypic characteristics of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from hospital wastewater treatment plant in Rio de Janeiro, Brazil. *J Appl Microbiol*. 2015;118(6):1276-86. <https://doi.org/10.1111/jam.12792>
12. Magalhães MJ, Pontes G, Serra PT, Balieiro A, Castro D, Pieri FA et al. Multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* survey in a stream receiving effluents from ineffective wastewater hospital plants. *BMC Microbiol*. 2016;24;16(1):193. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0798-0>
13. Prado T, Pereira WC, Silva DM, Seki LM, Carvalho AP, Asensi MD. Detection of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in effluents and sludge of a hospital sewage treatment plant. *Lett Appl Microbiol*. 2008;46(1):136-41. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02275.x>
14. Fuentefria DB, Ferreira AE, Gräf T, Corção G. *Pseudomonas aeruginosa*: disseminação de resistência antimicrobiana em efluente hospitalar e água superficial. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008;41(5):470-3. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822008000500007>
15. Huovinen P, Sundström L, Swedberg G, Sköld O. Trimethoprim and sulfonamide resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995;39(2):279-89. <https://doi.org/10.1128/AAC.39.2.279>
16. Enne VI, Livermore DM, Stephens P, Hall LM. Persistence of sulphonamide resistance in *Escherichia coli* in the UK despite national prescribing restriction. *Lancet*. 2001;28;357(9265):1325-8. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04519-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04519-0)
17. Sköld O. Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. *Drug Resist Updat*. 2000;3(3):155-60. <https://doi.org/10.1054/drup.2000.0146>
18. Yun MK, Wu Y, Li Z, Zhao Y, Waddell MB, Ferreira AM, et al. Catalysis and sulfa drug resistance in dihydropteroate synthase. *Science*. 2012;335(6072):1110-4. <https://doi.org/10.1126/science.1214641>
19. Heuer H, Szczepanowski R, Schneiker S, Pühler A, Top EM, Schlüter A. The complete sequences of plasmids pB2 and pB3 provide evidence for a recent ancestor of the IncP-1beta group without any accessory genes. *Microbiology*. 2004;150(Pt 11):3591-9. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27304-0>
20. Byrne-Bailey KG, Gaze WH, Kay P, Boxall AB, Hawkey PM, Wellington EM. Prevalence of sulfonamide resistance genes in bacterial isolates from manured agricultural soils and pig slurry in the United Kingdom. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(2):696-702. <https://doi.org/10.1128/AAC.00652-07>
21. Lanz R, Kuhnert P, Boerlin P. Antimicrobial resistance and resistance gene determinants in clinical *Escherichia coli* from different animal species in Switzerland. *Vet Microbiol*. 2003;91(1):73-84. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00263-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00263-8)
22. Perreten V, Boerlin P. A new sulfonamide resistance gene (*sul3*) in *Escherichia coli* is widespread in the pig population of Switzerland. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47(3):1169-72. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.3.1169-1172.2003>
23. Hall RM, Collis CM, Kim MJ, Partridge SR, Recchia GD, Stokes HW. Mobile gene cassettes and integrons in evolution. *Ann N Y Acad Sci*. 1999;870:68-80. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb08866.x>
24. Harbottle H, Thakur S, Zhao S, White DG. Genetics of antimicrobial resistance. *Anim Biotechnol*. 2006;17(2):111-24. <https://doi.org/10.1080/10495390600957092>
25. Hendrickx L, Hausner M, Wuertz S. Natural genetic transformation in monoculture *Acinetobacter* sp. strain BD413 biofilms. *Appl Environ Microbiol*. 2003;69(3):1721-7. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.3.1721-1727.2003>
26. Barlow RS, Pemberton JM, Desmarchelier PM, Gobius KS. Isolation and characterization of integron-containing bacteria without antibiotic selection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(3):838-42. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.3.838-842.2004>
27. Romão C, Miranda CA, Silva J, Mandetta Clementino M, de Filippis I, Asensi M. Presence of *qacEΔ1* gene and susceptibility to a hospital biocide in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* resistant to antibiotics. *Curr Microbiol*. 2011;63(1):16-21. <https://doi.org/10.1007/s00284-011-9934-0>
28. Mahzounieh M, Khoshnood S, Ebrahimi A, Habibian S, Yaghoobian M. Detection of antiseptic-resistance genes in *Pseudomonas* and *Acinetobacter* spp: isolated from burn patients. *Jundishapur J Nat Pharm Prod*. 2014;9(2):e15402.
29. Bjorland J, Sunde M, Waage S. Plasmid-borne *smr* gene causes resistance to quaternary ammonium compounds in bovine *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 2001;39(11):3999-4004. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.11.3999-4004.2001>
30. Wassenaar TM, Ussery D, Nielsen LN, Ingmer H. Review and phylogenetic analysis of *qac* genes that reduce susceptibility to quaternary ammonium compounds in



- Staphylococcus* species. Eur J Microbiol Immunol (Bp). 2015;5(1):44-61. <https://doi.org/10.1556/EuJMI-D-14-00038>
31. Tezel U, Pavlostathis SG. Quaternary ammonium disinfectants: microbial adaptation, degradation and ecology. Curr Opin Biotechnol. 2015;33:296-304. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.03.018>
 32. Paulsen IT, Brown MH, Skurray RA. Proton-dependent multidrug efflux systems. Microbiol Rev. 1996;60(4):575-608.
 33. Jaglic Z, Cervinkova D. Genetic basis of resistance to quaternary ammonium compounds - the *qac* genes and their role: a review. Vet Med (Praha). 2012;57(6):275-81.
 34. Cervinkova D, Babak V, Marosevic D, Kubikova I, Jaglic Z. The role of the *qacA* gene in mediating resistance to quaternary ammonium compounds. Microb Drug Resist. 2013;19(3):160-7. <https://doi.org/10.1089/mdr.2012.0154>
 35. Kücken D, Feucht H, Kaulfers P. Association of *qacE* and *qacEDelta1* with multiple resistance to antibiotics and antiseptics in clinical isolates of Gram-negative bacteria. FEMS Microbiol Lett. 2000;183(1):95-8. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(99\)00636-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(99)00636-9)
 36. Kampf G. Acquired resistance to chlorhexidine - is it time to establish an 'antiseptic stewardship' initiative? J Hosp Infect. 2016;94(3):213-27. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2016.08.018>
 37. Jennings MC, Forman ME, Duggan SM, Minbiole KPC, Wuest WM. Efflux pumps might not be the major drivers of QAC resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. ChemBiochem. 2017;18(16):1573-1577. <https://doi.org/10.1002/cbic.201700233>
 38. Canal N, Meneghetti KL, Almeida CP, Bastos MR, Otton LM, Corção G. Characterization of the variable region in the class 1 integron of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolated from surface water. Braz J Microbiol. 2016;47(2):337-44. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.01.015>
 39. Gaze WH, Abdoulsam N, Hawkey PM, Wellington EM. Incidence of class 1 integrons in a quaternary ammonium compound-polluted environment. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49(5):1802-7. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.5.1802-1807.2005>
 40. U. S. Environment Protection Agency. EPA. 821-R-08-002. Method 1694: Pharmaceuticals and personal care products in water, soil, sediment, and biosolids by HPLC/MS/MS. Washington, DC: U. S. Environment Protection Agency; 2007.
 41. Monteiro MA, Spisso BF, Santos JR, Costa RP, Ferreira RG, Pereira UM et al. Occurrence of antimicrobials in river water samples from rural region of the state of Rio de Janeiro, Brazil. J Environ Prot (Irvine Calif). 2016;7(2):230-41. <https://doi.org/10.4236/jep.2016.72020>
 42. Garrity G, Brenner DJ, Krieg NR, Staley JR, editors. Bergey's Manual® of systematic bacteriology. New York: Springer; 2005. Volume 2: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria. Chapter 9: Pseudomonadales Orla-Jensen 1921, 270AL, p. 323-342.
 43. Spilker T, Coenye T, Vandamme P, LiPuma JJ. PCR-based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. J Clin Microbiol. 2004;42(5):2074-9. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.5.2074-2079.2004>
 44. Clinical and Laboratory Standards Institute. M100S-26: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, twenty-sixth informational supplement. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.
 45. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect. 2012;18(3):268-81. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
 46. Kazama H, Hamashima H, Sasatsu M, Arai T. Distribution of the antiseptic-resistance genes *qacE* and *qacE delta 1* in gram-negative bacteria. FEMS Microbiol Lett. 1998;159(2):173-8.
 47. Frank T, Gautier V, Talarmin A, Bercion R, Arlet G. Characterization of sulphonamide resistance genes and class 1 integron gene cassettes in Enterobacteriaceae, Central African Republic (CAR). J Antimicrob Chemother. 2007;59(4):742-5. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl538>
 48. Rizzo L, Manaia C, Merlin C, Schwartz T, Dagot C, Ploy MC et al. Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: a review. Sci Total Environ. 2013;447:345-60. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.01.032>
 49. Maillard JY. Antimicrobial biocides in the healthcare environment: efficacy, usage, policies, and perceived problems. Ther Clin Risk Manag. 2005;1(4):307-20.
 50. Singh M, Sharma R, Gupta PK, Rana JK, Sharma M, Taneja N. Comparative efficacy evaluation of disinfectants routinely used in hospital practice: india. Indian J Crit Care Med. 2012;16(3):123-9. <https://doi.org/10.4103/0972-5229.102067>
 51. Santoro DO, Romão CM, Clementino MM. Decreased aztreonam susceptibility among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from hospital effluent treatment system and clinical samples. Int J Environ Health Res. 2012;22(6):560-70. <https://doi.org/10.1080/09603123.2012.678000>
 52. Grabow WO, Middendorff IG, Prozesky OW. Survival in maturation ponds of coliform bacteria with transferable drug resistance. Water Res. 1973;7(11):1589-97. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(73\)90130-9](https://doi.org/10.1016/0043-1354(73)90130-9)
 53. Armstrong JL, Calomiris JJ, Seidler RJ. Selection of antibiotic-resistant standard plate count bacteria during water treatment. Appl Environ Microbiol. 1982;44(2):308-16.
 54. Murray GE, Tobin RS, Junkins B, Kushner DJ. Effect of chlorination on antibiotic resistance profiles of sewage-related bacteria. Appl Environ Microbiol. 1984;48(1):73-7.
 55. Gales AC, Jones RN, Sader HS. Global assessment of the antimicrobial activity of polymyxin B against 54 731 clinical isolates of Gram-negative bacilli: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme (2001-2004). Clin Microbiol Infect. 2006;12(4):315-21. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01351.x>



