

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

Thaís Costa Moreira

**AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE BACTERIANA E DO RESISTOMA
MICROBIANO EM EFLUENTES DE SISTEMAS DE TRATAMENTO
ALTERNATIVO E CONVENCIONAL**

Rio de Janeiro

2022

Thaís Costa Moreira

**AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE BACTERIANA E DO RESISTOMA
MICROBIANO EM EFLUENTES DE SISTEMAS DE TRATAMENTO
ALTERNATIVO E CONVENCIONAL**

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

Orientadora: Dra. Maysa Beatriz Mandetta Clementino

Coorientador: Dr. Kayo Cesar Bianco Fernandes

Rio de Janeiro

2022

Thaís Costa Moreira

**AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE BACTERIANA E DO RESISTOMA
MICROBIANO EM EFLUENTES DE SISTEMAS DE TRATAMENTO
ALTERNATIVO E CONVENCIONAL**

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

Aprovado em: ____ / ____ / ____.

BANCA EXAMINADORA

Célia Maria Carvalho Pereira Araújo Romão
Presidente (Fiocruz)

Bernardete Ferraz Spisso
(Fiocruz)

Gloria Cadavid Restrepo
(UNAL, Medellín/CO)

ORIENTADOR (ES)

Maysa Beatriz Mandetta Clementino
(Fiocruz) – Orientadora

Kayo Cesar Bianco Fernandes
(Fiocruz) - Orientador

Catálogo na fonte
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Biblioteca

Moreira, Thais Costa

Avaliação da diversidade bacteriana e do resistoma microbiano em efluentes de sistemas de tratamento alternativo e convencional. / Thais Costa Moreira. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2022.

87 f. : fig. ; graf. ; tab.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Vigilância Sanitária) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2022.

Orientadora: Maysa Beatriz Mandetta Clementino

Co-orientador: Kayo Cesar Bianco Fernandes .

1. Tratamento de efluentes. 2. Resistoma microbiano. 3. Elizabethkingia anophelis. 4. Sequenciamento genoma. I. Título.

Evaluation of bacterial diversity and microbial resistome in alternative and conventional treatment effluents.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

O saneamento é fundamental para uma vida saudável e produtiva, e a prestação deste serviço para populações urbanas e rurais é um desafio permeado por dificuldades políticas de gestão e interesses. O objetivo desse estudo foi avaliar a diversidade bacteriana e o resistoma microbiano em efluentes de sistemas alternativo e convencional de tratamento por meio de abordagem microbiológica e genômica. Para isso, foram realizadas 2 coletas dos pontos de entrada e saída de estação convencional de tratamento de esgoto (ECE) e alternativa (ESA). Foram obtidas 147 linhagens a partir de meios de cultivo contendo antimicrobianos. Em seguida, foram identificadas pelos sistemas Vitek II e Maldi-TOF. Na coleta 1 foram identificados 62 isolados (15 ECE e 47 ESA), 43,5% (27/62) da ordem *Enterobacteriales* (16% de *Enterobacter cloacae*) e 56% (35/62) de diferentes espécies, incluindo um isolado de *Elizabethkingia anophelis* (ESA/entrada). Na coleta 2 foram identificados 28 isolados (9 ECE e 19 ESA), 35% (10/28) de *Pseudomonas* spp. sendo 32% *P. aeruginosa*. Dos 27 isolados de *Enterobacteriales*, 15 (55%) apresentaram resistência aos antibióticos, 64,2 % perfil de resistência não-MDR, 21,4% MDR e 14,35% XDR. *Elizabethkingia anophelis* apresentou perfil de resistência PDR (resistência a 14 antimicrobianos). Os isolados de *Pseudomonas* spp. apresentaram perfis de resistência Sensível e MDR (*P. putida* (ESA/saída)). Os 2 isolados selecionados para o sequenciamento genômico, *E. anophelis* (entrada da ESA) e *P. putida* (saída da ESA) apresentaram conteúdo GC entre 35,5-62% e tamanho médio de 4,2-5,8 MB, respectivamente. O genoma de *E. anophelis* apresentou 256 subsistemas. Foram revelados genes de resistência antimicrobiana consistentes com seus fenótipos de resistência, incluindo fluoroquinolonas (gene *adeF*), metalo- β -lactamase (*bla*_{GOB-1} e *bla*_{B-1}) e desinfetantes (*qacG*). De acordo com o perfil do cgMLST gerado pelo software *GrapeTree*, este isolado derivou diretamente da sublinhagem 15 associada a um surto em Wisconsin, EUA (2016). O genoma de *P. putida* resultou em 81 *contigs* e 5375 sequências codificadoras, incluindo 71 RNAs. Apresentou 369 subsistemas, incluindo resistência a antibióticos e compostos tóxicos, como genes *cutE* e *corC* (homeostase do cobre) operon *czc* (resistência ao cobalto, zinco e cádmio), *gyrA* e *gyrB* (fluoroquinolonas), *bla*_{BLI} (Beta-lactamase) e *creA* e *creD* (colicina e outros antibióticos). De acordo com o agrupamento MLST pertence ao ST154, derivado diretamente do ST192 (EUA) e, assim como os STs 78, 216 e 150, é originário do ST central 69 (origem clínica e

ambiental). Os resultados obtidos no presente estudo sinalizam a importância de investigações do microbioma e do conjunto de genes de resistência em efluentes de estações de tratamento de esgoto. Além disso, reafirmam a necessidade de maior cobertura na captação e tratamento de esgotos que serão descartados em corpos hídricos receptores e poderão promover a disseminação de contaminantes emergentes, danos ao meio ambiente e à saúde humana.

Palavras-chave: Tratamento de efluentes. Resistoma microbiano. *Elizabethkingia anophelis*. sequenciamento genoma

ABSTRACT

Sanitation is essential for a healthy and productive life, and the provision of this service to urban and rural populations is a challenge permeated by political difficulties of management and interests. The objective of this study was to evaluate bacterial diversity and microbial resistome in effluents from alternative and conventional systems using a microbiological and genomic approach. For this, 2 collections were carried out at the input and output points of a conventional (ECE) and an alternative (ESA) sewage treatment plants. 147 strains were obtained from culture media containing antimicrobials. Then identified by the Vitek II and Maldi-TOF systems.

In first collection, 62 isolates (15 ECE e 47 ESA), were identified, 43.5% (27/62) belonging to the order *Enterobacteriales* (16% of *Enterobacter cloacae*) and 56% (35/62) of different species, including *Elizabethkingia anopheles* (ESA/input). Collection 2 had 28 isolates identified (9 ECE e 19 ESA), 35% of *Pseudomonas* spp. (10/28) being 32% *P. aeruginosa*. Of these 27 *Enterobacteriales* isolates, 15 showed resistances to at least one antibiotic. Of these, 64.2% non-MDR resistance profile, 21.4% MDR and 14.35% XDR. *Elizabethkingia anophelis* showed PDR resistance profile (resistance to the 14 antimicrobials). *Pseudomonas* spp. isolates presented Sensible resistance profile, and MDR (*P. putida* (ESA/ output)). The 2 isolates selected for genomic sequencing, *E. anophelis* (ESA input) and *P. putida* (ESA output) presented GC content between 35.5-62% and mean size of 4.2-5.8 MB, respectively. In the *E. anophelis* genome revealed 256 subsystems. Antimicrobial resistance genes consistent with their resistance phenotypes were revealed, including fluoroquinolones (*adeF* gene), metallo- β -lactamase (*bla*_{GOB-1} and *bla*_{B-1}) and disinfectants (*qacG*). According to the cgMLST profile generated by GrapeTree software, this isolate was directly derived from subline 15 associated with an outbreak in Wisconsin, USA (2016). The *P. putida* genome resulted in 81 contigs and 5375 coding sequences, including 71 RNAs. It revealed 369 subsystems, including resistance to antibiotics and toxic compounds, such as *cutE* and *corC* genes (copper homeostasis), *czc* operon (cobalt, zinc and cadmium resistance) *gyrA* and *gyrB* (fluoroquinolones), *bla*_{BLI} (Beta-lactamase) and *creA* and *creD* (cholicin and other antibiotics). According to the MLST cluster, this isolate belongs to ST154, derived directly from ST192 (USA) and, like STs 78, 216 and 150, originates from central ST69 (clinical and environmental origin). The results obtained in the present study indicate the importance of investigations into the

microbiome and the set of resistance genes in effluents from wastewater treatment plants. In addition, they reaffirm the need for greater coverage in the capture and treatment of sewage that will be discarded in receiving water bodies and may promote the dissemination of emerging contaminants, damage to the environment and human health.

Keywords: Effluent treatment. Microbial resistoma. *Elizabethkingia anopheles*. Whole genome sequencing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa do índice de tratamento de esgoto coletado dos municípios brasileiros distribuído por faixas percentuais.....	17
Figura 2. Níveis em tratamento convencional de esgoto.....	20
Figura 3. Configuração do Tratamento de Esgoto por Lodos Ativados.....	22
Figura 4. Modelo de tratamento de águas cinzas por <i>wetland</i>	25
Figura 5. Esquema de Tanque de Evapotranspiração.....	27
Figura 6. Mecanismos de transferência de genes de resistência.....	30
Figura 7. Principais mecanismos de ação e de resistência aos antimicrobianos.....	31
Figura 8. Vias de disseminação de resistência aos antibióticos entre os potenciais reservatórios: o homem, os animais e o ambiente.....	34
Figura 9. Princípio da técnica Illumina.....	39
Figura 10. Vista aérea da ETE Fiocruz, <i>campus</i> Manguinhos.....	43
Figura 11. Etapas de construção da TEvap.....	44
Figura 12. Percentual de microrganismos identificados na coleta 1.....	49
Figura 13. Percentual de microrganismos identificados na coleta 2.....	50
Figura 14. Suscetibilidade aos antimicrobianos de <i>Enterobacteriales</i> e <i>Pseudomonas</i> spp. das 2 coletas.....	51
Figura 15. Relação de isolados resistentes aos antimicrobianos na entrada e saída das estações.....	53
Figura 16. Representação gráfica da distribuição de Subsistemas no genoma de <i>E. anophelis</i>	55
Figura 17. <i>Minimum-spanning tree</i> baseada no cgMLST de <i>E. anophelis</i> distribuídos nos países.....	56
Figura 18. <i>Minimum-spanning tree</i> baseada no cgMLST de <i>E. anophelis</i> e fonte de isolamento.....	57
Figura 19. Representação gráfica da distribuição de Subsistemas no genoma de <i>P. putida</i>	59
Figura 20. <i>Minimum-spanning tree</i> baseada no MLST de <i>P. putida</i> distribuídos nos países.....	59
Figura 21. <i>Minimum-spanning tree</i> baseada no MLST de <i>P. putida</i> e fontes de isolamento.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Média e desvio padrão da análise físico-química de amostras retiradas na entrada e saída de uma Estação de Tratamento por Evapotranspiração.	28
Tabela 2. Conjuntos de meios de cultura contendo antimicrobianos	45
Tabela 3. Perfis de suscetibilidade de <i>Enterobacteriales</i> das duas estações de tratamento de esgoto.	51
Tabela 4 Perfil de suscetibilidade de <i>E. anophelis</i> recuperada da entrada da estação alternativa.....	52
Tabela 5 Características dos genomas obtidos.....	54

LISTA DE SIGLAS

ANA	Agência Nacional de Águas e Saneamento Básico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BRA	Bactérias Resistentes aos Antimicrobianos
BRF	Biorreatores de leito fixo
BRLM	Reator de biofilme de leito móvel
BRM	Biorreatores de membrana
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DE	Desreguladores endócrinos
ECE	Estação convencional de tratamento de esgoto
EGM	Elementos Genéticos Móveis
ESA	Estação alternativo de tratamento de esgoto
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
GRA	Genes de Resistência aos Antimicrobianos
IN	Instrução Normativa
MDR	Multidroga resistentes a antimicrobianos
MLST	<i>Multilocus sequence typing</i>
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
OMC	Organização Mundial do Comercio
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONU	Organização das Nações Unidas
PDR	Pan-resistente a antimicrobianos
PNUMA	Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente
RAM	Resistência Antimicrobiana
SCG	Sequenciamento Completo do Genoma

SNG	Sequenciamento de Nova Geração
SNIS	Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento
SUS	Sistema Único de Saúde
THG	Transferência Horizontal de Genes
TVG	Transferência vertical de genes
UV	Ultravioleta
VAS	Vigilância Ambiental em Saúde
VE	Vigilância Epidemiológica
VS	Vigilância Sanitária
XDR	Extensivamente resistente a antimicrobianos

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Poluição hídrica	15
1.2 Esgotos domésticos	16
1.3 Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs)	19
1.4 Tratamento alternativo de esgoto	24
1.4.1 Tanque de Evapotranspiração	26
1.5 Antibióticos e resistência antimicrobiana	28
1.5.1 Resistência antimicrobiana em ETEs	32
1.6 Saúde Única e a resistência antimicrobiana (RAM)	33
1.6.1 Vigilância Ambiental em Saúde e RAM	35
1.7 Metodologias genômicas na resistência antimicrobiana	37
1.8 Relevância	40
2. OBJETIVOS	42
3. METODOLOGIA	43
3.1 Local do estudo	43
3.2 Amostragem	44
3.3 Processamento das amostras para isolamento bacteriano	44
3.4 Identificação dos isolados	45
3.5 Determinação da suscetibilidade aos antimicrobianos	46
3.5.1 Perfis de Resistência aos antimicrobianos	46
3.6 Sequenciamento de nova geração	46
4. RESULTADOS	48
4.1 Isolamento e identificação	48
4.1 Resistência antimicrobiana	50
1.9 Sequenciamento genômico	53
1.9.1 <i>Elizabethkingia anophelis</i>	54
1.9.2 <i>Pseudomonas putida</i>	58

5. DISCUSSÃO	61
6. CONCLUSÕES	68
7. REFERÊNCIAS.....	69

1. INTRODUÇÃO

1.1 Poluição hídrica

O desenvolvimento da vida humana em civilização com qualidade de vida sempre esteve intrinsecamente ligado à disponibilidade de água, e a poluição desse recurso afeta diretamente as populações. A poluição e a degradação dos recursos hídricos são realidades recorrentes do acelerado crescimento demográfico, especialmente nas regiões metropolitanas (ANDRADE, 2019), resultando na escassez dos recursos hídricos (MACHADO, 2022).

A água doce é um recurso natural renovável, porém para seu processo de regeneração é necessário o equilíbrio de diversos fatores ambientais. Apesar de a água doce ser um recurso renovável, é finita, e a ausência do equilíbrio ecológico compromete o seu processo de renovação. Inúmeros são os exemplos de ações humanas que geram efeitos extremamente danosos aos recursos hídricos e comprometem o processo de regeneração da água. Dentre essas formas estão a impermeabilização, não planejada, dos solos nos centros urbanos (comprometendo a infiltração de águas pluviais no solo), a poluição da água por resíduos sólidos e líquidos, como efluentes domésticos, industriais ou hospitalares, o desmatamento das nascentes e das matas ciliares, as altas taxas de desperdício no uso da água e a perda elevada no sistema de abastecimento hídrico, a poluição da atmosfera, entre outras (GOMES, 2020).

Conhecer a importância da disponibilidade de água, preservar o ecossistema, fazer uso racional dos recursos hídricos e buscar soluções que evitem a escassez são aspectos fundamentais para enfrentar os desafios da crise hídrica, intensificada a cada ano (MACHADO, 2022). Um dos riscos associado à poluição hídrica é a possibilidade de transmissão de doenças pelos organismos patogênicos ali presentes (SPERLING, 2005), além do risco indireto relacionado a presença de resíduos de antimicrobianos em águas poluídas, o que pode conduzir ao aparecimento de resistência antimicrobiana (GASTALHO, 2014). Doenças de veiculação hídrica estão relacionadas às taxas de mortalidade. Em 2019, segundo o Ministério da Saúde, foram notificadas mais de 273 mil internações por doenças de veiculação hídrica no Brasil (TRATA BRASIL, 2021).

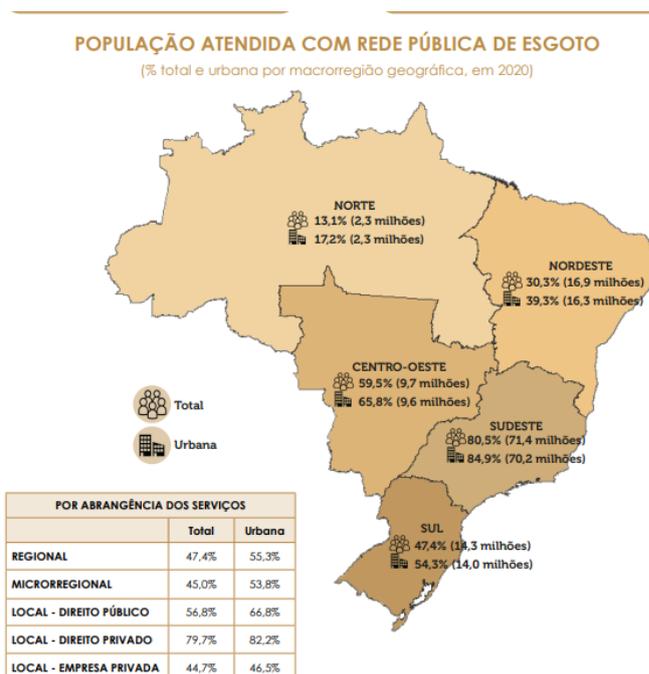
Uma das formas de combate a essas doenças é o tratamento adequado dos esgotos sanitários antes que atinjam o solo ou corpos d'água (LEONEL, 2013). É a partir da implementação do saneamento básico de qualidade que ocorre a melhoria na qualidade de vida da população e o aumento da expectativa de vida (FUNASA, 2019).

1.2 Saneamento básico no Brasil

No Brasil, grande parte da população ainda não tem acesso ao tratamento convencional de esgoto. Nesse mesmo ano somente 49,1% dos esgotos gerados receberam tratamento adequado (SNIS, 2019). As regiões Norte e Nordeste do país são as que mais sofrem com a falta de serviços de esgotamento sanitário adequado, também são as mesmas que apresentam as maiores taxas de mortalidade em crianças menores de cinco anos de idade por doenças diarreicas agudas (PRADO, 2014).

Existe uma desigualdade em relação aos percentuais de tratamento de esgoto nas regiões brasileiras, enquanto algumas regiões apresentam percentuais maiores de 90% de tratamento de esgoto, outras possuem somente 30% de esgoto tratado, ou não possuem tratamento (SNIS, 2019) (Figura 1).

Figura 1. Mapa do índice de tratamento de esgoto coletado dos municípios brasileiros distribuído por faixas percentuais.



Fonte: SNIS, 2021.

O aumento da densidade populacional e os desafios socioeconômicos criam barreiras para o tratamento adequado de efluentes (MANAIA, 2018). Em localidades onde as redes de coleta de esgoto não existem ou são insuficientes, ocorre a adoção de soluções precárias, como o lançamento do efluente bruto a céu aberto, ou em corpos d'água nos arredores (TONETTI, 2018). As desigualdades no acesso aos serviços de saneamento básico causam impacto negativo à saúde pública, principalmente nas populações de baixa renda ou vulneráveis que vivem na periferia das grandes cidades (PRADO, 2014).

O governo em suas três esferas, é responsável por adotar medidas que visem a melhoria da vida e da saúde da população (TAVARES, 2019). A Constituição Federal de 1988 estabelece que o saneamento básico é um direito assegurado à população e de responsabilidade da União (BRASIL, 1988). A Lei do Saneamento Básico de 2007, nº 11.455, é pioneira ao defini-lo como conjunto dos serviços, infraestrutura e instalações operacionais de abastecimento de água, esgotamento sanitário, limpeza urbana, drenagem urbana, manejo de resíduos sólidos e de águas pluviais, nos princípios de universalidade, da integralidade do acesso, e da eficiência e sustentabilidade econômica (BRASIL, 2007).

Recentemente, em 15 de julho de 2020, foi aprovada a Lei nº 14.026, que altera a alguns pontos lei nº 11.455, reúne leis anteriores referentes ao tema, e é considerado o novo marco legal do saneamento básico. Além disso, define padrões de atividades regulatórias e da formação de políticas públicas, e dá a Agência Nacional de Águas e Saneamento Básico (ANA) competência para editar normas de referência e legislar sobre serviços de saneamento (BRASIL,2020). A aprovação da lei tem a finalidade de combater o déficit no quadro de serviços de saneamento básico, contudo esse novo marco pode representar um retrocesso sobre o ponto de vista dos direitos sociais, uma vez que estimula lógicas mercantilistas na gestão dos serviços de água e saneamento (LEITE, 2021).

O novo dispositivo legal prevê prestação de serviço regionalizado, abrangendo mais de um município, reunindo municípios com maior e menor capacidade técnica e financeira (GONÇALVES, 2020). O art. 7 da lei atual altera o art. 3 da lei anterior, no que se refere a modalidade de *prestação integrada* de serviços públicos de saneamento básico em determinada região cujo território abranja mais de um município (Brasil, 2020). Isso abre margem para uma empresa, pública ou privada, assumir regiões ricas e pobres de um mesmo território, mas não garante na prática que a alocação de recursos ocorra segundo os princípios de justiça e equidade (SOUSA, 2020).

As experiências de universalização do saneamento no mundo evidenciam que esta não é possível sem uma gestão democrática e aporte de recursos públicos (LEITE, 2021). A competição na produção de bens que exigem elevados investimentos fixos e efeitos de escala pode ser contraproducente, quando não inviável, no caso do saneamento urbano (SOUSA, 2020).

O planejamento de melhorias no sistema de saneamento deve estar baseado no entendimento de necessidades da comunidade, dos usuários, disponibilidade de gastos e necessidades da região (PARKINSON, 2014). O envolvimento das próprias comunidades é um ponto fundamental na discussão e escolha de melhores alternativas para o tratamento, disposição do esgoto tratado e da gestão adequada dos sistemas, a partir de estratégias diferenciadas que respeitem a diversidade cultural e ambiental das comunidades (TONETTI, 2018). O saneamento é fundamental para uma vida urbana saudável e produtiva, e a oferta de serviços apropriados para populações urbanas em rápido crescimento é um dos desafios mais urgentes do mundo (ANDERSSON, 2016). O tema do saneamento básico é ponto

imprescindível para efetivação do direito social à saúde, e repercute também na efetivação de outros direitos, como o direito ao meio ambiente, à educação e ao desenvolvimento (LEITE, 2021).