56. Nwachuku N, Gerba CP. Emerging waterborne pathogens: can we kill them all? *Curr Opin Biotechnol.* 2004;15(3):175-80. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2004.04.010>
57. Luczkiewicz A, Kotlarska E, Artichowicz W, Tarasewicz K, Fudala-Ksiazek S. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas* spp. isolated from wastewater and wastewater-impacted marine coastal zone. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2015;22(24):19823-34. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5098-y>
58. Bernier SP, Surette MG. Concentration-dependent activity of antibiotics in natural environments. *Front Microbiol.* 2013;4:20. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00020>
59. Sköld O. Resistance to trimethoprim and sulfonamides. *Vet Res.* 2001;32(3-4):261-73. <https://doi.org/10.1051/vetres:2001123>
60. Kolpin DW, Furlong ET, Meyer MT, Thurman EM, Zaugg SD, Barber LB et al. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance. *Environ Sci Technol.* 2002;36(6):1202-11. <https://doi.org/10.1021/es011055j>
61. Pérez S, Eichhorn P, Aga DS. Evaluating the biodegradability of sulfamethazine, sulfamethoxazole, sulfathiazole, and trimethoprim at different stages of sewage treatment. *Environ Toxicol Chem.* 2005;24(6):1361-7. <https://doi.org/10.1897/04-211R.1>
62. Grape M, Sundström L, Kronvall G. Sulphonamide resistance gene *sul3* found in *Escherichia coli* isolates from human sources. *J Antimicrob Chemother.* 2003;52(6):1022-4. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg473>
63. Arabi H, Pakzad I, Nasrollahi A, Hosainzadegan H, Azizi Jalilian F, Taherikalani M et al. Sulfonamide resistance genes (*sul*) M in extended spectrum beta lactamase (ESBL) and non-ESBL producing *Escherichia coli* isolated from Iranian Hospitals. *Jundishapur J Microbiol.* 2015;8(7):e19961. <https://doi.org/10.5812/jjm.19961v2>
64. Sandvang D, Aarestrup FM, Jensen LB. Characterisation of integrons and antibiotic resistance genes in Danish multiresistant *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. *FEMS Microbiol Lett.* 1998;160(1):37-41. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb12887.x>
65. Toleman MA, Walsh TR. Combinatorial events of insertion sequences and ICE in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 2011;35(5):912-35. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00294.x>
66. Antunes P, Machado J, Sousa JC, Peixe L. Dissemination of sulfonamide resistance genes (*sul1*, *sul2*, and *sul3*) in Portuguese *Salmonella enterica* strains and relation with integrons. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(2):836-9. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.2.836-839.2005>
67. Hegstad K, Langsrud S, Lunestad BT, Scheie AA, Sunde M, Yazdankhah SP. Does the wide use of quaternary ammonium compounds enhance the selection and spread of antimicrobial resistance and thus threaten our health? *Microb Drug Resist.* 2010;16(2):91-104. <https://doi.org/10.1089/mdr.2009.0120>
68. Poole K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2005;56(1):20-51. <https://doi.org/10.1093/jac/dki171>
69. Wright MS, Baker-Austin C, Lindell AH, Stepanauskas R, Stokes HW, McArthur JV. Influence of industrial contamination on mobile genetic elements: class 1 integron abundance and gene cassette structure in aquatic bacterial communities. *ISME J.* 2008;2(4):417-28. <https://doi.org/10.1038/ismej.2008.8>
70. Stalder T, Barraud O, Casellas M, Dagot C, Ploy MC. Integron involvement in environmental spread of antibiotic resistance. *Front Microbiol.* 2012;9;3:119. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00119>
71. Guerin E, Cambray G, Sanchez-Alberola N, Campoy S, Erill I, Da Re S et al. The SOS response controls integron recombination. *Science.* 2009;324(5930):1034. <https://doi.org/10.1126/science.1172914>
72. Hocquet D, Llanes C, Thouverez M, Kulasekara HD, Bertrand X, Plésiat P et al. Evidence for induction of integron-based antibiotic resistance by the SOS response in a clinical setting. *PLoS Pathog.* 2012;8(6):e1002778. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002778>
73. Wellington EM, Boxall AB, Cross P, Feil EJ, Gaze WH, Hawkey PM et al. The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in gram-negative bacteria. *Lancet Infect Dis.* 2013;13(2):155-65. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(12\)70317-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(12)70317-1)

Conflito de Interesse

Os autores informam não haver qualquer potencial conflito de interesse com pares e instituições, políticos ou financeiros deste estudo.



Esta publicação está sob a licença Creative Commons Atribuição 3.0 não Adaptada. Para ver uma cópia desta licença, visite http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.pt_BR.

Journal of Water and Health

Virulence determinants in genetically heterogeneous populations of *Aeromonads* recovered from urban lagoon --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	JWH-D-18-00288R1
Full Title:	Virulence determinants in genetically heterogeneous populations of <i>Aeromonads</i> recovered from urban lagoon
Article Type:	Research Paper
Corresponding Author:	Maysa Mandetta Clementino, Ph.D Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde INCQS/FIOCRUZ Rio de Janeiro, Rio de Janeiro BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde INCQS/FIOCRUZ
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Mariana de Melo Rodrigues Sobral
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Mariana de Melo Rodrigues Sobral Camila Barreto Kayo Bianco Samara Sant Anna de Oliveira Maysa Mandetta Clementino, Ph.D
Order of Authors Secondary Information:	
Abstract:	<p>The diversity and distribution of <i>Aeromonas</i> spp. associated with virulence profiles from Rodrigo de Freitas Lagoon were investigated using phylogenetic analysis of <i>gyrB/rpoB</i> gene sequences for speciation. The concatenated <i>gyrB/rpoB</i> gene sequences clustered into five species, <i>Aeromonas punctata/caviae</i> (n=37), <i>A. hydrophila</i> (n=10), <i>A. dhakensis</i> (n=16), <i>A. jandaei</i> (n=1) and <i>A. enteropelogenes/trota</i> (n=3). The virulence genes (<i>atc/aerA/hlyA/asp/amp</i>) resulted in 19 virulence profiles, distributed heterogeneously among the five <i>Aeromonas</i> species. Out of the 67 isolates, 16% presented five distinct profiles carrying 4 virulence genes and 7% showed all genes investigated. The hemolytic genes were detected as follows: <i>act</i> 54% (37/67), <i>aerA</i> 36% (24/67), <i>hlyA</i> 26% (18/67) and proteolytic genes <i>asp</i> 36% (24/57) and <i>amp</i> in 85% (57/67) widely distributed in lagoon sampling stations. Meanwhile, 88% (59/67) and 92% (62/67) of the isolates showed hemolytic and proteolytic activity, respectively. Our results demonstrated that concatenated sequences of the <i>gyrB</i> and <i>rpoB</i> genes showed to be an adequate approach for the <i>Aeromonas</i> speciation and prevalence. The high heterogeneity of virulence genes among the species resulted in several virulence profiles, as well as high percentages of hemolytic and proteolytic activity, demonstrating the necessity of further epidemiological surveys of <i>Aeromonas</i> species pathogenicity in an aquatic recreational lagoon.</p>

1 **Virulence determinants in genetically heterogeneous populations of *Aeromonads***
2 **recovered from urban lagoon**

3 Short title: *Aeromonads* diversity and virulence profiles recovered from lagoon water

4 Authors: Mariana de Melo Rodrigues Sobral, Camila Barreto, Kayo Bianco, Samara Sant'Anna
5 de Oliveira and Maysa Mandetta Clementino

6 Affiliation: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde INCQS/FIOCRUZ, Rio de
7 Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

8 Keywords: *Aeromonas* species, taxonomic analysis, virulence profiles, water quality.

9 Corresponding author: Maysa Mandetta Clementino, Ph.D., Instituto Nacional de Controle de
10 Qualidade em Saúde INCQS/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

11 Email: maysa.mandetta@incqs.fiocruz.br, Phone: +55(21) 3865-5296

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Abstract

The diversity and distribution of *Aeromonas* spp. associated with virulence profiles from Rodrigo de Freitas Lagoon were investigated using phylogenetic analysis of *gyrB/rpoB* gene sequences for speciation. The concatenated *gyrB/rpoB* gene sequences clustered into five species, *Aeromonas punctata/caviae* (n=37), *A. hydrophila* (n=10), *A. dhakensis* (n=16), *A. jandaei* (n=1) and *A. enteropelogenes/trota* (n=3). The virulence genes (*atc/aerA/hlyA/asp/amp*) resulted in 19 virulence profiles, distributed heterogeneously among the five *Aeromonas* species. Out of the 67 isolates, 16% presented five distinct profiles carrying 4 virulence genes and 7% showed all genes investigated. The hemolytic genes were detected as follows: *act* 54% (37/67), *aerA* 36% (24/67), *hlyA* 26% (18/67) and proteolytic genes *asp* 36% (24/67) and *amp* in 85% (57/67) widely distributed in lagoon sampling stations. Meanwhile, 88% (59/67) and 92% (62/67) of the isolates showed hemolytic and proteolytic activity, respectively. Our results demonstrated that concatenated sequences of the *gyrB* and *rpoB* genes showed to be an adequate approach for the *Aeromonas* speciation and prevalence. The high heterogeneity of virulence genes among the species resulted in several virulence profiles, as well as high percentages of hemolytic and proteolytic activity, demonstrating the necessity of further epidemiological surveys of *Aeromonas* species pathogenicity in an aquatic recreational lagoon.

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57 1 Introduction

58 *Aeromonas* species are Gram-negative facultative anaerobic bacilli and are ubiquitous in
59 aquatic environments, such as freshwater, coastal waters, drinking water, wastewater,
60 estuaries, marine waters and even chlorinated drinking water (Piotrowska and Popowska
61 2014). This genus is composed of 31 species and 12 subspecies considered opportunistic
62 pathogens. *Aeromonas hydrophila*, *A. caviae*, and *A. veronii* biovar *sobria* strains are important
63 human pathogens that could be involved in gastroenteritis, respiratory and genitourinary
64 problems, wounds, eye, skin and soft tissue infections, sepsis, and meningitis (Piotrowska and
65 Popowska 2015). Besides, *Aeromonas* spp. are included in the group of emerging pathogens
66 due to their increasingly frequent presence in local and systemic infections of immunologically
67 competent hosts (Seshadri et al. 2006; Igbinosa and Okoh 2013).

68 The taxonomy of *Aeromonas* spp. is complex. For this reason, conventional phenotypic
69 tests do not necessarily correspond to results achieved by genetic methods, and this is
70 especially evident in environmental isolates (Puthuchery et al. 2012). In addition, the
71 16S rRNA gene proved to be an unsuccessful phylogenetic marker
72 for *Aeromonas* species identification due to their low taxonomic resolution (Nagar et al. 2013).
73 Therefore, sequencing of the housekeeping genes *gyrB* and *rpoB* has been used as a suitable
74 means for the identification and phylogenetic analysis of *Aeromonas* spp. (Soler et al. 2004;
75 Küpfer et al. 2006; Persson et al. 2015).

76 *Aeromonas* spp. can express several virulence factors, such as enterotoxins, hemolysins,
77 proteases, lipases, adhesins, hydrolases, surface proteins, flagellum and pilus. In this way, an
78 infection caused by *Aeromonas* spp. can be multifactorial and multifaceted (Rasmussen-Ivey et
79 al. 2016; Igbinosa et al. 2017). It may include expression or secretion of a number of different
80 virulent determinants acting collectively or independently. The *ascF* determinant, which
81 expresses type III secretion as well as the flagellin gene (*fla*), also plays a significant role
82 in *Aeromonas* spp. pathogenicity (Körkoca et al. 2014). Also, the ability of *Aeromonas* species
83 to acquire novel virulence and antimicrobial resistance genes has been increasing the spread of
84 virulence genes and resistance determinants that are another issue of significant public health
85 concern (Scoaris et al. 2008; Moura et al. 2012).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

86 The *hlyA*, *aerA* and *act* genes are the most prevalent genes expressing the production of
87 hemolytic toxins in *Aeromonas* spp. Aerolysin encoded by the *aerA* gene is an important
88 determinant of virulence that confers high invasiveness as epithelial cells and gastroenteritis
89 (Körkoca et al. 2014; Soltan-Dallal et al. 2016). The presence of these determinants of
90 hemolytic virulence may be indicative of a clinical condition related to diarrhea (Igbinosa et al.
91 2017).

92 Combined with the virulence hemolytic factors, extracellular proteases produced
93 by *Aeromonas* spp. play an important role in the invasion and
94 establishing the infection (Kobayashi et al. 2017). The serine protease (ASP) produced by
95 *Aeromonas* species is a member of the kexin subfamily of serine proteases. It induces the
96 destruction of proteins structure, compromising essentials functions for host defense (Takahashi
97 et al. 2014; Kobayashi et al. 2017).

98 The ASP is considered a powerful virulence factor that participates in the
99 pathogenesis causing edema and septic shock (Imamura et al. 2017). In contrast, the
100 metalloprotease (AMP) produced by *Aeromonas* spp. is shown to be involved in elastin
101 degradation, an insoluble protein constituent. Metalloproteases are enzymes that require a
102 divalent metal ion for their activity. In addition to the elastolytic action, AMP presents a
103 hydrolytic action to casein (Takahashi et al. 2013; Takahashi et al. 2014).