1.3 Esgotos domésticos e Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs)

O tratamento de esgoto é fundamental na proteção do meio ambiente, em especial de corpos d'água (MANAIA ET AL, 2018). O tratamento de esgoto foi uma das maiores conquistas do último século, pois permite o retorno para o ambiente da água com qualidade (LEONEL ET AL,2013).

Os processos de tratamento de esgotos visam principalmente a remoção de matéria orgânica dissolvida, que é realizada por uma variedade de microrganismos que convertem a matéria orgânica em gás carbônico, água, material celular e metano em condições anaeróbias (LEONEL, 2013). O esgoto doméstico contém aproximadamente 99,9% de água; o restante é a fração que inclui sólidos orgânicos, inorgânicos e microrganismos (MELLO, 2007). O tratamento de esgotos tem por finalidade separar a fase líquida da fase sólida, tratando-se separadamente cada uma destas fases. O efluente é depois devolvido aos corpos hídricos (COMUSA, 2015).

Existem duas variantes dos sistemas de esgotamento sanitário: sistema individual ou estático, e sistema coletivo ou dinâmico. O primeiro é solução no local, individual ou para poucas residências, enquanto o segundo é a solução com afastamento do esgoto da área servida (SPERLING, 2005).

Os sistemas coletivos ou centralizados são considerados uma alternativa consolidada para o tratamento de esgotos sanitários. Dentre as vantagens destes sistemas está a efetividade desses em áreas urbanas e com elevada densidade populacional, pois podem coletar e tratar grandes volumes de efluentes (SPERLING, 2005). Esses sistemas podem possuir extensas tubulações e estações elevatórias, que encaminham o esgoto para ETE em local afastado do centro urbano (Mesquita, 2019). Desse modo, uma das principais desvantagens do sistema centralizado são os custos de implementação, operação e manutenção (OTTERPOHL, 2002). O tratamento realizado nessas ETEs é usualmente classificado nos níveis preliminar,

primário, secundário e terciário. A Figura 2 apresenta esses níveis e os processos unitários realizados em cada um deles.

Figura 2. Níveis em tratamento convencional de esgoto.



Fonte: TONETTI, 2018.

O tratamento preliminar constitui na remoção de sólidos grosseiros, como pedaços de madeira, tecidos, areia, plástico, papel, cabelo etc. A remoção ocorre utilizando meios físicos como gradeamento e desarenadores. O material retido deve ser levado à disposição adequada, como aterros sanitários ou outros. Na fase primária ocorre a remoção de sólidos sedimentáveis e de materiais flutuantes, como óleos e graxa. Esse material removido também é direcionado para unidades de tratamento adequado (TONETTI, 2018). A fase secundária utiliza tratamento biológico, de modo que bactérias e outros microrganismos são responsáveis pelas reações de conversão da matéria orgânica e inorgânica presente no efluente, favorecendo a remoção da carga orgânica (SPERLING, 2005). No tratamento terciário ocorre a desinfecção do efluente. Dependendo do processo de tratamento empregado, o esgoto doméstico pode chegar à fase terciária com concentrações elevadas de micro-organismos patogênicos (MEDEIROS, 2018).

No Brasil, as ETEs que realizam o tratamento terciário utilizam principalmente o cloro como agente oxidante na desinfecção do esgoto, tendo em vista seu baixo custo e eficiência na inativação de microrganismos patogênicos e na oxidação de

compostos que causam sabores e odores (BARONI, 2019). Os derivados do cloro são os desinfetantes mais utilizados no mundo para tratamento de água de abastecimento e águas residuárias. A hidrólise do cloro, formadora do ácido hipocloroso (HOCl), promove a ruptura celular nos microrganismos, por meio da alteração da permeabilidade na membrana plasmática (MEDEIROS, 2018). Contudo, o uso do cloro viabiliza a formação dos trihalometanos, como o clorofórmio, compostos voláteis tóxicos para os seres humanos, produtos da reação do cloro com a matéria orgânica presente no esgoto, ou remanescente no efluente tratado (BARONI, 2019).

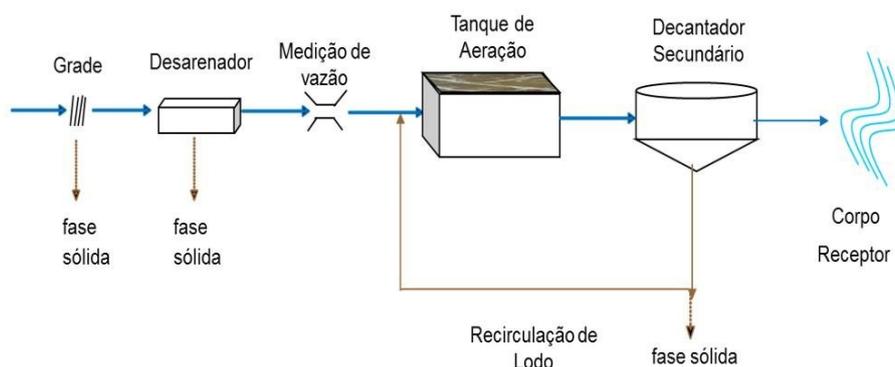
Outras tecnologias disponíveis para a remoção de microrganismos patogênicos em ETEs incluem o uso de lâmpadas ultravioleta, processos oxidativos avançados, a ozonização, processos de adsorção em carvão ativado, entre outros. Esses processos geralmente demandam custos elevados de investimento e apresentam operação mais onerosa e/ou sofisticada em relação a desinfecção por cloração (AQUINO, 2013). Dentre essas, a luz UV causa bloqueio da replicação e transcrição do DNA, obtendo a atividade germicida por meio da radiação emitida. O bom funcionamento dessa tecnologia envolve a constante manutenção e limpeza das lâmpadas e baixa turbidez e sólidos em suspensão do efluente (MEDEIROS, 2018).

Tratamentos adicionais no tratamento terciário podem envolver a remoção de nutrientes como Nitrogênio e Fósforo (AQUINO, 2013), protegendo os corpos d'água do processo de eutrofização, ou a remoção de micropoluentes, como resíduos de antimicrobianos, outros fármacos e desreguladores endócrinos, que geralmente não são removidos pelos processos tradicionais de tratamento de água, e acabam sendo acumulados em lençóis freáticos, outros corpos hídricos ou no solo (EMBRAPA, 2018).

Um dos métodos bastante utilizados no tratamento biológico de esgoto é o sistema de lodos ativados (OLIVEIRA, 2007). Esse tipo de tratamento apresenta vantagens como eficiência na remoção de demanda bioquímica de oxigênio (DBO), necessidade de pequena área de instalação e possibilidade de remoção biológica de nitrogênio e fósforo (SPERLING, 2005). Em um tanque, uma cultura suspensa de microrganismos aeróbios é responsável pelo tratamento de esgotos. Esses microrganismos são favorecidos por aeradores, otimizando a formação de flocos que degradam a matéria orgânica (GEHLING, 2017). Pode ser feita a adição de floculantes orgânicos e polímero para forçar a formação de flocos e a decantação do restante dos sólidos sedimentáveis (FIN, 2018).

A Figura 3 apresenta o esquema de uma ETE por lodos ativados. Os polímeros aglomeram-se aos vários constituintes do floco e são separados do efluente no decantador secundário. Devido à recirculação dos sólidos sedimentados do decantador secundário, uma parcela significativa dos microrganismos retorna para o tanque de aeração, favorecendo a eficiência do tratamento (GEHLING, 2017).

Figura 3. Configuração do Tratamento de Esgoto por Lodos Ativados.



Fonte: PORTAL, 2019

Dentre as desvantagens dos sistemas de lodo ativados está a complexidade operacional. É importante definir o período ideal para que o lodo possa ser recirculado, favorecendo o ciclo de vida dos microrganismos presentes. Uma vez estabilizado, o lodo perde a capacidade de decomposição da matéria orgânica. Quando a idade do lodo, tempo em que o lodo fica no sistema, atinge os limites projetados, deve ser retirado do sistema para tratamento posterior e destinação final da fase sólida (LOGICAMBIENTAL, 2020). A produção de lodo excedente pode ser uma desvantagem no sistema, assim, o gerenciamento do lodo e manejo do lodo estabilizado são fatores fundamentais para que o sistema de saneamento seja sustentável.

Outros tratamentos biológicos mais complexos como biorreatores de membrana (MBR), reator de biofilme de leito móvel (MBBR) ou biorreatores de leito fixo (FBR) estão começando a ser usados em modernas ETEs municipais (PADZA, 2019). Essas tecnologias favorecem a degradação da matéria orgânica e mineral, ao mesmo tempo em que membranas separam as fases líquidas e sólidas. Apresentam baixo consumo de energia e área reduzida de instalação, pois são eficientes com concentração alta de biomassa. Esses sistemas podem ser incorporados ao tanque

de aeração por exemplo, otimizando o tratamento por lodos ativados (BATISTA, 2020).

Outros tipos de métodos biológicos de tratamento utilizados são lagoas facultativas (LF), lagoas anaeróbias seguidas por lagoas facultativas (LAN+LF), reatores UASB e reatores UASB seguidos de pós-tratamento (UASB+POS), entre outros (OLIVEIRA, 2007). Esses sistemas são considerados sistemas mistos, pois em geral haverá necessidade da aplicação de pós-tratamento para que o efluente obtenha características que permitam o reuso ou a descarga em águas superficiais. As vantagens de uso são simplicidade de operação e construção e baixos custos e as desvantagens são que geralmente necessitam de grandes áreas para implantação e possível liberação de maus odores (HAANDEL, 2021).

Para a decisão do método de tratamento a ser empregado nas ETEs devem ser levados em consideração: as condições do curso d'água receptor e da característica do esgoto bruto gerado, a eficiência, confiabilidade do tratamento, disposição do lodo, requisitos de área, impactos ambientais, custos de operação, custos de implantação, sustentabilidade e simplicidade, e adotando-se a melhor alternativa técnica e econômica (SPERLING, 2005). As ETEs normalmente empregam processos biológicos como principal tecnologia e, em poucos casos, utilizam técnicas complementares de tratamento (AQUINO, 2013). A maioria das ETEs atualmente em operação inclui somente alguma etapa adicional, como a desinfecção do efluente secundário antes do lançamento no meio ambiente (MANAIA, 2018).

A falta de incentivo para o estabelecimento de tecnologias mais avançadas se deve aos custos de investimento necessários para a expansão das redes de tratamento, para a implementação, a operação e manutenção dos sistemas, principalmente nas fases terciárias de tratamento (PRADO, 2014). A maior parte dos custos financeiros está associada à implementação de redes coletoras de esgotos, que representam mais de 60% dos custos no orçamento total da implantação de sistemas das ETEs. Desse modo, a utilização desses sistemas é inapropriada em áreas com baixa densidade populacional e/ou domicílios dispersos (MESQUITA, 2019). As dificuldades técnicas e financeiras não deveriam representar barreiras, mas incentivos para o desenvolvimento mais equitativo e sustentável para o meio ambiente, buscando o bem-estar e saúde pública (PRADO, 2014).

1.4 Tratamento alternativo de esgoto

Os sistemas individuais, ou locais, são aqueles cuja coleta, tratamento e disposição ou reutilização de águas residuárias são realizadas próximas da fonte de geração (MESQUITA, 2019). São usualmente adotados para atendimento unifamiliar, embora também possam atender a um certo número de residências próximas entre si (SPERLING, 2005). Se bem projetados, construídos e operados sistemas individuais podem ser uma boa alternativa para promover a saúde da população e ao mesmo tempo manter a integridade ambiental destas localidades (FIGUEREDO, 2019).

Dentre as vantagens econômicas desses sistemas estão os baixos custos de instalação, baixo consumo de energia e insumos externos, a possibilidade de gerar subprodutos com valor comercial como biogás, plantas ornamentais, e possibilidade de geração de adubos. Podem contribuir para a saúde da população, gerar trabalho e renda, e melhorar as condições ecológicas locais (TONETTI, 2018).

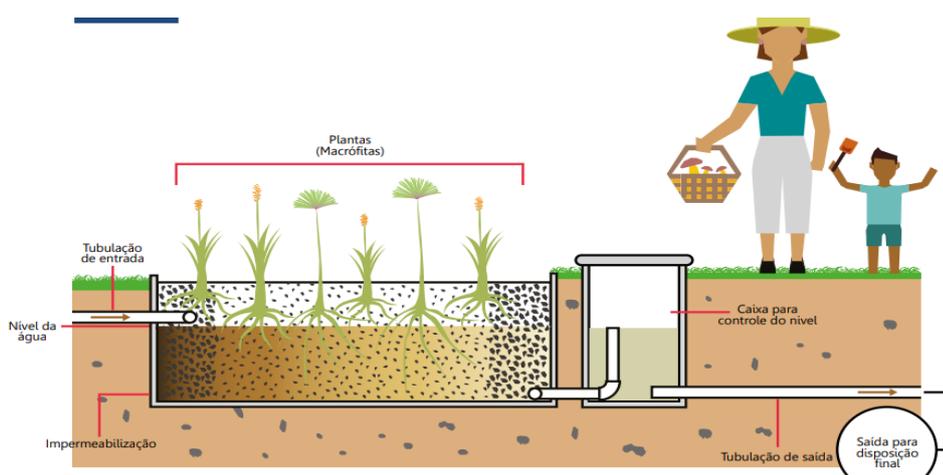
Dentre as desvantagens desses sistemas está o planejamento e projeção dessas unidades. É necessário que a escolha da tecnologia de tratamento de esgoto seja a mais adequada para cada situação, sendo avaliadas variáveis locais, como disponibilidade de água, e características do solo, entre outros. Em locais com solos muito adensados, dependendo da escolha do tipo sistema pode haver a sobrecarga e contaminação de solos. Caso o sistema seja construído muito próximo a reservas de água superficiais ou subterrâneas, pode ocorrer a contaminação da água por nitratos, fosfatos, patógenos, entre outros provenientes do sistema. A escolha da tecnologia deve assegurar proteção da qualidade do meio ambiente, necessitando em muitos casos a promoção a um tratamento em nível avançado (COURY, 2020). Além disso, sistemas descentralizados não são regulamentados e ainda são pouco difundidos (TONETTI, 2018).

Uma das diferenças marcantes em relação às ETEs convencionais e as tecnologias individuais é a possibilidade de segregação do esgoto doméstico em duas frações distintas, águas cinza (provenientes de pias, máquinas de lavar e chuveiros, e as águas negras (provenientes do vaso sanitário) (TONETTI, 2018). Quando a separação de efluentes é adotada, as águas negras podem ser direcionadas para o tratamento anaeróbio e as águas cinzentas podem ser submetidas a tratamento e posterior reutilização. Essa prática, difundida no continente europeu, é adotada em

virtude da possibilidade de recuperação de nutrientes e da água advindos dos esgotos domésticos (MESQUITA,2019).

Um exemplo usado desde os anos 1950 são os sistemas alagados construídos (*constructed wetlands*), usados para o tratamento de águas cinzas e reuso da água. São sistemas de plantas semiaquáticas que realizam a depuração da água em terrenos inundados, podendo ser naturais ou construídos (VERHOEVENA,1999). A Figura 4 apresenta um modelo de *wetland* de fluxo horizontal subsuperficial. As *wetlands* são pouco profundas (< 1,0 m) e normalmente possuem material particulado em seu interior, que auxiliam o crescimento das plantas e microrganismos. As plantas aquáticas atuam na remoção de poluentes e favorecem a fixação dos microrganismos degradadores de matéria orgânica (TONETTI, 2018).

Figura 4. Modelo de tratamento de águas cinzas por wetland.



Fonte: TONETTI, 2018

Outras tecnologias alternativas locais podem auxiliar a população não atendida por sistemas centralizados de tratamento. Como o círculo de bananeira, que utiliza as águas cinzas da residência na produção de alimento pelo reuso da água, geralmente seguidos de processos físicos de filtração, ou o “banheiro seco” que não utiliza água para a descarga e pode ser uma alternativa de tratamento simplificado para locais com escassez hídrica ou sem atendimento da rede pública de abastecimento de água. (TONETTI, 2018)

No Brasil, a Lei 14.026/20 legitima a adoção de métodos, técnicas e processos que considerem as peculiaridades locais e regionais. Contudo, a abordagem descentralizada é pouco discutida no nível federal. A ausência de uma clara definição

da responsabilidade de gestão desses sistemas em legislação tende a criar falhas e setores descobertos, prejudicando a implementação bem-sucedida de tais sistemas (MESQUITA, 2019).

Sistemas descentralizados são muitas vezes tidos como sinônimos de precariedade e subdesenvolvimento, sendo considerados inferiores a outras soluções disponíveis para os grandes centros urbanos, contudo a estratégia de descentralização se mostra cada vez mais complementar e não oposta à de centralização do tratamento de esgotos para a universalização desses serviços (TONETTI, 2018).

O tratamento local de esgoto é muito difundido e incentivado dentro da permacultura. Permacultura é uma linha de conhecimento que estuda *designs* sustentáveis de aproveitamento e preservação de recursos e energia nos ecossistemas terrestres. Pode-se comparar ao princípio de Lavoisier “*nada se cria, tudo se transforma*”, nessa ciência os ecossistemas são vistos de maneira permanente, nada sai do ciclo da natureza, e tudo pode retornar às cadeias da vida contribuindo de alguma forma. Com a urbanização houve uma ruptura da sociedade com os ciclos hidrológicos, energéticos e de recursos que a cercam, distante do conceito de Permacultura, sendo um dos motivos para a falta de prioridade dada ao saneamento, e a terceirização do manejo dos resíduos e dos próprios dejetos, fontes de nutriente (ANDERSSON, 2016).

1.4.1 Tanque de Evapotranspiração

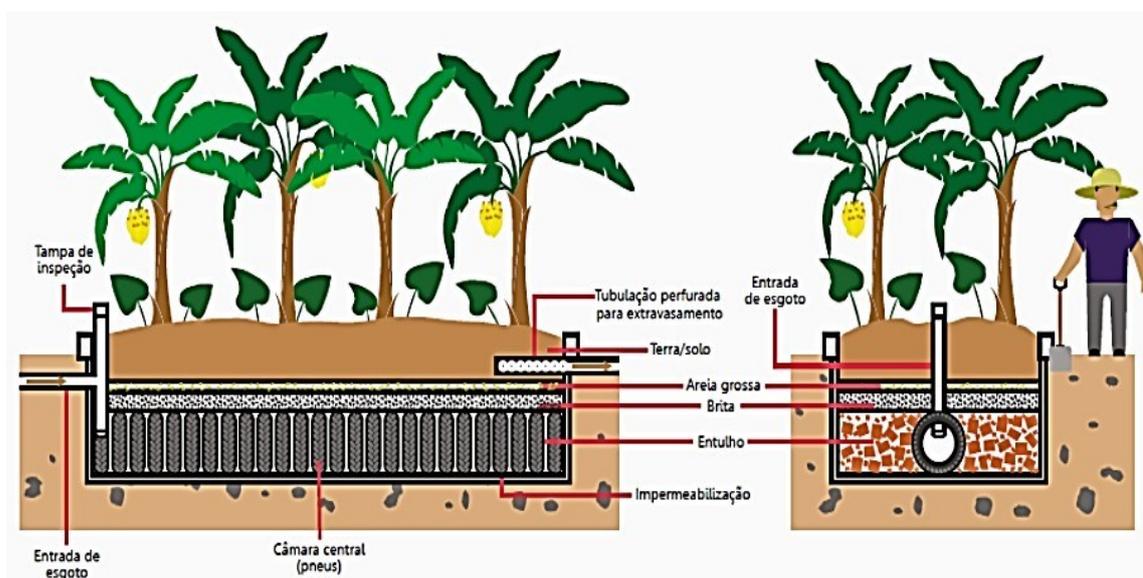
Um sistema alternativo aos métodos convencionais de tratamento de esgoto doméstico que parece ser eficiente no controle da dispersão de poluentes emergentes é o Tanque de Evapotranspiração (TEvap), e que foi utilizado como sistema sanitário alternativo avaliado. Este sistema foi criado pelo permacultor Tom Watson, nos EUA, com nome de “Watson Wick” e adaptado por vários permacultores brasileiros. Diversos deles já foram implantados com sucesso nos Estados Unidos e no Brasil (GALBIATTI, 2009).

Esse sistema deve receber somente o efluente do vaso sanitário, as águas negras, por apresentar volume limitado para a disposição e não ocorrer extravasamento de água do sistema. Trata-se de um sistema fechado, em que o

efluente retorna à atmosfera em forma de evapotranspiração (GALBIATTI, 2009). O sistema é composto por um tanque impermeabilizado, preenchido com diferentes camadas de substrato, uma câmara anaeróbia construída com material permeável e plantas. A câmara anaeróbia pode ser feita com pneus usados e receberá diretamente o efluente dos vasos sanitários (VELOSO, 2020). Ao longo do tempo, a água do efluente biodegradada na câmara anaeróbia ascende por capilaridade pelo solo, sendo filtrada pelas camadas de substrato, ou é absorvida pelas raízes das plantas que utilizam essa água para seus processos biológicos. São cultivadas na parte superficial do sistema espécies vegetais com folhas largas como bananeiras e taioba, para obter maior índice de transpiração das plantas (TONETTI, 2018).

Evapotranspiração é a transferência da água para o meio atmosférico que se dá pelos mecanismos de evaporação e transpiração. A evaporação é a transferência da água superficial do estado líquido para o gasoso. A transpiração é a evaporação da água pelas folhas das plantas retirada do solo pelas raízes (SPERLING, 2005). Como o tanque TEvap preserva o efluente dentro da câmara isolada e elimina a água por evapotranspiração, não há necessidade de pós-tratamento ou de contato direto dos usuários com o efluente (SABESP, 2019). A Figura 5 apresenta as vistas longitudinais e transversais de um sistema de evapotranspiração.

Figura 5. Esquema de Tanque de Evapotranspiração.



Fonte: Tonetti, 2018

São muitas as vantagens de utilização deste sistema, dentre elas estão a possibilidade de alta eficiência no tratamento, principalmente em relação aos parâmetros físico-químicos (Tabela 1), os baixos custos de implementação e fácil manejo, que consiste basicamente na poda das espécies vegetais utilizadas e baixo consumo de energia. É tolerante a variabilidade de carga com o uso, não utiliza produtos químicos no efluente, promove harmonia paisagística e aplicação comunitária (EMATER, 2022). Há recomendação de se evitar hortaliças que tenham raízes consumidas cruas e hortaliças rasteiras para cultivo nesse sistema (VELOSO, 2020).