104 The distribution of *Aeromonas* in aquatic environments makes emerging reservoirs in the
105 environment of interest to public health due to their ability to contribute to
106 the spreading of virulence and antimicrobial resistance determinants (Piotrowska et al. 2017;
107 Igbinosa et al. 2017). Additionally, *Aeromonas* species can adhere to biotic or abiotic surfaces
108 forming biofilms (Dias et al. 2018). These microorganisms have developed regulatory
109 mechanisms for the formation of biofilms that are also associated with the production of
110 virulence factors and offer advantages in microbial resistance (Rasmussen-Ivey et al. 2016).

111 Rodrigo de Freitas lagoon is an urban lagoon designed to protect aquatic
112 communities, the natural landscape, artisanal fishing and recreational activities such as rowing,
113 sailing and water skiing. For decades, this lagoon has suffered several environmental impacts,
114 mainly due to anthropogenic activities (Crespo and La Rovere 2002; Gonzalez et al. 2010). The
115 constant expansion of the population has had negative impacts on the aquatic

116 ecosystems mainly due to the disposal of domestic and chemical residues such as hormones
117 and antibiotics widely used in human and veterinary clinics (Brioso et al. 2010; Nascimento et
118 al. 2017). Consequently, this has severely compromised these environments and
119 may thus expose animals and humans to pathogenic microorganisms (Staggemeier et al.
120 2017).

121 The main objective of this study was to investigate the distribution of *Aeromonas* species
122 and the prevalence of virulence genotypes of the isolates from Rodrigo de Freitas Lagoon, Rio
123 de Janeiro, Brazil.

124 **2 Material and methods**

125 **2.1 Studied area and sample collection**

126 Rodrigo de Freitas Lagoon is located in the South region of Rio de Janeiro
127 (22°57'02"S; 043°11'09"W) and had its origin in the drowning of old fluvial basins generated by
128 transgressive–regressive variations of sea level that occurred in the past 6,000 years along Rio
129 de Janeiro State coast. It possesses a water surface area of 2.2 km², an
130 average depth of 2.8 m, a perimeter of 7.8 km and an approximate water volume of 6,200,000
131 m³. Two collections were carried out on March 11, 2015 and March 8, 2016, both during the
132 morning hours, from the six collection points (Figure 1). Sampling (1.0 L) was done in triplicate
133 at a depth of approximately 15 to 20 cm below the surface in a sterile polyethylene bottle. All
134 samples were stored on ice and conducted to the laboratory within four hours. The
135 physicochemical parameters such as temperature, pH, conductivity, dissolved oxygen (DO),
136 turbidity and salinity of the samples were analyzed through Water Quality Checker U-10
137 (HORIBA). The enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* was carried out by the
138 defined substrate method (Colilert, IDEXX). The three liters of each collection point were
139 concentrated through filtration on cellulose membranes of 0.22 µm porosity (Millipore) for the
140 *Aeromonas* spp. analyses. In the event of filter clogging, additional filters have been added.



Figure 1 - Geographical location of the Rodrigo de Freitas lagoon (22°57'22"S / 43°11'09"W) in the state of Rio de Janeiro.

2.2 *Aeromonas* spp. identification

The cellulose membranes were inoculated in Alkaline Peptone Water broth (APW; Oxoid) and incubated at 37°C for 24 h. The culture growth was seeded on *Aeromonas* isolation agar (AIA; Sigma-Aldrich) medium at 30 ± 2°C for 24h. Approximately four colonies per sample with typical *Aeromonas* morphology (green colonies with dark end centers) were inoculated in tryptone soy agar (TSA; Sigma-Aldrich) and incubated at 30 ± 2°C for 24 h for further identification. Bacterial strains were morphologically identified using Gram-staining reaction and standard biochemical tests including sulfide-indole motility (SIM), lysine iron agar (LIA), catalase and cytochrome oxidase activity, according to Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Martin-Carnahan & Joseph 2005). Genomic DNA of the isolates was obtained through the Dneasy Tissue Kit (Qiagen GmgH, Hildeithalln, Germany) according to the manufacturer's instructions. PCR targeting a specific region of 16S rRNA gene was carried out to confirm the suggestive *Aeromonas* spp. isolates using the reaction conditions and primers (AERF: 5'-CTACTTTTGCCGGCGAGCGG-3'and AERR: 5'-TGATTCCCGAAGGCACTCCC-3') according to Lee et al. (2002).

2.3 Hemolytic and proteolytic activities

Hemolytic and proteolytic activities were evaluated according to Takahashi et al. (2014). Briefly, the cultures were spread-plating on nutrient agar plates containing 5% sheep blood and incubated at 37°C for 48 hours, and the presence of clear zones around bacterial cultures

163 indicates hemolytic activity. For proteolytic activity, the cultures were lawn-seeded onto nutrient
164 agar with 1% skim milk at 37°C for 24 hours and the clear zones around bacterial cultures
165 indicate proteolytic activity. Known protease and hemolysin-positive strain *A. hydrophila* ATCC
166 7966, as well as negative strain *Escherichia coli* ATCC 25922, were included as controls. The
167 reproducibility of the data for all isolates was demonstrated in triplicate.

168 **2.4 ERIC typing and *gyrB*/*rpoB* taxonomic analysis**

169 The genotypic analysis of the strains was investigated by amplification of
170 the Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus sequence (ERIC-PCR). The ERIC2 primer
171 was used for amplification and the conditions used were described previously (Versalovic et al.
172 1991). The amplicons were analysed by electrophoresis for 2 hours at 50V in 2% (v / v) agarose
173 gel in 1X TAE buffer (40 mmol L⁻¹ Tris base, 20 mmol L⁻¹, 1 mmol L⁻¹ sodium acetate, EDTA
174 pH 8.0) and standard molecular weight 100 bp DNA standard (Invitrogen Co., Carlsbad, CA,
175 USA). The gel was photographed and analysed using ImageQuant300 (GE, Opssala, Sweden).
176 Fingerprint patterns were analysed using the BIONUMERICS ver. 6.6 (Applied Maths, Kortrijk,
177 Belgium) using the Dice coefficient and unweighted pair group method with arithmetic mean pair
178 group method with arithmetic average. Isolates with 100% level of similarity were considered
179 clonally related. Subsequently, the *Aeromonas* isolates gDNA, were submitted to PCR
180 of *gyrB* gene (*gyrB*-F2: 5'-GAGGACTACAGCAAGAAGGCCA-3' and *gyrB*-R2: 5'-
181 GACTTGGCCTTCTTGCTGTAGTC-3') and *rpoB* gene (*rpoB*-F2: 5'-
182 CAACTTCGTCCGGTGATCACA-3' and *rpoB*-R2: 5'-TGTGATCACCGACGAAGTGG-3') (Persson
183 et al. 2015), resulting in fragments of 650 bp and 560 bp, respectively. The PCR mixture was
184 1X MasterMix PCR (Promega Corporation); 15pmol of each primer; approximately 20 ng
185 template DNA. The reactions were performed in Mastercycler® EP (Eppendorf) thermocycler
186 and using 94°C for 5 minutes; 30 cycles at 94°C for 40 seconds, 67°C and 65°C for 50 seconds,
187 respectively, and 72°C for 40 seconds; and 72°C for 5 minutes. The PCR product was analyzed
188 on electrophoresis gel for 1 hour at 50V on 1% (v/v) agarose gel without 1X TAE (40 mmol L⁻¹
189 Tris base, 20 mmol L⁻¹ sodium acetate, 1 mmol L⁻¹ EDTA, pH 8.0) buffer and 100 bp DNA
190 ladder as molecular weight standard (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA). The gel was
191 photographed and analyzed using the ImageQuant 300 (GE). Sequencing reactions
192 of *gyrB* and *rpoB* fragments were performed using the Big Dye Terminator kit by capillary

193 electrophoresis on ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City CA,
194 USA). Phred score sequences greater than or equal to 20 were included in the subsequent
195 analyses. The sequence similarity analysis was performed by the BLASTn software
196 at GenBank.

197 **2.5 Phylogenetic analysis**

198 The *Aeromonas* spp. isolates were initially screened by ERIC-PCR to check the
199 individuality of lineages and to determine the clonal variation among them. Subsequently,
200 concatenated *gyrB* and *rpoB* genes (1008 bp) were aligned by ClustalW of MEGA 7
201 software (Kumar et al. 2016). The phylogenetic tree was carried out by the neighbor-joining
202 algorithm (Saitou and Nei, 1987) based on distance calculated by Kimura-2 method (Kimura,
203 1980). Bootstrap analysis, with 1000 replications, provided confidence estimates for tree
204 topologies.

205 **2.6 Detection of virulence genes**

206 The virulence genes were screened by PCR using primers and reaction conditions listed
207 in Table 2. PCR analysis was carried out in 25 µl amplification reaction mixtures containing 1X
208 PCR MasterMix (PromegaCorporation), 15 pmol of each primer and about 20 ng of DNA
209 template. The cycling conditions consisted of an initial step of 95°C for 5 min and 30 cycles of
210 amplification at 95°C for 30 secs, an annealing temperature specific for each primer set (Table
211 1) for 30 secs, 72°C for 1 min and a final elongation at 72°C for 6 min. The reference
212 strain *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966 and *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 were used
213 as positive and negative PCR control, respectively. PCR products were loaded onto a 1%
214 agarose gel and were separated by electrophoresis at 50V for 1 hour in 1X TAE buffer with a
215 100 bp DNA ladder as molecular weight standard (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA). The
216 gels analyses were done as described above.

217 [Table 1 near here]

218

219

220

221

222 3 Results

223 3.1 Physicochemical and microbiological parameters

224 In both collections, the pH values varied between 7.36 and 8.20 among the six points.
225 The turbidity presented a higher elevation at the LRF 1 point and a lower one at LRF 6 and
226 levels of dissolved oxygen (OD) varied between 4.41 and 6.70 mg/L. The temperature remained
227 between 21.5°C and 27.4°C, and the salinity showed values between 0.9% and 1.32%. The
228 total coliform and *E. coli* counts presented values above the limits of Brazilian water quality
229 guidelines (<2500 MPN / 100 mL) (Table 2).
230 [Table 2 near here]

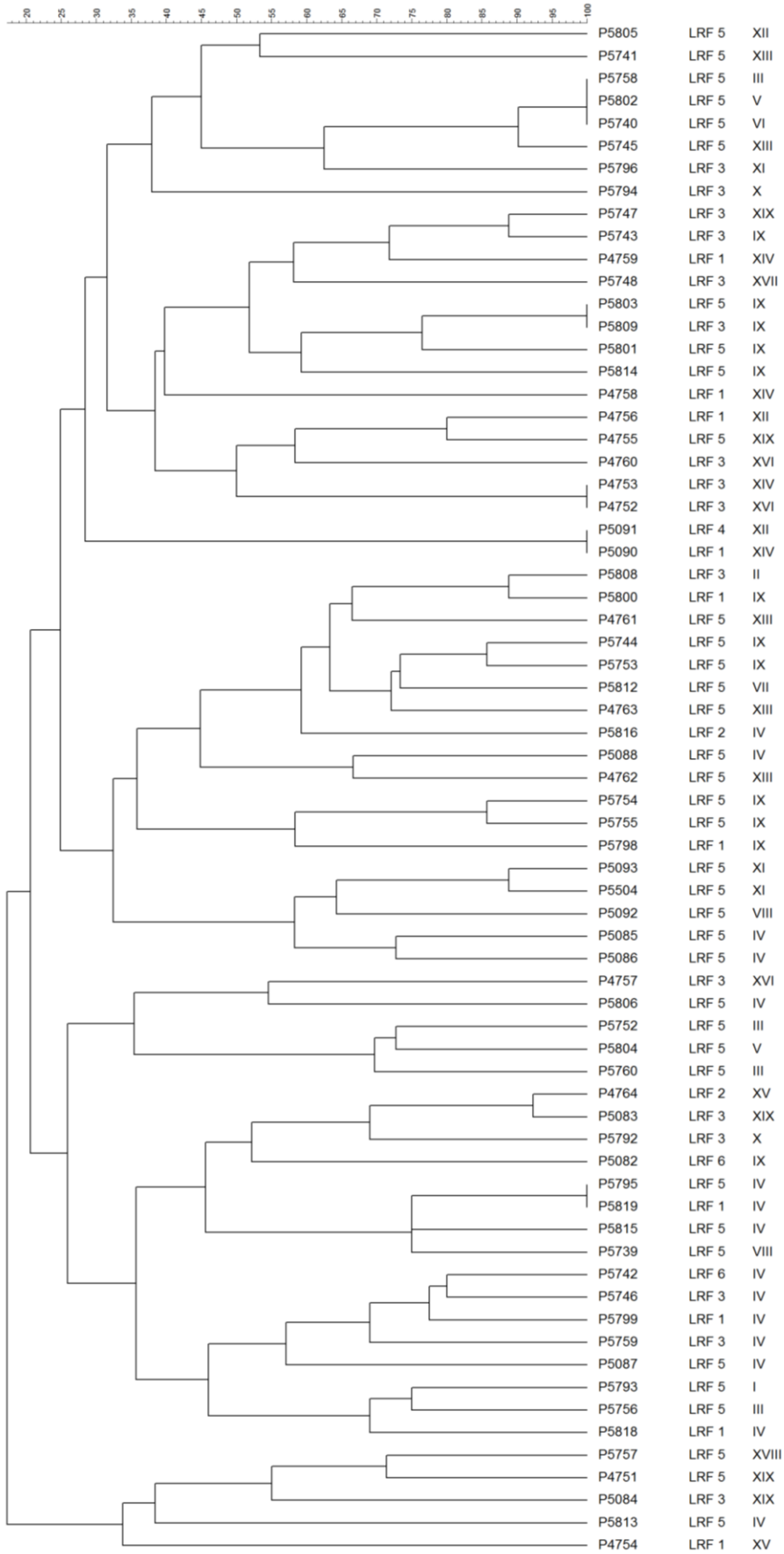
231 3.2 Identification of *Aeromonas* spp.

232 A total of 154 possible *Aeromonas* colonies, based on morphological characters in AIA
233 medium, were isolated from six water samples from the Rodrigo de Freitas lagoon, Rio de
234 Janeiro, Brazil. The conventional biochemical tests showed 56% (87/154) of isolates Gram-
235 negative rod-shaped and facultative, oxidase, catalase, lysine decarboxylase and
236 indole positive, all suggestive of *Aeromonas* genus. Out of the 87 isolates, 88% (77/87) were
237 motile and 47% (41/87) produced H₂S. Subsequently, the confirmation of
238 putative *Aeromonas* spp. by 16S rRNA-PCR showed a single fragment of approximately
239 954 bp in 87% (76/87) of the isolates, also revealed in the reference strain *A. hydrophila* ATCC
240 7966, used as a positive control of the reaction.

241 3.3 ERIC-PCR of isolates

242 ERIC-PCR profiles of the 76 isolates revealed five clusters with 20 strains at the 100%
243 level of similarity. The strains within each group with identical fingerprints obtained at the same
244 point and with the same virulence profile were considered belonging to the same clone and
245 were excluded from the phylogenetic analysis (9/76). Out of the 11 isolates, four (P5803,
246 P5809, P5795 and P5819) from different collection sites but with the same virulence profile
247 were maintained. In addition, five other isolates (P5758, P5802, P5740, P4753 and P4752) from
248 the same point and two others (P5091 and P5090) from different sites, presenting close ERIC
249 types, however, different virulence profiles, were also kept in the analyze (Figure 2).

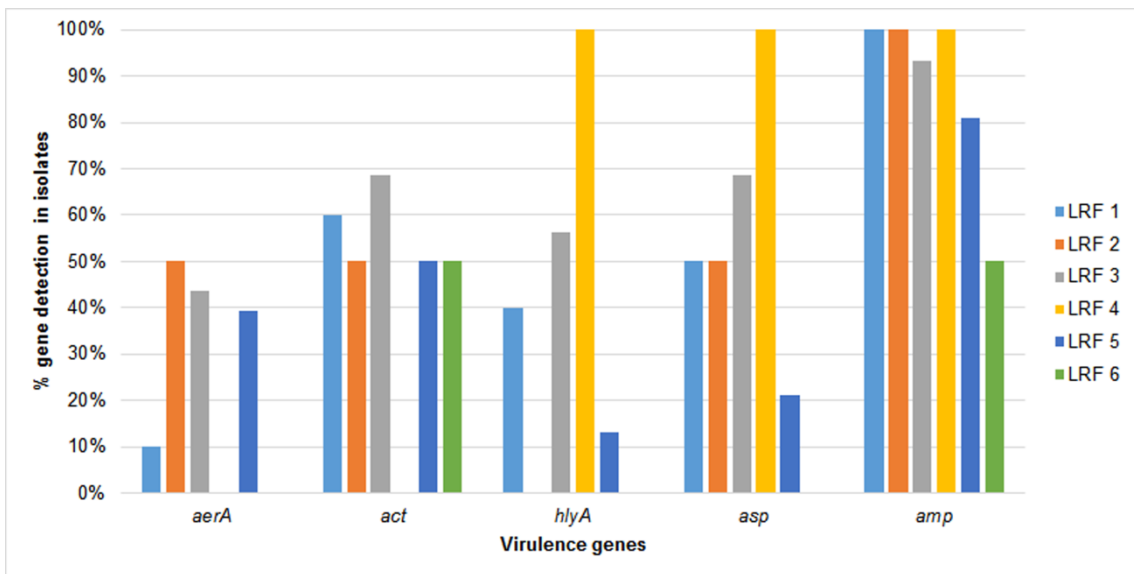
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65



251 **Figure 2** - Dendrogram showing genetic relationships among 67 *Aeromonas* species based on
 252 one ERIC primer. Cluster analysis was performed by the UPGMA method on a Jaccard's
 253 similarity matrix.

254 **3.4 Detection of virulence genes**

255 Among the 67 (100%) isolates, the occurrence of the hemolytic genes demonstrated the
 256 presence of *act* gene 55% (37/67), *aerA* gene 36% (24/67) and *hlyA* 26% (18/67). According to
 257 the distribution of the virulence genes, *aerA* gene succeeds in isolates from four of the five
 258 points examined (LRF 1, 2, 3 and 5) as well as the *hlyA* gene (LRF 1, 3, 4 and 5). The *act* gene
 259 appeared in isolates from five points examined. The proteolytic *asp* gene occurred in 36%
 260 (24/67) of isolates from LRF 1, 2, 3, 4, 5 and *amp* gene in 85% (57/67) from all six
 261 points. Seven per cent (5/67) of isolates presented all five genes and 1% (1/67) did not
 262 reveal either of them (Figure 3).



263
 264 **Figure 3** - Prevalence of virulence genes according to collection points.

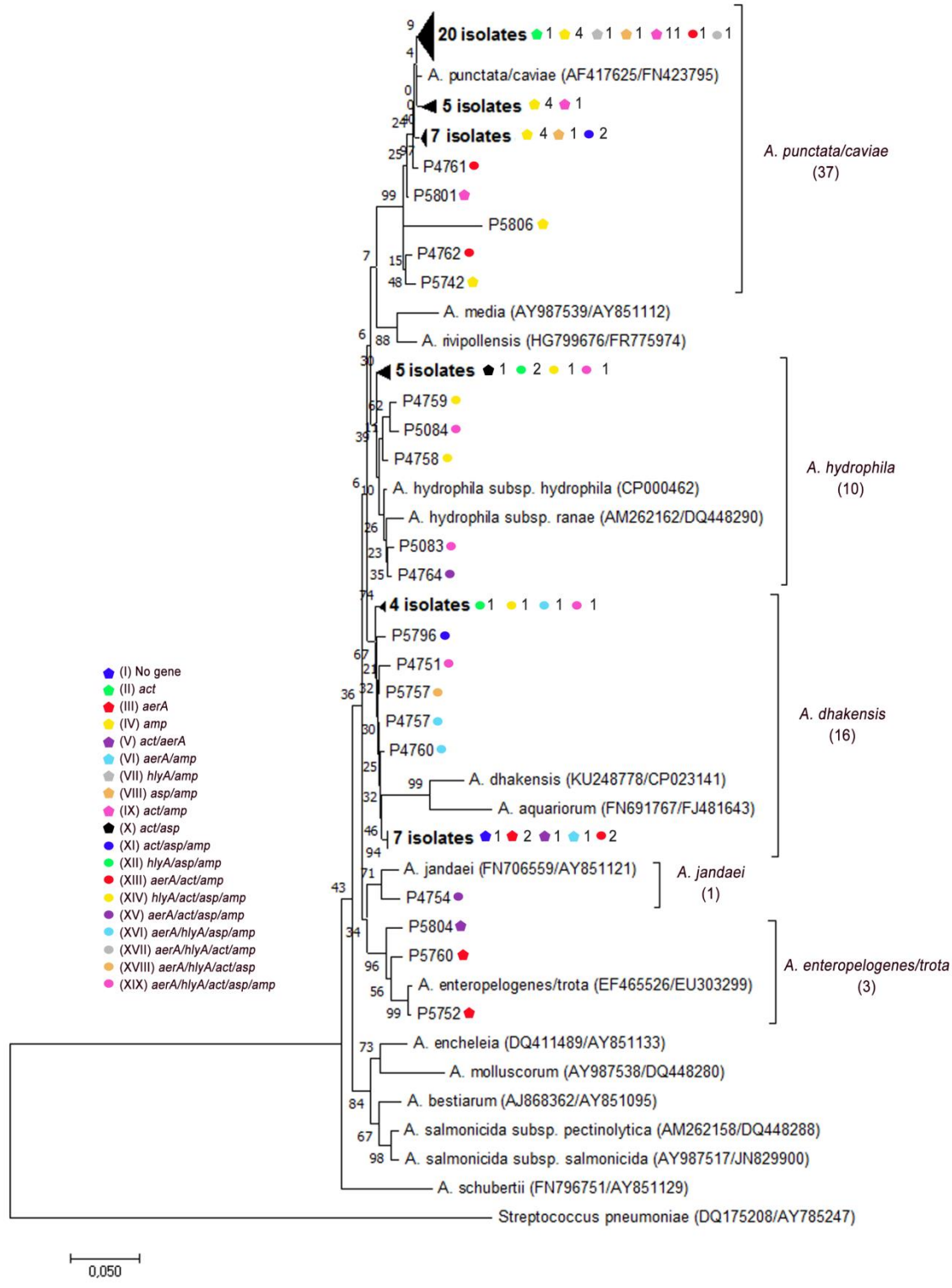
265 **3.5 Phylogenetic analysis associated with virulence profiles**

266 The concatenated *gyrB/rpoB* gene sequences clustered into five different species
 267 (*A. punctata/caviae*
 268 (n=37), *A. hydrophila* (n=10), *A. dhakensis* (n=16), *A. jandaei* (n=1), *A. enteropelogenes/trota* (n
 269 =3)). The sequences were assigned to any species if the best matching reference
 270 sequence available in the database showed $\geq 97\%$ homology. The virulence genes (*atc*,
 271 *aerA*, *hlyA*, *asp* and *amp*) resulted in 19 profiles with heterogeneous distribution among the

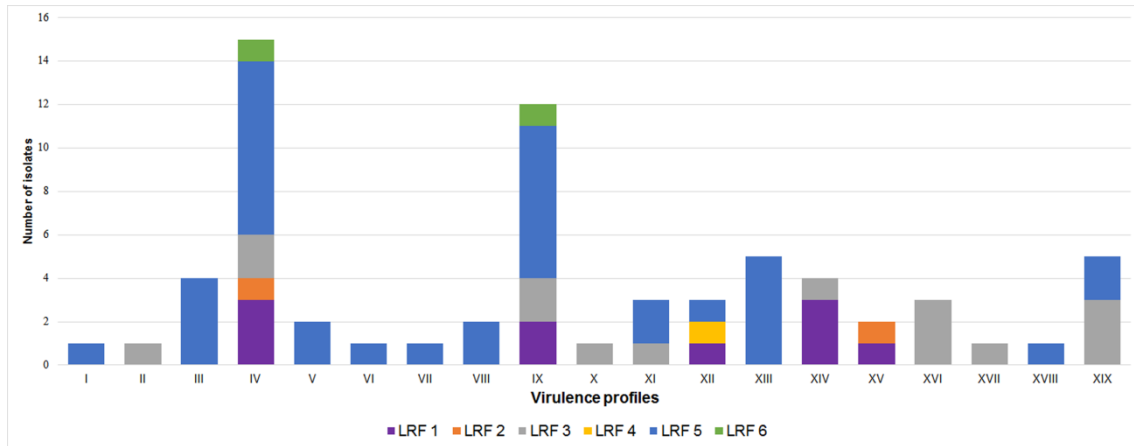
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