Tabela 1. Média e desvio padrão da análise físico-química de amostras retiradas na entrada e saída de uma Estação de Tratamento por Evapotranspiração.

Parâmetros físico-químicos	Entrada da TEvap	Saída da TEvap
Turbidez (NTU)	481 ± 291	88 ± 44
Coliformes Totais (NMPx100mL⁻¹)	1.7 × 10 ⁷ ± 1.5 × 10 ⁷	3.2 × 10 ⁷ ± 6.9 × 10 ⁷
<i>E. coli</i> (NMPx100mL⁻¹)	5.2 × 10 ⁶ ± 4.7 × 10 ⁶	3.7 × 10 ⁶ ± 5.3 × 10 ⁶
DQO (100mL⁻¹)	723 ± 363	406 ± 257
PO₄⁻³ (mg-PL⁻¹)	54.5 ± 20.3	43.2 ± 30.7
NH₃ (mg-N L⁻¹)	326.9 ± 81.0	46.2 ± 96.7
Nitrogênio total (mg-N L⁻¹)	335.4 ± 89.3	227.0 ± 145.4
DBO (100mL⁻¹)	361 ± 237	72.8 ± 24.9
Sólidos totais (mgL⁻¹)	1138 ± 249	747 ± 205
Sólidos totais em suspensão (mg L⁻¹)	386 ± 200	38 ± 12
Alcalinidade (mg L⁻¹)	816 ± 341	1062 ± 251

Fonte:PAULO, 2013

1.5 Antibióticos e resistência antimicrobiana

Os microrganismos (bactérias, fungos, vírus e parasitas) desempenham funções de fundamental importância no meio ambiente, principalmente as relacionadas com a transformação da matéria dentro dos ciclos biogeoquímicos, como a degradação de matéria orgânica nos esgotos (SPERLING, 2005). A resistência

antimicrobiana (RAM) é a capacidade de microrganismos de resistirem aos antimicrobianos, tornando-os inefetivos (SILVA, 2020).

Antimicrobiano se refere a qualquer substância utilizada no tratamento de doenças infecciosas, quer pela inibição, ou morte do patógeno. Podem ser de origem natural ou semissintéticas, de origem natural e modificada quimicamente (CARRAMASCHI, 2019). A RAM pode constituir uma propriedade intrínseca de uma espécie bacteriana ou uma capacidade adquirida, pela alteração do DNA da bactéria, por mutação no DNA nativo, ou pela introdução de um DNA entre espécies diferentes de bactérias (ANVISA, 2007).

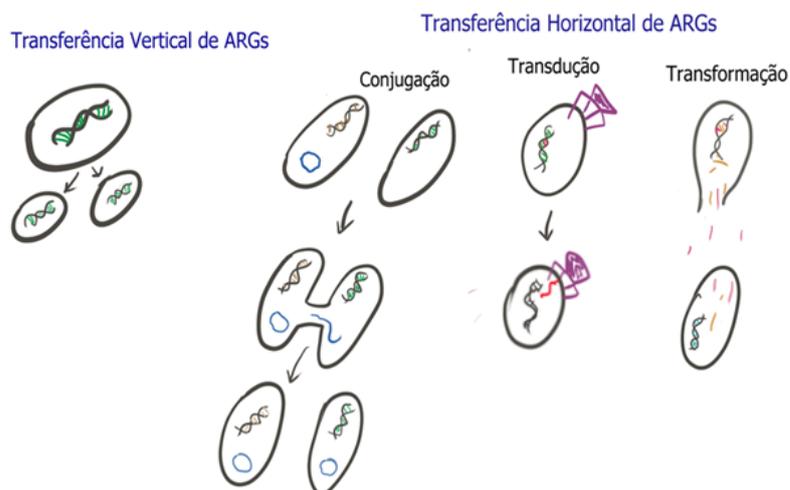
Propriedades intrínsecas de resistência antimicrobiana são transmitidas verticalmente à prole (TVG), tais como mutações que atribuem resistência antimicrobiana no DNA nativo de uma bactéria (ORTEGA, 2019). Para adquirir resistência, a bactéria pode ter seu DNA alterado por transferência horizontal de genes (THG), seja de genes de resistência (GRAs), ou elementos genéticos móveis (EGM) entre bactérias (NASCIMENTO, 2022).

É conhecido que a disseminação da RAM pode ocorrer devido à pressão seletiva exercida pela presença de poluentes químicos, como a presença de moléculas de antimicrobianos no ambiente (KNIGHT, 2021). Estudos indicam que apenas 15% dos antibióticos são metabolizados pelo organismo, o restante é descartado no ambiente, além disso a maioria dos antibióticos é solúvel em água, assim resíduos de antimicrobianos podem contribuir com a pressão seletiva no ambiente (PEI, 2019). Os GRAs presentes em patógenos humanos podem ter surgido em diferentes seres vivos, a partir da participação do ambiente como reserva ou local de transmissão desses genes (LIRA, 2020).

É conhecido que a disseminação da RAM pode ocorrer devido à pressão seletiva exercida pela presença de poluentes químicos, como a presença de moléculas de antimicrobianos no ambiente (KNIGHT, 2021). Estudos indicam que apenas 15% dos antibióticos são metabolizados pelo organismo, o restante é descartado no ambiente, além disso a maioria dos antibióticos é solúvel em água, assim resíduos de antimicrobianos podem contribuir com a pressão seletiva no ambiente (PEI, 2019). Os GRAs presentes em patógenos humanos podem ter surgido em diferentes seres vivos, a partir da participação do ambiente como reserva ou local de transmissão desses genes (LIRA, 2020).

Na THG, a bactéria pode adquirir resistência por meio de EGMs, seja por conjugação pelo uso de plasmídeos, pela transdução com a participação de bacteriófagos (vírus que utilizam material genético de bactérias), pela transformação com DNA livre (Figura 6), ou por meio de elementos genéticos transponíveis (*transposons* e sequências de inserção), que são pedaços de DNA que codificam enzimas pra clivagem, remontagem, sitio de reconhecimento, ou extremidade com sequências de inserção do DNA, podendo levar à resistência antimicrobiana (PAZDA, 2019).

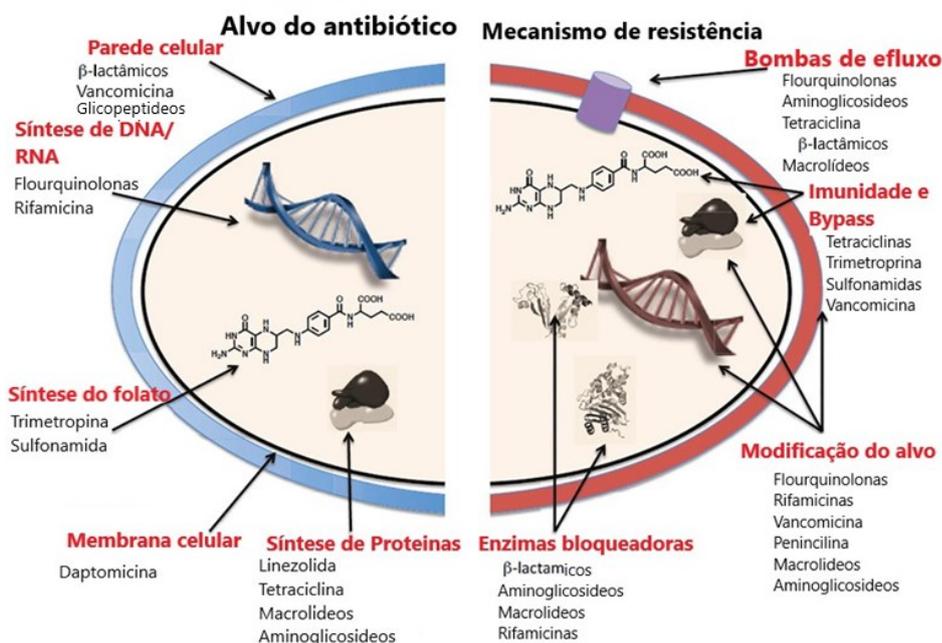
Figura 6. Mecanismos de transferência de genes de resistência



Fonte: Do autor, 2022

Os antibióticos diferem entre si nas suas características físicas, químicas, farmacológicas, no espectro e mecanismo de ação, podendo se diversificar quanto ao alvo seletivo (Figura 7), velocidade em chegar ao alvo, espectro de ação, entre outros.

Figura 7. Principais mecanismos de ação e de resistência aos antimicrobianos



Fonte: PADZA, 2019.

Nesse estudo, os antibióticos que foram usados para o isolamento bacteriano foram: ceftazidima, meropenem, colistina, oxacilina e vancomicina. A resistência a ceftazidima, meropenem pode estar relacionada a produção de β -lactamases ESBL e KPC (POGUE, 2019; SHIELDS, 2017), os antimicrobianos oxacilina e vancomicina foram utilizados para a avaliação da RAM por bactérias Gram positivas (NOGUEIRA, 2019), e a colistina foi utilizada por ser considerado um antimicrobiano de último recurso (SILVEIRA, 2019).

A ceftazidima pertence ao grupo das cefalosporinas de terceira geração, também uma subclasse dos β -lactâmicos. São mais potentes contra bacilos gram-negativos facultativos. O meropenem é incluído na classe dos carbapenêmicos, uma subclasse de β -lactâmicos que possui um anel beta-lactâmico que os difere das demais (ANVISA, 2022). Suas peculiaridades estruturais garantem um amplo espectro de atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (GUGLIERI, 2020). A oxacilina pertence à classe dos β -lactâmicos com atividade de amplo espectro, incluindo ação contra Gram negativos, são penicilinas semissintéticas.

A vancomicina pertence à classe dos glicopeptídeos, que atuam no último estágio de síntese da parede celular de peptidoglicano, exclusivamente em bactérias

Gram positivas. A colistina, da classe das lipopeptídeo cíclicos, forma um grupo de antimicrobianos ativo contra diversas bactérias Gram negativas. Interage com a molécula de polissacarídeo da membrana externa dessas bactérias, sem necessidade de entrar na célula, também possui atividade antiendotoxina, neutralizando o lipídeo A da molécula de lipossacarídeo, a endotoxina da bactéria GN (ANVISA, 2022). Algumas espécies como: *Proteus* spp., *Providencia* spp. e *Serratia* spp. apresentam resistência intrínseca às polimixinas (CARRAMASCHI, 2019).

1.5.1 Resistência antimicrobiana em ETEs

Os esgotos estão entre os mais relevantes reservatórios de resistência antimicrobiana (RAM) nos ambientes urbanos. A abundância de carbono, fósforo e outros nutrientes, uma variedade de aceptores de elétrons como oxigênio ou nitrato, a presença de partículas nas quais as bactérias podem se adsorver, pH e temperaturas estáveis são fatores que fazem do esgoto um ambiente favorável para o desenvolvimento da diversidade de microrganismos (MANAIA, 2018).

As ETEs são prováveis pontos críticos para a disseminação da resistência a antimicrobianos, pois oferecem condições convenientes para a proliferação de bactérias resistentes a antimicrobianos (BRA) (PADZA, 2019). A microbiota desses efluentes é composta por bactérias de origens diferentes e muitas delas abrigam GRAs. Assim, ETEs têm papel fundamental na proteção do meio ambiente, em especial corpos hídricos (MANAIA, 2018). Já foram detectados EGMs em ETEs de diferentes países (PAZDA, 2019).