272 isolates. The profile IV (*amp*) was the most prevalent among the isolates 22% (15/67) followed
273 by profile IX (*act/amp*) 18% (12/67) were present only in *A. punctata/caviae* strains from LRF1
274 (n=5), LRF 2 (n=1), LRF 3 (n= 4), LRF 5 (n=15), LRF 6 (n=2). The profiles XIX
275 (*aerA/hlya/act/asp/amp*), XIII (*aerA/act/amp*), XIV (*hlyA/act/asp/amp*) and III (*aerA*) from points
276 LRF 5, LRF 3 and LRF 1, showed distributed among the four species (Figure
277 4). *A. hydrophila* presented five profiles, being that 33% (3/10) of the strains exhibited the profile
278 XIX (*aerA/hlya/act/asp/amp*), followed by profiles XIV (*hlya/act/asp/amp*), XII (*act/asp/amp*),
279 XV(*hlya/asp/amp*) and X (*act/asp*) from points LRF1, LRF 2, LRF 3, LRF 4 and LRF
280 5. *A. dhakensis* also showed a great diversity of virulence profiles (XIX, XVIII, XVI, XIV, XIII, XII,
281 XI, VI, V, III, I) from different collection points. It is noteworthy that strains containing profiles XIX
282 and I were isolated from the LRF 5. The three strains of *A. enteropelogenes/trota* presented
283 profiles V (*act/aerA*) and III (*aerA*) and both of them from LRF 5. A unique strain
284 of *A. jandaei* belonging to profile XV was isolated from LRF 1 (Figures 4 and 5).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65



285
286 **Figure 4** - Neighbor-joining tree constructed from concatenated partial *gyrB-rpoB* (1008 bp)
287 sequences obtained from environmental *Aeromonas* spp. from Rodrigo de Freitas Lagoon,
288 compared to reference sequences obtained from GenBank. The colorful points indicated the
289 virulence profiles. Numbers at the nodes indicate bootstrap values as the percentage of 1,000
290 replicates. The scale bar indicates 5% sequence divergence.



291

292 **Figure 5** - Distribution of virulence profiles according to collection points. **(I)** no gene; **(II)** *act*;
 293 **(III)** *aerA*; **(IV)** *amp*; **(V)** *act/aerA*; **(VI)** *aerA/amp*; **(VII)** *hlyA/amp*; **(VIII)** *asp/amp*; **(IX)** *act/amp*;
 294 **(X)** *act/asp*; **(XI)** *act/asp/amp*; **(XII)** *hlyA/asp/amp*; **(XIII)** *aerA/act/amp*; **(XIV)** *hlyA/act/asp/amp*;
 295 **(XV)** *aerA/act/asp/amp*; **(XVI)** *aerA/hlyA/asp/amp*; **(XVII)** *aerA/hlyA/act/amp*; **(XVIII)**
 296 *aerA/hlyA/act/asp*; **(XIX)** *aerA/hlyA/act/asp/amp*.

297 3.6 Hemolytic and proteolytic activities

298 The hemolytic and proteolytic activities presented heterogeneous results among the
 299 five *Aeromonas* species identified (Table 3). Eighty-eight percent (59/67) of isolates
 300 had hemolytic activity. Of these 59, 83% (49/59) exhibited at least 1 of the 3 hemolytic genes
 301 studied and 17% (10/59) did not reveal the investigated genes. The remaining 12% (8/67) had
 302 neither hemolytic activity nor any of the 3 genes studied (*A. punctata/caviae* (n=7);
 303 *A. dhakensis* (n=1)). Ninety-three percent (62/67) of isolates showed proteolytic activity. Ninety-
 304 two percent (62/67) revealed at least 1 of the 2 genes investigated and 7% (5/67) did not
 305 present any genes. Of the five remaining isolates that did not present proteolytic activity, 80%
 306 (4/5) did not present any of the two proteolytic
 307 genes (*A. dhakensis* (n=2); *A. enteropelogenes/trota* (n=2)) and 20% (1/5) exhibited the two
 308 genes studied (*A. hydrophila*).

309 [Table 3 near here]

310 4 Discussion

311 The wide distribution of *Aeromonas* species in aquatic environments indicates that their
 312 possible interactions with animals and humans are continuous and inevitable, allowing their
 313 opportunistic pathogenicity.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

314 In this paper, we demonstrated that the isolation by *Aeromonas* selective culture media,
315 as well as the phenotypically identification of *Aeromonas* spp., revealed limitations since, of the
316 154 initial isolates, only 76 were confirmed as belonging to this genus by PCR amplification of
317 the 16S rRNA gene. Conventional phenotypic tests do not necessarily correspond to the results
318 obtained by the molecular methodology, as already evidenced in *Aeromonas* spp. (Ørmen et al.
319 2005; Puthuchearry et al. 2012). Discrepancies in the identification of *Aeromonas* spp. resulting
320 from a poor correlation between phenotypic schemes and molecular approaches are well
321 documented in the literature (Kozinska, 2007; Beaz-Hidalgo et al. 2010).

322 The physical-chemical parameters analyzed showed small variations in temperature, pH,
323 OD and conductivity (Table 2). However, these variations do not alter the growth
324 of *Aeromonas* spp, considering that although the optimum growth temperature is around 28 °C,
325 they can multiply in more extreme temperatures between 5 °C and 41 °C (Popoff, 1984).
326 Additionally, studies have shown that the *Aeromonas* spp. prevalence was higher in the highest
327 water temperature, where the maximum count was 4.0 x 10⁵ CFU/g (gram) in sediment
328 samples (Seidler et al. 1980; Pathak et al. 1988). Another relevant data in our study related to
329 salinity, where its decrease during the second collection may be associated with the
330 intensification of freshwater inflow due to rainfall season. This issue may also be related to the
331 upsurge of *E. coli* levels in 5 of the 6 points investigated. In addition, the decrease in salinity
332 levels may also justify the growth of *Aeromonas* spp. from LRF 1, 3 and 5.

333 Also, the hemolytic activity occurred in 88% (59/67) of the isolates. Out of
334 these 59 isolates, 10 did not present any of the hemolytic genes investigated. The other 12%
335 (8/67) that did not show hemolytic activity were identified
336 as *A. punctata/caviae* and *A. dhakensis*. It is important to emphasize that negative PCR results
337 for both the hemolytic and proteolytic genes analyzed do not exclude pathogenicity, since at
338 least some strains of *Aeromonas* have a wide range of virulence factors not evaluated by
339 us that allow them to overcome host defenses and establish an infection. Hoel et al.
340 (2017) demonstrated the presence of β-hemolysis in 91% of their isolates and this result was
341 highly related to the species identified. Besides, not all *A. media* and *A. punctate/caviae* isolates
342 had hemolytic activities including the *A. punctata/caviae* reference strain.

343 In our study, the proteolytic virulence genes screened *asp* and *amp* were present in
1 344 87% (66/71) of 94% (71/76) isolates with proteolytic activity, respectively. This activity was
2
3 345 also shown in the majority of isolates of *A. hydrophila*, *A. veronii* bv *sobria*,
4
5 346 and *A. punctata/caviae* from patients hospitalized with acute gastroenteritis in Rio Grande
6
7 347 do Sul, Brazil (Guerra et al. 2007).
8
9

10 348 Our results revealed data not yet shown regarding the diversity of *Aeromonas* spp. in the
11 349 waters of the Rodrigo de Freitas lagoon, Rio de Janeiro, Brazil. The phylogenetic position of
12 350 concatenated sequences of *gyrB* and *rpoB* genes clustered the isolates with reference
13
14 351 sequences of the respective species. *Aeromonas punctata* (formally *A. caviae*) was prevalent
15 352 with 37 isolates (55%) followed by 10 isolates (15%) of *A. hydrophila*, 16 isolates (24%)
16
17 353 of *A. dhakensis*(formally *A. aquariorum*), 3 isolates (4%)
18 354 of *A. enteropelogenes* (formally *A. trota*) and 1 isolate (2%) of *A. jandaei* (Figure 3). As in our
19
20 355 study, the concatenated sequence of *rpoD/gyrB* genes increased the resolution and
21
22 356 allowed an unequivocal speciation of the isolates from aquarium water in Sri Lanka (Jagoda et
23
24 357 al. 2014).
25
26
27
28
29

30 358 Of the 31 recognized species of the genus *Aeromonas*, a subgroup of four species is
31 359 most frequently implicated in human infections and comprises the
32
33 360 species *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii* bv *sobria* and *A. dhakensis* (Janda and Abbott,
34
35 361 2010; Teunis & Figueras, 2016). *Aeromonas punctata/caviae* was also prevalent in studies in
36
37 362 Europe, the United States and India, followed by *A. hydrophila* and *A. veroni* bv *sobria* (Albert et
38
39 363 al. 2000; Sinha et al. 2004; Borchardt et al. 2009). These data are in agreement with a study in
40
41 364 Spain, where between 1989 and 1999, these three species were responsible for 90%
42
43 365 of *Aeromonas* associated with gastroenteritis (Velasco-Muñoz et al. 1999). It is important to
44
45 366 emphasize that our study revealed the prevalence of these same potentially pathogenic species
46
47 367 in the lagoon, which indicates a possibility of risks to human health.
48
49

50 368 Although our sampling points were distinct, the isolation of these five species from
51 369 all collection points suggests that they are widely spread in this lagoon. These data are worrying
52
53 370 since recently a study showed evidence suggestive of colonization and successful infection by
54
55 371 lineages *Aeromonas* genus in humans, transmitted by water (Khajanchi et al., 2010). Voss et al.
56
57 372 (1992) also found that 13 of 28 wound and soft tissue infections over a 4-year period were
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

373 associated with water-related injury and 43% of the total could be directly related to lakes or
374 river water.

375 In this study, the spreading of virulence genes into five species of *Aeromonas* genus
376 showed that 99% (66/67) of the isolates presented at least one of the genes studied, whereas
377 12% (5/67) including *A. hydrophila* and *A. dhakensis* presented all virulence
378 genes studied. A survey carried out in ornamental fish breeding sites showed results similar to
379 those presented here, where all isolates had heterogenous virulence profiles (3 to 7 virulence
380 genes) (Guerra et al. 2007). Studies of virulence genes have been used as a practical approach
381 to evaluate the genetic potential of *Aeromonas* spp. expressing virulence factors (Puthuchery
382 et al. 2012). Here, we demonstrated high heterogeneity of virulence factors among the five
383 species identified, which resulted in 19 virulence profiles. This diversity was
384 also demonstrated in different geographic regions such as Sri Lanka, China, United States and
385 Korea (Nawaz et al. 2010; Hu et al. 2012; Yi et al. 2013; Jagoda et al. 2014).

386 Due to the complex pathogenesis of species of *Aeromonas* genus, none of the factors
387 associated with virulence should be exclusively responsible for symptoms
388 or early infections (Albert et al. 2000). In our study, the heterogeneity of virulence profiles mainly
389 in *A. hydrophila*, *A. caviae* and *A. dhakensis* leads us to suggest the high pathogenicity of these
390 species in the lagoon waters. In fact, the presence of the *aerA*, *alt*, *act*, *eprCAI* and *ahp* genes
391 could be seen as an indicator of virulence in both clinical and environmental isolates (Sha et al.
392 2002; Wang et al. 2008).