Estudos desenvolvidos em ETEs com processos de desinfecção mais sofisticados, com UV, ozonização, processos oxidativos avançados ou com os biorreatores de membrana (MBRs) estão apresentando eficiências na remoção de genes de resistência e de plasmídeos carreadores de GRAs (LIRA, 2020). Em especial o esterilizador de radiação ultravioleta, pela sua capacidade de inativar os microrganismos através da alteração de seu DNA ao absorver a luz (VOLTOLINI, 2021). Nesse sentido, a implementação de tecnologias avançadas adicionais ao tratamento convencional das ETEs pode ser fundamental na proteção do ambiente aquático contra a disseminação de RAM (PADZA, 2019).

No contexto brasileiro, ainda há a falta de incentivo para o estabelecimento de tecnologias mais avançadas, devido aos custos de investimentos necessários, a

necessidade de recursos para a implantação, operação e manutenção dos sistemas (ESTRELA, 2019). A água reutilizada pode constituir um veículo de transmissão de doenças e dessa maneira se tornar um problema de saúde pública e/ou animal (ARY, 2018). Em alocações onde o esgoto não é tratado, as BRAs podem se disseminar facilmente, por exemplo, por meio de água reutilizada (LIRA, 2020). A detecção desses poluentes nos corpos hídricos e águas subterrâneas evidencia a necessidade de tomadas de ações preventivas (HOLMES, 2016).

1.6 Saúde Única e a resistência antimicrobiana (RAM)

Desde 1800, cientistas perceberam a similaridade de processos de adoecimento entre animais e humanos, no entanto, a medicina veterinária e humana tem sido tratada separadamente desde o século XX (CDC, 2016).

Com a crise sanitária do vírus Influenza A (A/H5N1), a gripe aviária, as autoridades sanitárias e cientistas de todo o mundo reconheceram a necessidade da colaboração interdisciplinar para prevenir zoonoses, de maneira a incluir médicos e veterinários, além de ambientalistas, antropologistas, economistas, sociólogos, entre outros, denominado essa união de Saúde Única. O conceito foi aceito com grande entusiasmo por agências ambientais internacionais, como a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura a Organização Mundial da Saúde e a Organização Mundial da Saúde Animal (GIBBS, 2014).

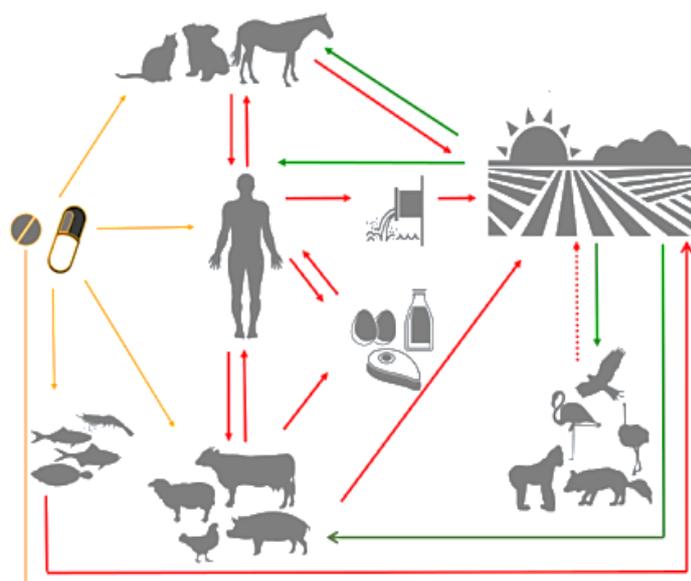
A Saúde Única relaciona a saúde humana, animal, ambiental e do ecossistema, de modo a fornecer uma estrutura útil para a pesquisa, análise e abordagem de interações complexas como a resistência antimicrobiana. Essa abordagem requer maior comunicação e colaboração entre epidemiologistas e diferentes profissionais da saúde, colaborando com os sistemas de Vigilância em Saúde (KAHN, 2019).

O consumo de antimicrobianos tem crescido mundialmente nas últimas décadas. A maioria das classes de antimicrobianos é utilizada tanto para tratamento humano quanto animal. Nas pessoas, os antimicrobianos são empregados prioritariamente para o tratamento individual de pacientes com doenças, assim como em animais domésticos. Na produção de alimentos no setor animal, os antimicrobianos são utilizados na água ou na ração para grupos grandes de animais, seja como promotores de crescimento, para profilaxia, em animais com risco de

infecções, compensando a falta de manutenção da qualidade de vida do animal no ambiente, ou metafilaxia, para animais que tiveram contato com animais doentes (COLLIGNON, 2019).

O uso de antimicrobiano como promotor de crescimento é controverso, pois é administrado para animais saudáveis, utilizado por períodos prolongados e geralmente em doses sub-terapêuticas, para favorecer a produção. Isso expõe os animais ao desenvolvimento de resistência a esses antimicrobianos e conseqüentemente a dispersão da resistência aos antimicrobianos ao longo da cadeia alimentar e dos ciclos da natureza, conforme ilustra a figura 8 (MCEWEN, 2018). Foram detectados resíduos de antibióticos em uma multiplicidade de matrizes, incluindo águas superficiais (PEI, 2019).

Figura 8. Vias de disseminação de resistência aos antibióticos entre os potenciais reservatórios: o homem, os animais e o ambiente



Fonte: AMARO, 2020.

A Saúde Única se aproxima desse problema, no que se refere à adoção de medidas para a continuidade da eficácia de antimicrobianos existentes, a partir da eliminação do uso indiscriminado desses fármacos e da limitação da propagação de infecções (MCEWEN, 2018). As iniciativas que vêm sendo tomadas pelas instituições multilaterais internacionais, e o próprio Ministério da Agricultura, Pecuária e

Abastecimento (MAPA), revelam o carácter interdisciplinar propostas pela abordagem da Saúde Única.

1.6.1 Vigilância Ambiental em Saúde e RAM

A Vigilância Ambiental em Saúde (VAS) é o conjunto de ações que buscam monitorar mudanças ambientais que possam interferir na saúde humana. Tem finalidade de prevenir e controlar fatores de risco, disponibilizando ao SUS informações e indicadores para o planejamento e execução de ações relativas às atividades de promoção da saúde e controle de doenças relacionadas ao meio ambiente (BRASIL, 2002).

A VAS foi regulamentada em 2001, pela Instrução Normativa n.º 1, de 25 de setembro, pela Funasa. Integra informações e ações de diferentes órgãos e instituições nacionais, especialmente das secretarias estaduais e municipais de saúde (BUSATO, 2019). Para a viabilização da Vigilância Ambiental em Saúde é importante a realização de estudos e análises sobre potenciais riscos ambientais à saúde antes mesmo que os efeitos possam surgir, de modo a criar um Sistema de Informação de Vigilância Ambiental em Saúde (BRASIL, 2002). O serviço de VAS no SUS apresenta características complementares às práticas da Vigilância Epidemiológica e Vigilância Sanitária (BUSATO, 2019).

Uma das estratégias para reduzir a disseminação e desenvolvimento de RAM é diminuir a pressão seletiva no ambiente, eliminando os usos inapropriados, estimulando o uso racional, entre outros (HOLMES, 2016). Algumas medidas têm sido tomadas pelas autoridades sanitárias nesse sentido.

O marco inicial no controle da RAM foi o “Programa de Controle de Infecções Hospitalares”, pelo Ministério da Saúde, que preconiza o uso racional de antimicrobianos, germicidas e materiais médico-hospitalares, em 1998. Em 2005, o Ministério da Saúde e a Anvisa estabeleceram a “Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde”, como forma de controle da disseminação de RAM nos serviços de saúde no país (ESTRELA, 2019). A Diretoria Colegiada da Anvisa publicou a RDC n.º 20, em 5 de maio de 2011, que dispõe sobre o controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos, que inclui a obrigatoriedade da venda desses medicamentos sob prescrição médica.

O uso de antibióticos na criação de animais como estimulador de desempenho está sendo banido em diversos países, com vista ao combate da RAM. Na União Europeia o uso de antimicrobianos como promotores de crescimento na agropecuária foi banido em 2016 (ESTRELA, 2019), e alguns países como Suécia, Alemanha e Dinamarca já haviam banido algumas classes desde 1995 (SILVA, 2020).

No Brasil, os antimicrobianos utilizados e autorizados como promotores de crescimento atualmente são em número bastante restrito. Foram proibidos no Brasil, pela Instrução Normativa (IN) nº 1 de 2020 pelo MAPA, antimicrobianos como a tilosina, lincomicina, tiamulina e a fabricação e importação do sulfato de colistina, pela IN nº 45 de 2016, com a finalidade de aditivos no desempenho em animais produtores de alimentos (BRASIL, 2018).

Em 2015 foi aprovado o Plano de Ação Global em RAM, assinado por 117 países no ano de 2019, dentre eles o Brasil, para o enfrentamento da RAM com uma interface multissetorial numa perspectiva de Saúde Única (MAPA, 2022). Diversas instituições multilaterais participaram do processo de formulação do Plano Global, como o Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (PNUMA), Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), Organização das Nações Unidas (ONU), Organização Mundial da Saúde (OMS), Organização Mundial do Comércio (OMC), Organização Mundial de Saúde Animal (OIE). O Plano de Ação Global sugere que as orientações e iniciativas relacionadas ao uso de antibióticos na agropecuária, à pesquisa, ao desenvolvimento e à inovação de novos antimicrobianos devem ser consideradas “bens públicos globais” (SILVA, 2020).

De modo a conscientizar a população, a Organização Mundial de Saúde Animal, no âmbito da resistência aos antimicrobianos lançou uma campanha mundial para uso racional de antimicrobianos em infecções animais, a Regra dos cinco "somentes" em que se descrevem recomendações do uso, como “somente use antimicrobianos quando prescritos por um(a) veterinário(a)” e “somente adquira antimicrobianos de fontes e distribuidores autorizados”, além disso recomendações a respeito do tempo de uso, a adequação daquele antimicrobiano, boas práticas de manejo e higiene. O MAPA lançou o lema "Todos temos um papel a desempenhar, e você como usuário de antimicrobianos pode ajudar!" para apoiar a OIE na campanha (MAPA, 2022).

Além disso, o MAPA instituiu o Programa de Vigilância e Monitoramento de RAM no âmbito da Agropecuária, também conhecido como AgroPrevine para prevenção e controle da resistência aos antimicrobianos na agropecuária, considerando o conceito de Saúde Única (MAPA, 2019), e o Monitora Alimentos (Pronamas) da Anvisa, que está em estruturação para o controle da disseminação da RAM, que envolve a aplicação de critérios de priorização como risco à saúde, consumo, notificações de nutrivigilância (ANVISA, 2021).

1.7 Metodologias genômicas na resistência antimicrobiana

A implementação da Vigilância Ambiental em Saúde, requer que as ferramentas de monitoramento sejam aptas a identificar os perfis de resistência e a similaridade entre eventos de resistência antimicrobiana. Além disso, é fundamental que elas possam prever e rastrear surtos das bactérias resistentes aos antimicrobianos e monitorar a presença de GRAs. Estudos com metodologias genômicas, como o sequenciamento completo do genoma (SCG) vêm se mostrando eficientes na investigação da RAM, demonstrando a capacidade de rastrear cepas individuais em surtos (SUKHUM, 2019).