393 **5 Conclusion**

394 In conclusion, our results revealed that *gyrB* and *rpoB* genes concatenated sequences
395 proved to be adequate approach for genetic identification of *Aeromonas* species as well as in
396 their prevalence in the urban lagoon. The heterogeneity in distribution of genes associated with
397 virulence among the species resulted in several profiles and high percentages of hemolytic and
398 proteolytic activity, indicating the pathogenic potential of these species.

399 Finally, our data suggest that the lagoon waters must fulfill high-quality requirements
400 aiming at the improvements of preventive actions regarding possible negative impacts on public
401 health. The occurrence of species frequently implicated in human infections and their high

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

402 probability of transmission in aquatic environments reinforce the relevance and continuity of this
403 investigation.

404 **6 Acknowledgment**

405 We gratefully acknowledge the Coordination for the Improvement of Higher Education
406 Personnel (CAPES) and Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz).

407 **7 Disclosure statement**

408 The authors declare that there is no conflict of interest.

409 **8 Funding**

410 This work was supported by the Foundation Carlos Chagas Filho Research Support of
411 the State of Rio de Janeiro (FAPERJ); under Grant number E-26/202.855/2015; National
412 Council for Scientific and Technological Development (CNPq); under Grant
413 number 426850/2016-5.

414 **9 References**

- 415 Albert M. J., Ansaruzzaman M., Talukder K. A., Chopra A. K., Kuhn I., Rahman M., Faruque A.
416 S., Islam M. S., Sack R. B. & Mollby R. 2000 Prevalence of enterotoxin genes in *Aeromonas*
417 spp. isolated from children with diarrhea, healthy controls, and the environment. *J Clin*
418 *Microbiol*, **38**(10), 3785-90.
- 419 Beaz-Hidalgo R., Alperi A., Buján N., Romalde J. L. & Figueras M. J. Comparison of
420 phenotypical and genetic identification of *Aeromonas* strains isolated from diseased fish. *Syst*
421 *Appl Microbiol*, **33**(3), 149-53. doi: 10.1016/j.syapm.2010.02.002.
- 422 Barba-Brioso C., Fernández-Caliani J. C., Miras A., Cornejo J. & Galán E. 2010 Multi-source
423 water pollution in a highly anthropized wetland system associated with the estuary of Huelva
424 (SW Spain). *Mar Pollut Bull*, **60**, 1259–69. doi: 10.1016/j.marpolbul.2010.03.018.
- 425 Crespo S. & La Rovere A. L. N. 2002 State of the Environment. [In: *Geo Cities Project:*
426 *Integrated Urban Environmental Report: GEO Report*, 65-112]. Rio de Janeiro, Partnership
427 Consortium 21, Brazil. Portuguese.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

428 Dias C., Borges A., Saavedra M. J. & Simões M. 2018 Biofilm formation and multidrug resistant
429 *Aeromonas* spp. from wild animals. J Glob Antimicrob Resist, **12**, 227-234. doi:
430 10.1016/j.jgar.2017.09.010.

431 Gonzalez A. M., Paranhos R. & Lutterbach M. S. 2010 Relationships between fecal indicators
432 and pathogenic microorganisms in a tropical lagoon in Rio de Janeiro, Brazil. Environ Monit
433 Assess, **164**, 207–219. doi: 10.1007/s10661-009-0886-9.

434 Guerra I. M. F., Fadanelli R., Figueiró M., Schreiner F., Delamare A. P. L., Wollheim C., Costa
435 S. O. P. & Echeverrigaray S. 2007 *Aeromonas* associated diarrhoeal disease in south Brazil:
436 prevalence, virulence factors and antimicrobial resistance. Brazilian Journal of Microbiology,
437 **38**(4), 638-643. doi: 10.1590/S1517-83822007000400011

438 Hoel S., Vadstein O. & Jakobsen A. N. 2017 Species Distribution and Prevalence of Putative
439 Virulence Factors in Mesophilic *Aeromonas* spp. Isolated from Fresh Retail Sushi. Front
440 Microbiol, **8**, Article 931. doi: 10.3389/fmicb.2017.00931.

441 Hu M., Wang N., Pan Z. H., Lu C. P. & Liu Y. J. 2012 Identity and virulence properties of
442 *Aeromonas* isolates from diseased fish, healthy controls and water environment in China. Lett
443 Appl Microbiol, **55**(3), 224-33. doi:10.1111/j.1472-765X.2012.03281.x.

444 Igbinosa I. H. & Okoh A. I. 2013 Detection and distribution of putative virulence associated
445 genes in *Aeromonas* species from freshwater and wastewater treatment plant. J Basic
446 Microbiol, **53**(11), 895-901. doi:10.1002/jobm.201200351.

447 Igbinosa I. H., Beshiru A., Odjadjare E. E., Ateba C. N. & Igbinosa E. O. 2017 Pathogenic
448 potentials of *Aeromonas* species isolated from aquaculture and abattoir environments. Microb
449 Pathog, **107**, 185-192. doi:10.1016/j.micpath.2017.03.037.

450 Imamura T., Murakami Y. & Nitta H. 2017 *Aeromonas sobria* serine protease (ASP): a subtilisin
451 family endopeptidase with multiple virulence activities. Biol Chem, **398**(10), 1055-1068. doi:
452 10.1515/hsz-2016-0344.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

453 Jagoda S. S., Wijewardana T. G., Arulkanthan A., Igarashi Y., Tan E., Kinoshita S., Watabe S.
454 & Asakawa S. 2014 Characterization and antimicrobial susceptibility of motile aeromonads
455 isolated from freshwater ornamental fish showing signs of septicaemia. Dis Aquat Organ,
456 **109**(2), 127-37. doi: 10.3354/dao02733.

457 Janda J. M. & Abbott S. L. 2010 The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection.
458 Clin Microbiol Rev, **23**(1), 35-73. doi: 10.3354/dao02733.

459 Kobayashi H., Otsubo T., Teraoka F., Ikeda K., Seike S., Takahashi E., Okamoto K., Yoshida
460 T., Tsuge H. & Yamanaka H. 2017 Involvement of the Arg566 residue of *Aeromonas sobria*
461 serine protease in substrate specificity. PLoS One, **12**(10), e0186392. doi:
462 10.1371/journal.pone.0186392.

463 Khajanchi B. K., Fadl A. A., Borchardt M. A., Berg R. L., Horneman A. J., Stemper M. E.,
464 Joseph S. W., Moyer N. P., Sha J. & Chopra A. K. 2010 Distribution of virulence factors and
465 molecular fingerprinting of *Aeromonas* species isolates from water and clinical samples:
466 suggestive evidence of water-to-human transmission. Appl Environ Microbiol, **76**(7), 2313-25.
467 doi: 10.1128/AEM.02535-09.

468 Khor W. C., Puah S. M., Tan J. A., Puthucheary S. D. & Chua K. H. 2015 Phenotypic and
469 genetic Diversity of *Aeromonas* Species Isolated from Fresh Water Lakes in Malaysia. PLoS
470 One, **10**(12), e0145933. doi: 10.1371/journal.pone.0145933.

471 Kimura M. 1980 A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through
472 comparative studies of nucleotide sequences. J Mol Evol, **16**(2), 11-20.

473 Korczak B., Christensen H., Emler S., Frey J., Kuhnert P. 2004 Phylogeny of the family
474 *Pasteurellaceae* based on *rpoB* sequences. Int J Syst Evol Microbiol, **54**(4), 1393-9.

475 Körkoca H., Alan Y., Bozari S., Berktaş M. & Goz Y. 2014 Detection of putative virulence genes
476 in *Aeromonas* isolates from humans and animals. J Infect Dev Ctries, **8**(11), 1398-406. doi:
477 10.3855/jidc.4879.

- 1
2
3
4
5 478 Kumar S., Stecher G. & Tamura K. 2016 MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis
6
7 479 Version 7.0 for Bigger Datasets. Mol Biol Evol, **33**(7), 1870-4. doi:10.1093/molbev/msw054.
8
9
10
11
12 480 K pfer M., Kuhnert P., Korczak B. M., Peduzzi R. & Demarta A. 2006 Genetic relationships of
13
14 481 *Aeromonas* strains inferred from 16S rRNA, *gyrB* and *rpoB* gene sequences. Int J Syst Evol
15
16 482 Microbiol, **56**(12), 2743-51.
17
18
19 483 Kozinska A. 2007 Dominant pathogenic species of motile aeromonads isolated from diseased
20
21 484 and healthy fish cultured in Poland. J Fish Dis, **30**(5), 293–301.
22
23
24
25 485 Lee C., Cho J. C., Lee S. H., Lee D. G. & Kim S. J. 2002 Distribution of *Aeromonas* spp. as
26
27 486 identified by 16S rDNA restriction fragment length polymorphism analysis in a trout farm. J Appl
28
29 487 Microbiol, **93**(6), 976-85.
30
31
32 488 Martin-Carnahan A. & Joseph, S. W. 2005 Genus I. *Aeromonas* Stanier 1943. In: GARRITY, G.
33
34 489 M. (Ed.). Bergey's manual of systematic bacteriology: the Proteobacteria: part b the
35
36 490 Gammaproteobacteria. New York: Springer-Verlag, pp. 213-218.
37
38
39
40 491 Nagar V., Shashidhar R. & Bandekar J. R. 2013 Characterization of *Aeromonas* strains isolated
41
42 492 from Indian foods using *rpoD* gene sequencing and whole cell protein analysis. World J
43
44 493 Microbiol Biotechnol, **29**(4), 745-52. doi:10.1007/s11274-012-1212-1.
45
46
47 494 Nawaz M., Khan S. A., Khan A. A., Sung K., Tran Q., Kerdahi K. & Steele R. 2010 Detection
48
49 495 and characterization of virulence genes and integrons in *Aeromonas veronii* isolated from
50
51 496 catfish. Food Microbio, **27**(3), 327-31. doi:10.1016/j.fm.2009.11.007.
52
53
54
55
56 497 Nascimento T., Cantamessa R., Melo L., Fernandes M. R., Fraga E., Dropa M., Sato M. I. Z.,
57
58 498 Cerdeira L. & Lincopan N. 2017 International high-risk clones of *Klebsiella pneumoniae* KPC-
59
60 499 2/CC258 and *Escherichia coli* CTX-M-15/CC10 in urban lake waters. Sci Total Environ, **598**,
61
62 500 910-915. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.03.207.
63
64
65 501  rmen  ., Granum P. E., Lassen J. & Figueras M. J. 2005 Lack of agreement between
502
503 502 biochemical and genetic identification of *Aeromonas* spp. APMIS, **113**(3), 203–207. doi:
10.1111/j.1600-0463.2005.apm1130308.x.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

504 Pathak S. P., Bhattacharjee J. W., Kalra N. & Chandra S. 1988 Seasonal distribution of
505 *Aeromonas hydrophila* in river water and isolation from river fish. J Appl Bacteriol, **65**(4), 347-
506 52.

507 Persson S., Al-Shuweli S., Yapici S., Jensen J. N. & Olsen K. E. 2015 Identification of clinical
508 *Aeromonas* species by *rpoB* and *gyrB* sequencing and development of a multiplex PCR method
509 for detection of *Aeromonas hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii*, and *A. media*. J Clin Microbiol,
510 **53**(2), 653-6. doi:10.1128/JCM.01963-14.

511 Piotrowska M. & Popowska M. 2014 The prevalence of antibiotic resistance genes among
512 *Aeromonas* species in aquatic environments. Ann Microbiol, **64**(3), 921–934.
513 doi:10.1007/s13213-014-0911-2

514 Piotrowska M. & Popowska M. 2015 Insight into the mobilome of *Aeromonas* strains. Front.
515 Microbiol, **6**, Article 494. doi: 10.3389/fmicb.2015.00494

516 Piotrowska M., Przygodzińska D., Matyjewicz K. & Popowska M. 2017 Occurrence and Variety
517 of β -Lactamase Genes among *Aeromonas* spp. Isolated from Urban Wastewater Treatment
518 Plant. Front Microbiol, **8**, 863. doi:10.3389/fmicb.2017.00863.

519 Popoff M. 1984 *Genus III. Aeromonas* Kluyver and Van Niel. In: DRIEG, Noel R. (Ed). Bergey's
520 Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore: Williams and Wilkins. 545-548.

521 Puthuchery S. D., Puah S. M. & Chua K. H. 2012 Molecular characterization of clinical isolates
522 of *Aeromonas* species from Malaysia. PLoS One, **7**(2), e30205.
523 doi:10.1371/journal.pone.0030205.

524 Rasmussen-Ivey C. R., Figueras M. J., McGarey D. & Liles M. R. 2016 Virulence Factors of
525 *Aeromonas hydrophila*: In the Wake of Reclassification. Front Microbiol, **7**, Article 1337. doi:
526 10.3389/fmicb.2016.01337.

527 Saitou N. & Nei M. 1987 The neighbor-joining method: a new method for reconstructing
528 phylogenetic trees. Mol Biol Evol, **4**(4), 406-25.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

529 Seidler R. J., Allen D. A., Lockman H., Colwell R. R., Joseph S. W. & Daily O. P. 1980 Isolation,
530 enumeration, and characterization of *Aeromonas* from polluted waters encountered in diving
531 operations. *Appl Environ Microbiol*, **39**(5), 1010-8.

532 Seshadri R., Joseph S. W., Chopra A. K., Sha J., Shaw J., Graf J., Haft D., Wu M., Ren Q.,
533 Rosovitz M. J., Madupu R., Tallon L., Kim M., Jin S., Vuong H., Stine O. C., Ali A., Horneman A.
534 J. & Heidelberg J. F. 2006 Genome sequence of *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966T: jack of
535 all trades. *J Bacteriol*, **188**(23), 8272-82.

536 Sha J., Kozlova E. V. & Chopra A. K. 2002 Role of various enterotoxins in *Aeromonas*
537 *hydrophila*-induced gastroenteritis: generation of enterotoxin gene deficient mutants and
538 evaluation of their enterotoxic activity. *Infect Immun*, **70**(4), 1924-35.

539 Sinha S., Shimada T., Ramamurthy T., Bhattacharya S. K., Yamasaki S., Takeda Y., Nair G. B.
540 2004 Prevalence, serotype distribution, antibiotic susceptibility and genetic profiles of
541 mesophilic *Aeromonas* species isolated from hospitalized diarrheal cases in Kolkata, India. *J*
542 *Med Microbiol*, **53**(6), 527-34.

543 Soler L., Yáñez M. A., Chacon M. R., Aguilera-Arreola M. G., Catalán V., Figueras M. J. &
544 Martínez-Murcia A. J. 2004 Phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas* based on two
545 housekeeping genes. *Int J Syst Evol Microbiol*, **54**(5), 1511-9.

546 Soltan-Dallal M. M., Mazaheri N. F. R., Kavan T. M., Aghaiyan L. & Salehipour Z. 2016
547 Prevalence, virulence and antimicrobial resistance patterns of *Aeromonas* spp. isolated from
548 children with diarrhea. *Germs*, **6**(3), 91-6. doi: 10.11599/germs.2016.1094.

549 Staggemeier R., Heck T. M., Demoliner M., Ritzel R. G., Röhnelt N. M., Girardi V., Venker C. A.,
550 Spilki F. R. 2017 Enteric viruses and adenovirus diversity in waters from 2016 Olympic venues.
551 *Sci Total Environ*, **586**, 304-312. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.01.223.

552 Takahashi E., Kobayashi H., Yamanaka H., Nakanishi M., Tateishi A., Abe T., Arimoto S.,
553 Negishi T. & Okamoto K. 2013 Analysis of carboxy terminal domain of metalloprotease of
554 elastolytic *Aeromonas hydrophila*. *Biol Pharm Bull*, **36**(7), 1174-82.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

555 Takahashi E., Ozaki H., Fujii Y., Kobayashi H., Yamanaka H., Arimoto S., Negishi T. & Okamoto
556 K. 2014 Properties of hemolysin and protease produced by *Aeromonas trota*. PLoS One, **9**(3),
557 e91149. doi: 10.1371/journal.pone.0091149.

558 Teunis P. & Figueras M. J. 2016 Reassessment of the Enteropathogenicity of Mesophilic
559 *Aeromonas* Species. Front Microbiol, **7**, Article 1395.

560 Velasco-Muñoz L., Cano-Portero R. & De Mateo-Ontañón S. 1999 *Aeromonas* infection
561 surveillance in Spain. Years 1989-1999. Spain. Boletín Epidemiológico Semanal. Instituto de
562 Salud Carlos III. MSC, **7**,197-208.

563 Voss L. M., Rhodes K. H. & Johnson K. A. 1992 Musculoskeletal and soft tissue *Aeromonas*
564 infection: an environmental disease. Mayo Clin Proc, **67**, 422-7.

565 Wang C. L., Cao X., Liu X., Guo L., Hu T., Ni X., Liu Y. & Lu C. 2008 Detection of biochemical
566 characters and extracellular proteases in the different isolates of *Aeromonas hydrophila*. Anim
567 Hus Vet Med, **40**, 16-19.

568 Yáñez M. A., Catalán V., Apráiz D., Figueras M. J. & Martínez-Murcia A. J. 2003 Phylogenetic
569 analysis of members of the genus *Aeromonas* based on *gyrB* gene sequences. Int J Syst Evol
570 Microbiol, **53**(3), 875-83.

571 Yi S. W., You M. J., Cho H. S., Lee C. S., Kwon J. K. & Shin G. W. 2013 Molecular
572 characterization of *Aeromonas* species isolated from farmed eels (*Anguilla japonica*). Vet
573 Microbiol, **164**(1-2), 195-200. doi: 10.1016/j.vetmic.2013.02.006.

TABLES

Table 1 - Sequences of specific primers for virulence genes detection (*act*, *aerA*, *hlyA*, *asp* and *amp*).

Primers	Sequence (5'-3')	Target gene	Annealing (°C)	Fragment size (pb)	Reference
act-F	AGAAGGTGACCACCAAGAACA	<i>act</i>	55	232	Khor et al. 2015
act-R	AACTGACATCGGCCTTGAATC				
aer-F	CCTATGGCCTGAGCGAGAAG	<i>aerA</i>	55	431	Körkoca et al. 2014
aer-R	CCAGTTCCAGTCCCACCACT				
hlyA-F	GGCCGGTGGCCCGAAGATACGGG	<i>hlyA</i>	62	597	Igbinosa and Okoh 2013
hlyA-R	GGCGGCGCCGGACGAGACGGG				
AP-165	CCCTCCAACAGCAACTTCTGGAACCTGGTG	<i>asp</i>	58	322	Takahashi et al. 2014
AP-166	TCCGGGTAGGCGGACATCAGCAGCGCCATG				
ASMP-03	AGGACGCCACCGGCCCGGGGGCAA	<i>amp</i>	60	550	Takahashi et al. 2014
ASMP-04	GACCAGCCAGTCGTTGCTCCCCTT				

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Table 2 - Physical-chemical and microbiological parameters of collection points.

	Standard CONAMA 357/05 class II brackish water	LRF 1		LRF 2		LRF 3		LRF 4		LRF 5		LRF 6	
Parameters		Collect 1	Collect 2	Collect 1	Collect 2	Collect 1	Collect 2	Collect 1	Collect 2	Collect 1	Collect 2	Collect 1	Collect 2
pH	6,5 a 8,5	7,6	7,8	7,5	8	7,65	8	7,43	7,5	7,36	7,5	7,36	8,2
Temperature (°C)	-	27,4	23,4	27,2	24,5	27,1	23,3	27,1	23,3	23,7	23,3	21,5	22,7
Dissolved oxygen (mg/L)	>4,0	4,77	4,7	4,75	6,7	5,21	5,2	4,52	4,6	4,41	4,9	4,7	5
Conductivity (mS/cm)	-	21,8	15,4	21,2	15,8	21,2	15,4	21,4	15,4	21,3	15,5	20,7	15,3
Turbidity (UNT^a)	-	17	13	11	4	12	6	8	8	8	4	6	3
Salinity (%)	≥0,5 a 30	1,32	0,9	1,27	0,9	1,27	0,9	1,28	0,9	1,28	0,9	1,26	0,9
Total Coliforms (MPN/100 mL)^b	2500	6867	10112	24196	10112	7915	10112	19863	10112	10112	10112	11199	9606
<i>E. coli</i> (MPN/100 mL)^b	2500	4106	10112	5794	10112	3725	10112	24196	10112	7215	10112	8664	9606

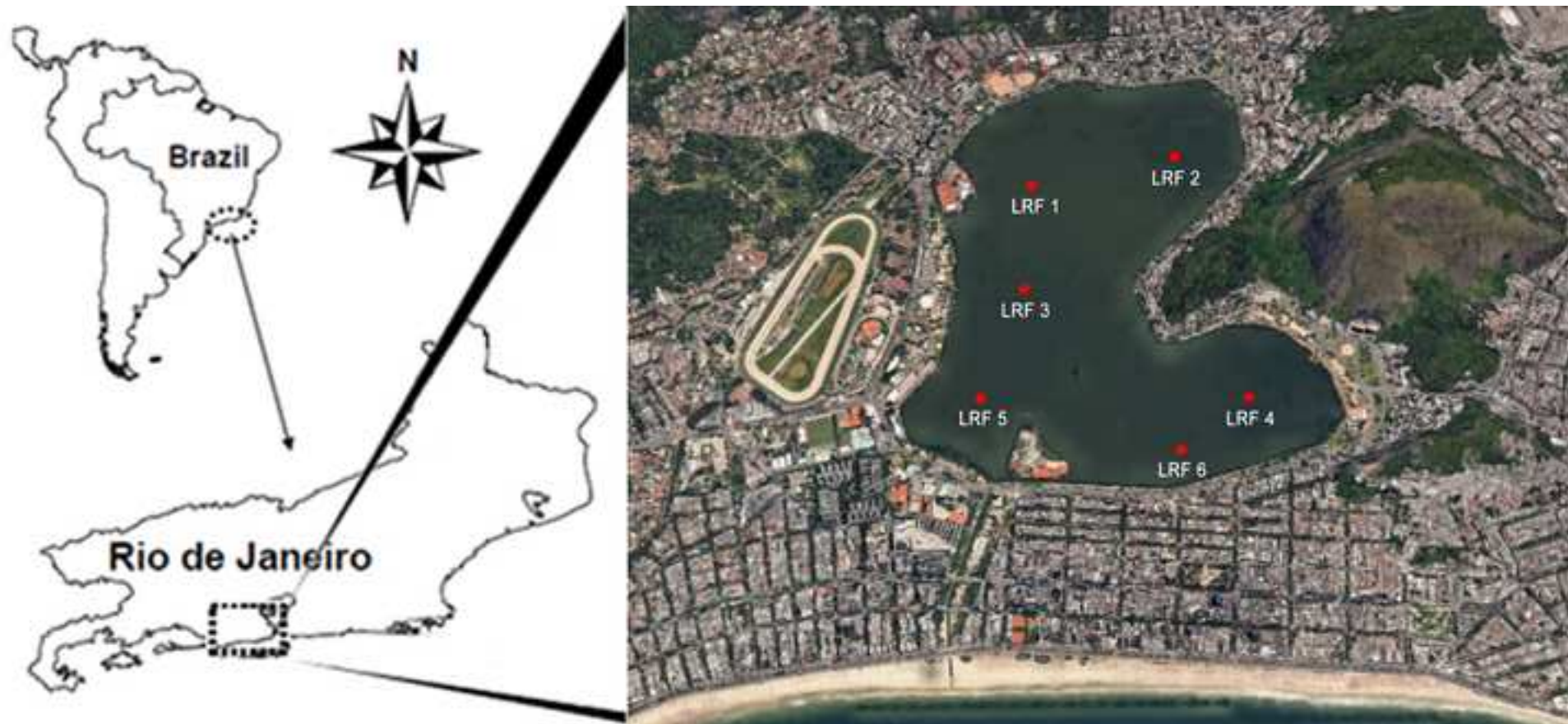
^aNephelometric Turbidity Units;