As metodologias genômicas começaram a ser conhecidas no começo da década de 70. São técnicas que permitem identificar, na ordem correta, a sequência de nucleotídeos de uma molécula de DNA ou RNA, para conhecer a informação genética contida nessas estruturas. No ano de 1977 surgiram duas tecnologias, o sequenciamento químico de Maxam-Gilbert e o método de Sanger. Uma das diferenças é que a primeira marcava diretamente o DNA a ser sequenciado, o DNA alvo, enquanto a de Sanger marcava os fragmentos de DNA sintetizados a partir da fita molde, baseado em reações enzimáticas. Estas metodologias revolucionaram as pesquisas científicas e se difundiram rapidamente pelo mundo, sendo a base da Genômica (FIETTO, 2016).

O sequenciamento completo do DNA é uma técnica mais simples por utilizar menos etapas e por ser um método automatizado. O DNA total do organismo, é fragmentado, clonado e sequenciado, sendo utilizada com sucesso no sequenciamento do primeiro genoma bacteriano (*Haemophilus influenzae*) e

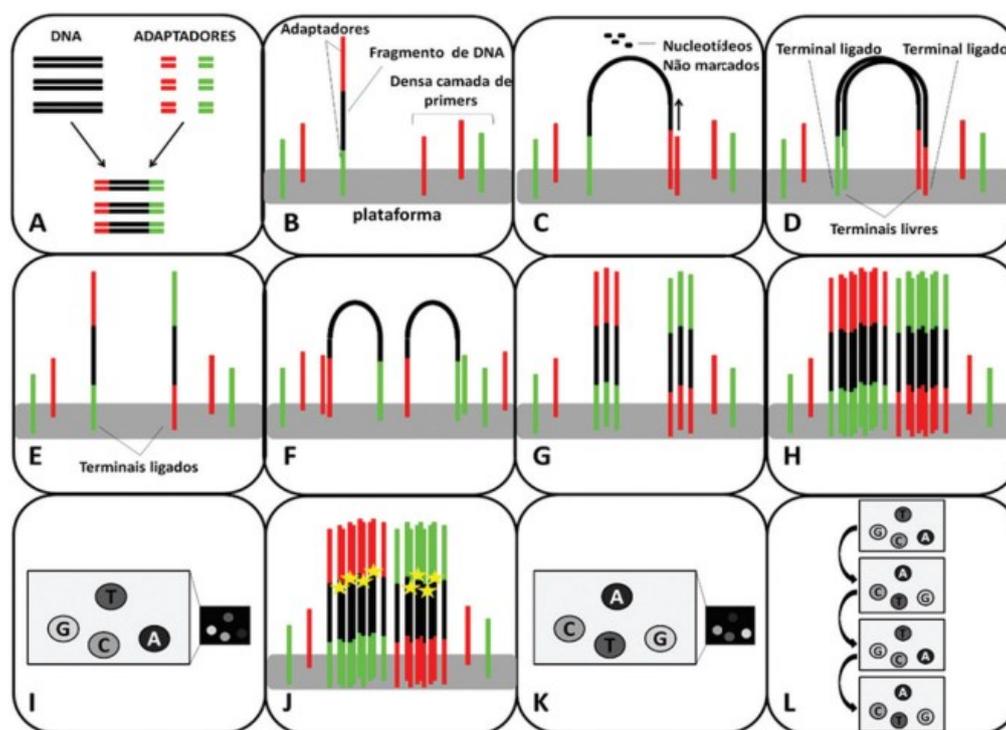
posteriormente, no sequenciamento de diversos outros genomas, destacando o humano (FIETTO, 2016).

Um avanço no estudo da Genômica são as novas tecnologias de sequenciamento (SNG) ou “sequenciadores de segunda geração”. São tecnologias voltadas para o sequenciamento do DNA em larga escala, que a partir da construção in vitro de bibliotecas genômicas, são capazes de gerar informação sobre milhões de pares de bases. Um dos sequenciadores bastante utilizados em análises genômicas é o Illumina, produzido em 2006, e que se baseia no conceito de “sequenciamento por síntese” (CARVALHO, 2016).

A Figura 9 apresenta passo-a-passo a metodologia NGS pela técnica Illumina. O princípio desta metodologia é similar ao método proposto por Sanger, pois também ocorre a síntese de uma fita complementar ao DNA alvo utilizando a DNA polimerase e nucleotídeos terminadores marcados com diferentes fluoróforos (A). Durante a preparação das bibliotecas, o DNA é clivado, e adaptadores são ligados às extremidades 5' e 3', que são fixados a *flowcell* (B) distantes o suficiente para que, após a amplificação “em ponte” (C - G), exista somente um tipo de fragmento dentro do *cluster* (H), contêm por volta de 1000 cópias de um mesmo fragmento de fita simples (FIETTO, 2016).

A *flowcell* (plataforma) é uma placa de vidro revestida por uma camada densa de oligonucleotídeos complementares aos adaptadores dos fragmentos. Após a formação dos cluster por amplificação, inicia-se o sequenciamento em síntese. Ocorre a incorporação do nucleotídeo (H-J), um laser varre a superfície(J), excitando o fluoróforo do nucleotídeo terminador e emite uma luz que permite sua identificação (K) e sua posição no suporte sólido, por uma câmera CCD (dispositivo de carga acoplada) em que as imagens registradas em cada ciclo são decodificação para determinar a sequência de bases de cada cluster na placa (L) (CARVALHO, 2016).

Figura 9. Princípio da técnica Illumina



Legenda: Preparo da amostra: o DNA genômico fragmentado e recebe adaptadores em ambas as extremidades (A), Fixação do DNA à superfície: fragmentos de fita simples se ligam à superfície dos canais da *Flow cell* (B), Amplificação em "ponte": nucleotídeos comuns e a enzima polimerase são fornecidos para iniciar a amplificação de fase sólida (C), Fragmentos se tornam de fita dupla (D), Desnaturação das moléculas de fita dupla: um processo de desnaturação deixa os moldes de fita simples ancorados ao substrato (E); Processo se repete com a formação de "pontes" (F), Desnaturação das fitas duplas amplificadas (G), Término da fase de amplificação: milhões de clusters de fragmentos de DNA de fita simples em cada canal da *Flow cell* (H), Identificação da primeira base: para iniciar o primeiro ciclo de sequenciamento, participação dos quatro nucleotídeos terminadores reversíveis marcados, primers e a enzima DNA polimerase (I), Detecção da primeira base: após a excitação pelo laser, a imagem da fluorescência capturada dos clusters na *Flow cell* (J), A identidade da primeira base é registrada para cada um dos clusters (K), Identificação da segunda base: para iniciar os próximos ciclos de sequenciamento (L)

Fonte: FIETTO, 2016

Apesar de tecnologias de sequenciamento genômico se tornarem cada vez mais rápidas e mais acessíveis, essas tecnologias ainda são onerosas e requerem maior aporte computacional que outros métodos de identificação e caracterização de patógenos (SUKHUM, 2019).

Atualmente, as abordagens metagenômicas têm possibilitado acessar todo o conjunto de genes e genomas microbianos completos de uma amostra, independentes de cultivo bacteriano, aplicando técnicas distintas de sequenciamento de segunda geração (CARVALHO, 2016).

1.8 Relevância

A ANVISA é o órgão responsável por exercer o controle sanitário, de modo a garantir a saúde pública no Brasil. É incumbida de gerenciar ações sobre o meio ambiente (ANVISA, 2019). O saneamento ambiental pode ser incluído no âmbito de responsabilidade da vigilância sanitária. A evolução da preocupação com disseminação da resistência aos antimicrobianos indica a aproximação da Vigilância Sanitária com os serviços de saneamento básico, na perspectiva de Saúde Única e da VAS.

A participação da Vigilância Ambiental pode ser uma ferramenta crucial no combate a RAM. Instrumentos da Vigilância Ambiental em Saúde podem ser utilizados na regulação de eficiência dos tratamentos de esgoto, na desinfecção de efluentes, bem como na universalização dos serviços de saneamento, reduzindo a dispersão de antimicrobianos e de microrganismos resistentes no ambiente. Sistemas de Informação em saneamento urbano podem ser usados como gerenciadores de riscos, como definidores de estratégias de prevenção de riscos, que promovam a melhoria das condições de meio ambiente e de saúde das populações (BRASIL, 2002).

O modelo convencional de tratamento de esgotos contribui para a remoção de genes de resistência (LIRA, 2020), no entanto, os altos custos associados ao sistema centralizado de esgotamento podem limitar o acesso da população a esses (SNIS, 2018). Por outro lado, sistemas alternativos de esgotamento apresentam custos mais baixos que o sistema convencional, de instalação, operação e manutenção e colabora na autonomia do usuário gerador de esgoto (TONETTI, 2018). Eles podem auxiliar na redução na demanda pelo sistema de esgotamento central (OTTERPOHL, 2002), e podem se apresentar como ferramentas de controle da disseminação da resistência aos antimicrobianos.

A resistência antimicrobiana é um dos principais desafios à medicina contemporânea, pois ameaça a eficiência do tratamento de infecções bacterianas, pode ser a causa de epidemias e/ou altas taxas de mortalidade (PAZDA, 2019). No ano de 2019 foi feita a estimativa de que cerca de 700 mil mortes sejam causadas anualmente por BRAs (ESTRELA, 2019).

A Saúde Única permite o entendimento dessa questão a partir de uma integração coerente entre diferentes níveis espaciais, envolvendo diferentes atores e

setores, como humano, veterinário, agrícola, ambiental e financeiro (SILVA, 2020). Objetiva desenhar uma abordagem interdisciplinar para solucionar problemas, a partir das interações entre essas diferentes esferas da saúde global (ONE HEALTH BRASIL, 2021).

Considerando o cenário brasileiro de desigualdades na oferta do serviço de saneamento, e a resistência antimicrobiana como um risco à saúde pública, este projeto busca a abordagem da Saúde Única para evidenciar uma alternativa de tratamento de esgoto doméstico para a população que não têm o sistema centralizado à disposição. A partir da avaliação do funcionamento de uma estação sanitária alternativa de tratamento de esgoto, o estudo pretende validar um sistema alternativo de tratamento de esgoto para as regiões sem cobertura de esgotamento sanitário, auxiliando na erradicação de doenças de veiculação hídricas e no controle da dispersão de RAM. A partir desse trabalho, sistemas locais sustentáveis de tratamento de esgoto serão divulgados, políticas públicas poderão surgir para a implementação desse tipo de tratamento em regiões excluídas dos sistemas centrais de esgotamento sanitário no Brasil, e novos estudos relacionados à microbiologia e a correlação com a RAM nesses sistemas poderão surgir.

2. OBJETIVOS

Geral

Avaliar a diversidade bacteriana e o resistoma microbiano em efluentes de sistemas alternativo e convencional por meio de abordagem microbiológica e genômica

Específico

- Isolar e identificar microrganismos a partir de meios de cultivo seletivos (antimicrobianos) em efluentes não tratados e tratados nos sistemas convencional e alternativo;
- Determinar a susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados dos 2 sistemas;
- Estabelecer os perfis de resistência aos antimicrobianos de acordo com susceptibilidade aos antimicrobianos e comparar os perfis dos isolados dos 2 sistemas de tratamento de esgoto;
- Analisar as sequências genômicas de bactérias resistentes isoladas do sistema de tratamento alternativo de esgoto.