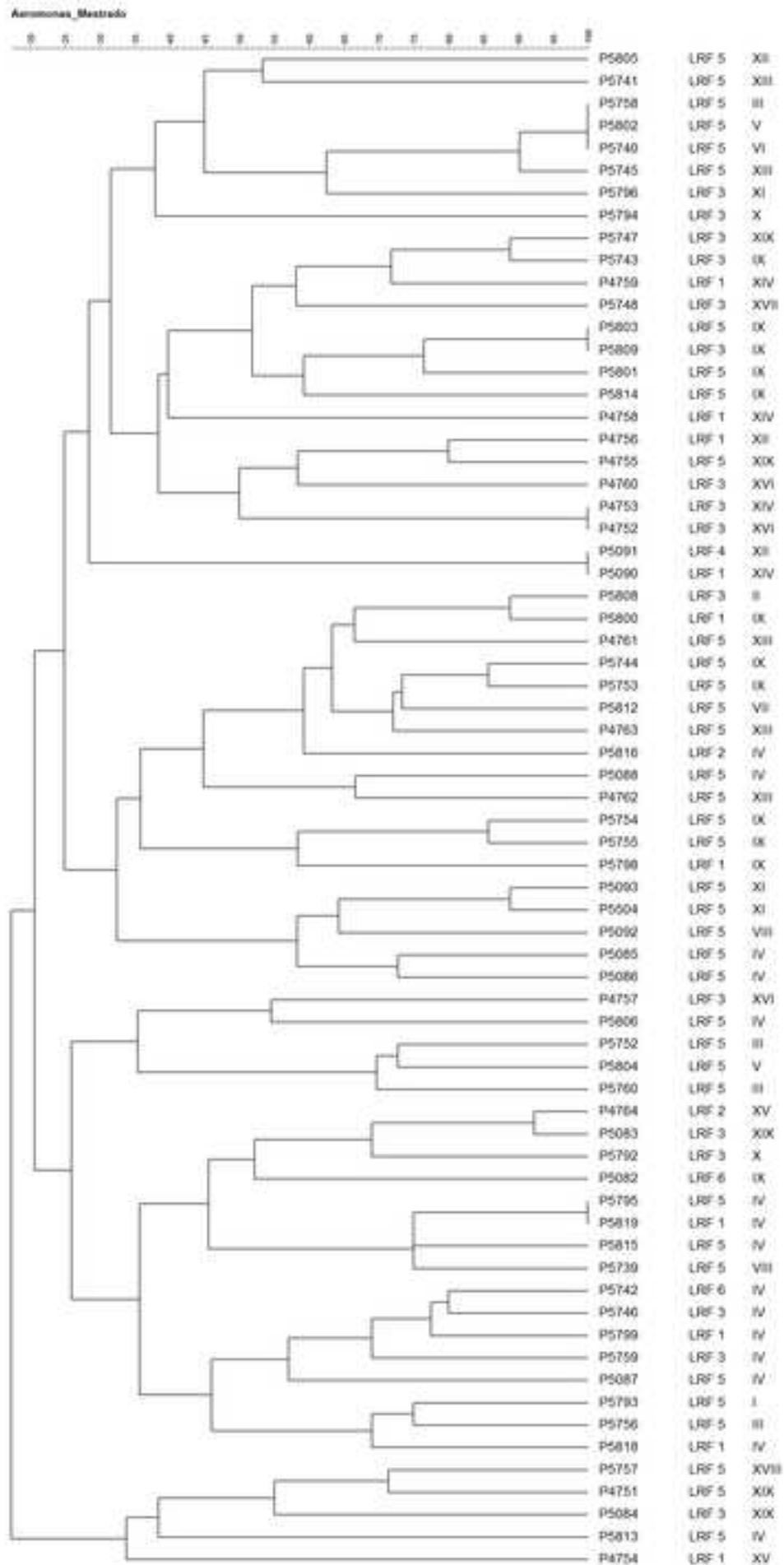
^b most probable number.

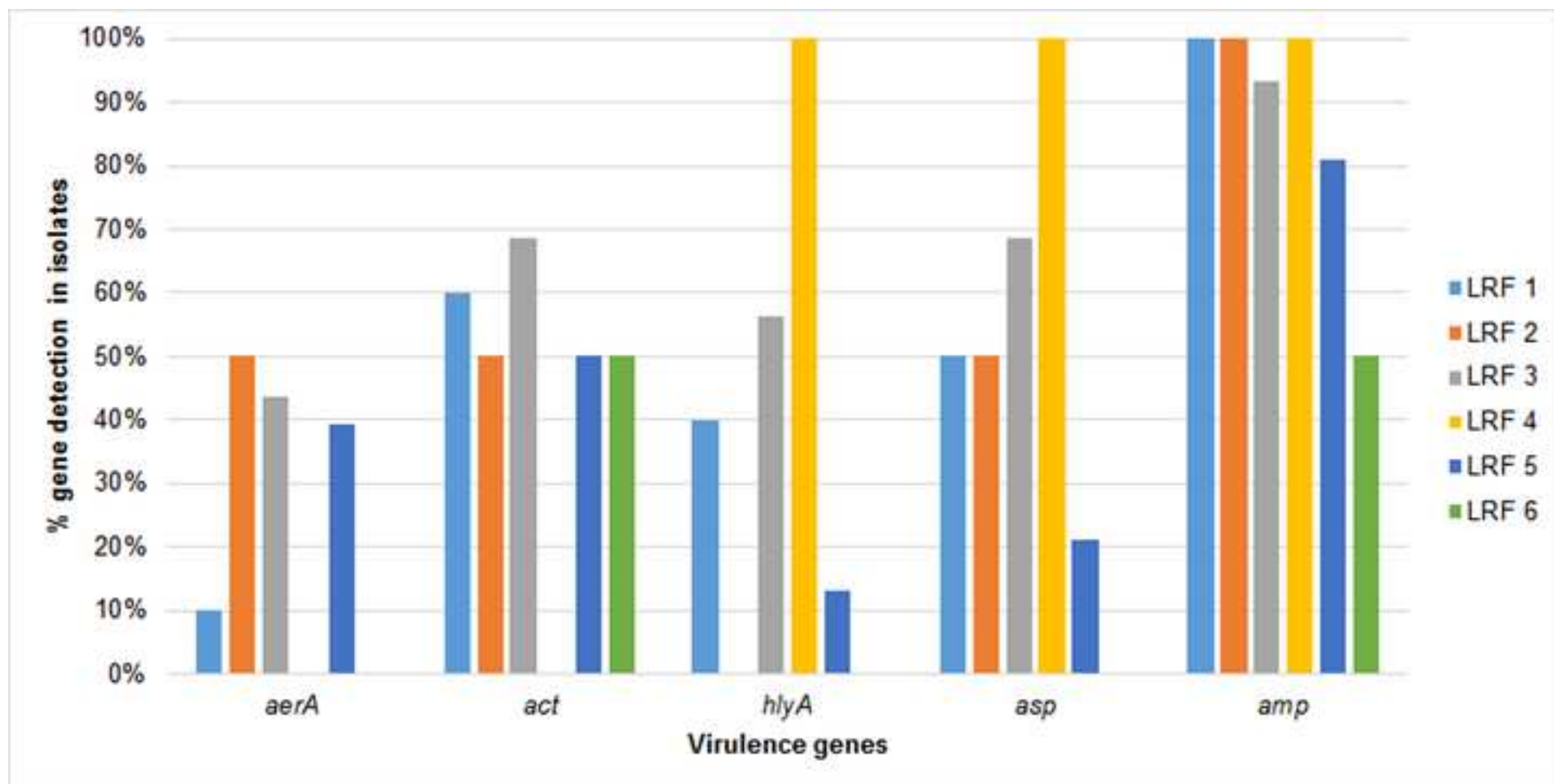
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Table 3 - Hemolytic and proteolytic activity of *Aeromonas* spp. strains.

Species	No. of positive strains (%)	
	Hemolytic activity	Proteolytic activity
<i>A. hydrophila</i> (n= 10)	100	92
<i>A. dhakensis</i> (n=16)	94	89
<i>A. enteropelogenes/trota</i> (n=3)	100	33
<i>A. jandaei</i> (n=1)	100	100
<i>A. punctata/caviae</i> (n=37)	76	100







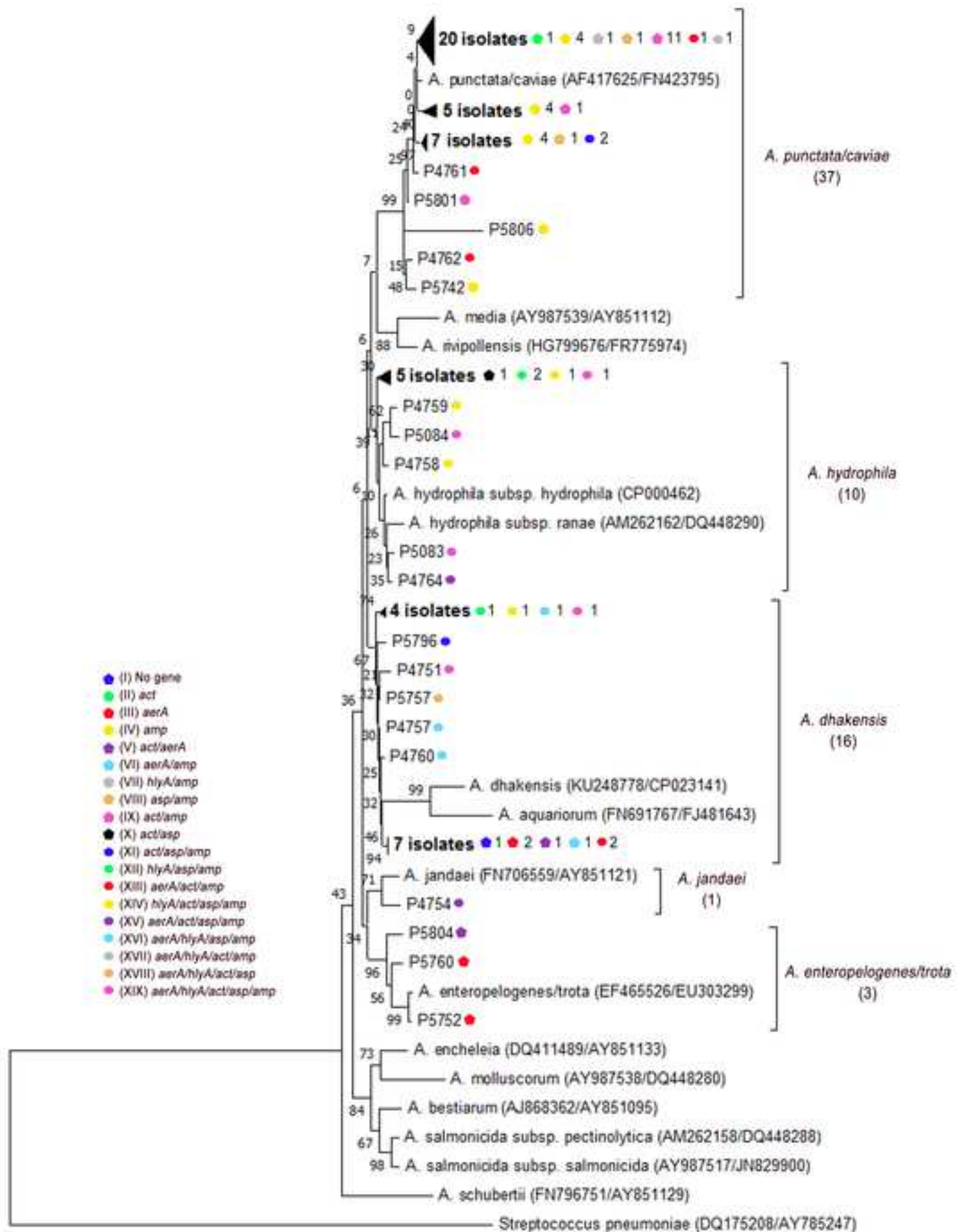


Figure 5