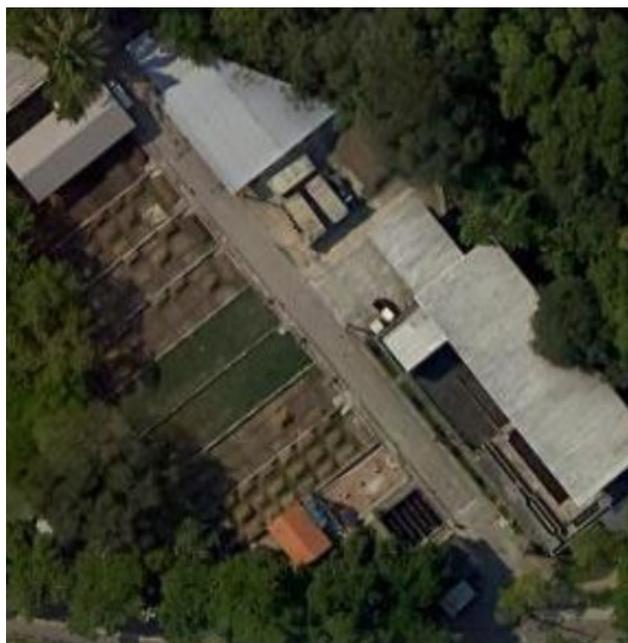
3. METODOLOGIA

3.1 Local do estudo

ETE Convencional (ECE): ETE do *campus* Manguinhos. Fundação Oswaldo Cruz, Manguinhos, Av. Brasil, 4365, Rio de Janeiro – RJ.

A estação atende ao Campus, como estação central de tratamento. A Estação possui tratamento primário e secundário, promovendo a remoção das partículas em suspensão e parte dos microrganismos contidos no efluente. O tratamento biológico é do tipo Lodo Ativado. Em seguida, o efluente tratado é lançado no corpo hídrico próximo (jusante ou montante). População rotativa média diária de: 15.489 pessoas. A figura 10 apresenta a vista aérea da estação ECE.

Figura 10. Vista aérea da ETE Fiocruz, *campus* Manguinhos

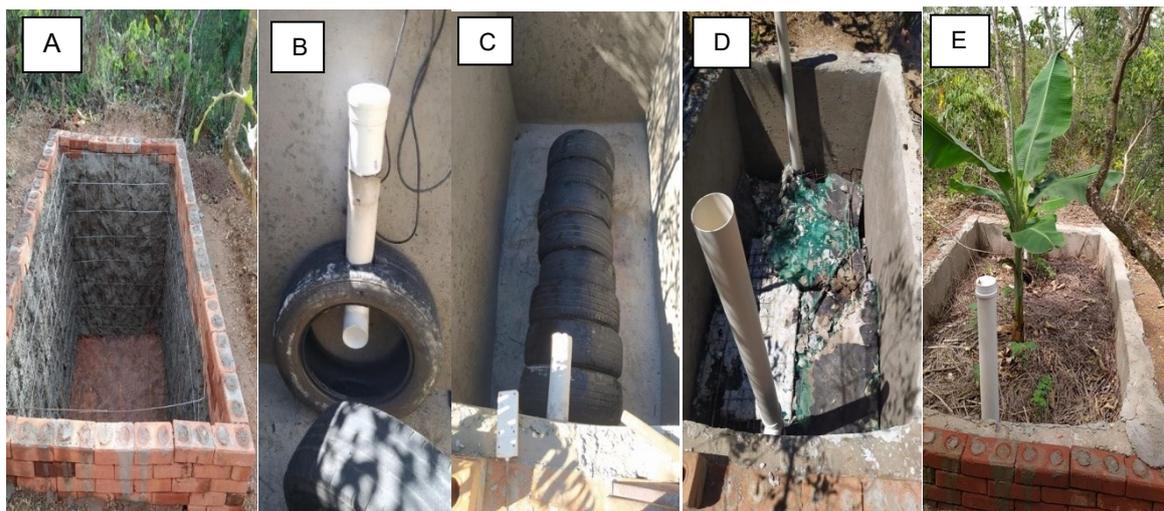


ETE Alternativa (ESA): ETE de uma residência unifamiliar, localizada em Condomínio Solar da Serra II Lago Sul, Brasília – DF.

É um sistema local de tratamento do tipo Tanque de Evapotranspiração. A estação atende a uma família de 4 pessoas. A construção do sistema de tratamento TEvap foi realizada em fevereiro de 2012, e seguiu os critérios estabelecidos por Galbianti (2009). Utilizando-se área de 1,5 metros quadrados para cada usuário do sistema, possui 2 metros de largura, 4 metros de comprimento e 1,5 metro de

profundidade, totalizando um volume de 9 metros. Possui 10 anos de tempo de uso e não apresentou extravasamento em nenhum momento, apresentando funcionamento adequado (Figura 11).

Figura 11. Etapas de construção da TEvap.



Legenda: Vala no solo e estrutura da estação TEvap (A), Cano de entrada do efluente em encaixe com pneu (B), Vala impermeabilizada e câmara de pneus (C), Cobertura de entulho na câmara de pneus (D), Estação pronta para funcionamento com bananeiras já plantadas (E).

3.2 Amostragem

8 amostras de esgoto foram coletadas (200ml), em garrafas plásticas, nos pontos da entrada e saída da ESA e ECE, em outubro de 2020 e outubro de 2021, na mesma estação climática. As amostras foram refrigeradas até serem encaminhadas ao Setor de Bactérias e Arqueas onde foram realizadas análises microbiológicas de cultivo, isolamento bacteriano, suscetibilidade aos antimicrobianos e análises genômicas.

3.3 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). As membranas com o

concentrado das amostras foram inoculadas em meios de cultivo líquido *brain heart infusion* (BHI) e manitol salgado acrescidos de antimicrobianos de diferentes classes (EUCAST, 2020) e incubadas a 37°C durante 24-48 horas (Tabela 2). Após esse período, os caldos com crescimento foram semeados em ágar BHI e incubadas a 37°C durante 24-48 horas para isolamento bacteriano. Posteriormente, os isolados obtidos foram submetidos à identificação fenotípica por meio da coloração de Gram (DUQUE, 2012) e sistemas automatizados Vitek® II e Maldi-TOF.

Tabela 2. Conjuntos de meios de cultura contendo antimicrobianos

Conjuntos de meio de cultura e de antimicrobianos		
A	BHI	Ceftazidima (4 mg/L) + Meropenem (8 mg/L)
B	BHI	Meropenem (8 mg/L) + Colistina (2 mg/L)
C	BHI	Colistina (2 mg/L)
D	Manitol salgado	Vancomicina (2 mg/L)
E	Manitol salgado	Oxacilina (2 mg/L)
F	Manitol salgado	Vancomicina (2 mg/L) + Oxacilina (2 mg/L)

3.4 Identificação dos isolados

A identificação fenotípica dos isolados foi realizada pelo sistema VITEK 2. Os isolados não identificados por esse sistema foram submetidos espectrômetro de massas *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time Of Flight* (Maldi-TOF). O equipamento VITEK II foi utilizado no setor de microbiologia do Instituto Nacional de Controle e Qualidade em Saúde (INCQS), Fiocruz.

Foi utilizado o equipamento Maldi-TOF localizado no Instituto Nacional de Infectologia (INI), Fiocruz e o programa MBT Compass para a comparação de diferentes espectros de massa dentro de um banco de dados, com os espectrogramas obtidos, obtendo a identificação microbiana.

3.5 Determinação da suscetibilidade aos antimicrobianos

A análise de suscetibilidade aos antimicrobianos foi determinado pela técnica de disco-difusão (método de Kirby-Bauer), segundo os critérios estabelecidos pelo *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST, 2020). Houve a repetição do teste, sendo realizado em triplicata.

3.5.1 Perfis de Resistência aos antimicrobianos

Os perfis de resistência foram estabelecidos de acordo com a susceptibilidade aos antimicrobianos. Os isolados que apresentaram resistência somente a um antimicrobiano foram classificados como non-MDR (não multidroga resistentes a antimicrobianos), resistência a pelo menos um antimicrobiano de três classes distintas como MDR (Multidroga resistentes a antimicrobianos), resistência a pelo menos um antimicrobiano em todas as classes, exceto ≤ 2 como XDR (Extensivamente resistente a antimicrobianos) e resistência a todos os antimicrobianos testados como PDR (Pan-resistentes a antimicrobianos) (MAGIORAKOS, 2012). Além disso, os isolados que apresentarem resistência à ceftazidima e cefepima foram classificados como possíveis produtores de ESBL (*Extended spectrum β -lactamases*), aqueles resistentes à imipenem ou meropenem como possíveis KPC (*Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase) e à ceftazidima e imipenem ou meropenem como possíveis MBLs (Metallo- β -lactamases) (MIRANDA, 2015).

3.6 Sequenciamento de nova geração

Dois isolados resistentes a vários antibióticos recuperados da ESA foram selecionados para sequenciamento completo do genoma, por NGS. Foram escolhidos aqueles que apresentaram maior perfil de resistência e possibilidade de produção de β -lactamases. Após a extração e purificação dos DNAs, O DNA dos isolados foi quantificado e suas concentrações ajustadas para 0,4 ng/ μ L.

A biblioteca foi preparada utilizando Nextera XT kit (Illumina Inc, EUA) e o sequenciamento foi realizado na plataforma automatizada Illumina MiSeq (Illumina,

EUA). A reação de sequenciamento foi constituída de 2,5 µL de DNA, 5 µL de iniciador (Tagment DNA Buffer- TD), 2,5 µL de reativo (ATM), 2,5 µL de tampão NT (Neutralize Tagment Buffer), em um volume final de 10 µL. A reação de sequenciamento foi conduzida em termociclador com as seguintes condições: 12 ciclos de 94°C por 10 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. Para limpar as bibliotecas, foram adicionados 6 µL de esferas (*beads*) AMPure XP a 10 µL de biblioteca. Os tubos foram colocados em estante magnética, e sem encostar nos *beads*, contendo o DNA, foi removido o sobrenadante; esse processo foi realizado duas vezes. Depois foram adicionados 27 µL de RSB (Tampão de ressuspensão) para recuperar o sobrenadante com o DNA em novos microtubos identificados. Para quantificar a biblioteca foi utilizado o fluômetro Qubit™.

Os nucleotídeos ambíguos com base no índice de qualidade e nas sequências do adaptador foram então aparados usando a ferramenta Fastp (Chen et al, 2018), as sequências com um Phredscore inferior a 30 foram removidas. A montagem de leituras aparadas e sequências de alta qualidade foi realizada em Unicycler (WICK et al., 2017). A qualidade dos genomas montados foi avaliada usando QUAST 2.0. A avaliação genômica da resistência antimicrobiana foi realizada utilizando o RGI do CARD para investigar a presença de GRA adquiridos e o ResFinder para avaliar as mutações que induzem a resistência. Os plasmídeos foram avaliados usando PlasmidFinder v2.1 (CARATTOLI E HASMAN, 2020) e ViralVerify (ANTIPOV et al., 2020). Elementos genéticos móveis também foram avaliados usando MobileElementFinder v1.0.3 (JOHANSSON et al., 2021). Para verificar os fatores de patogenicidade e virulência (VFs) foram utilizados PathogenFinder v1.1 (COSENTINO et al., 2013) e VirulenceFinder 2.0 (MALBERG et al., 2020), respectivamente.

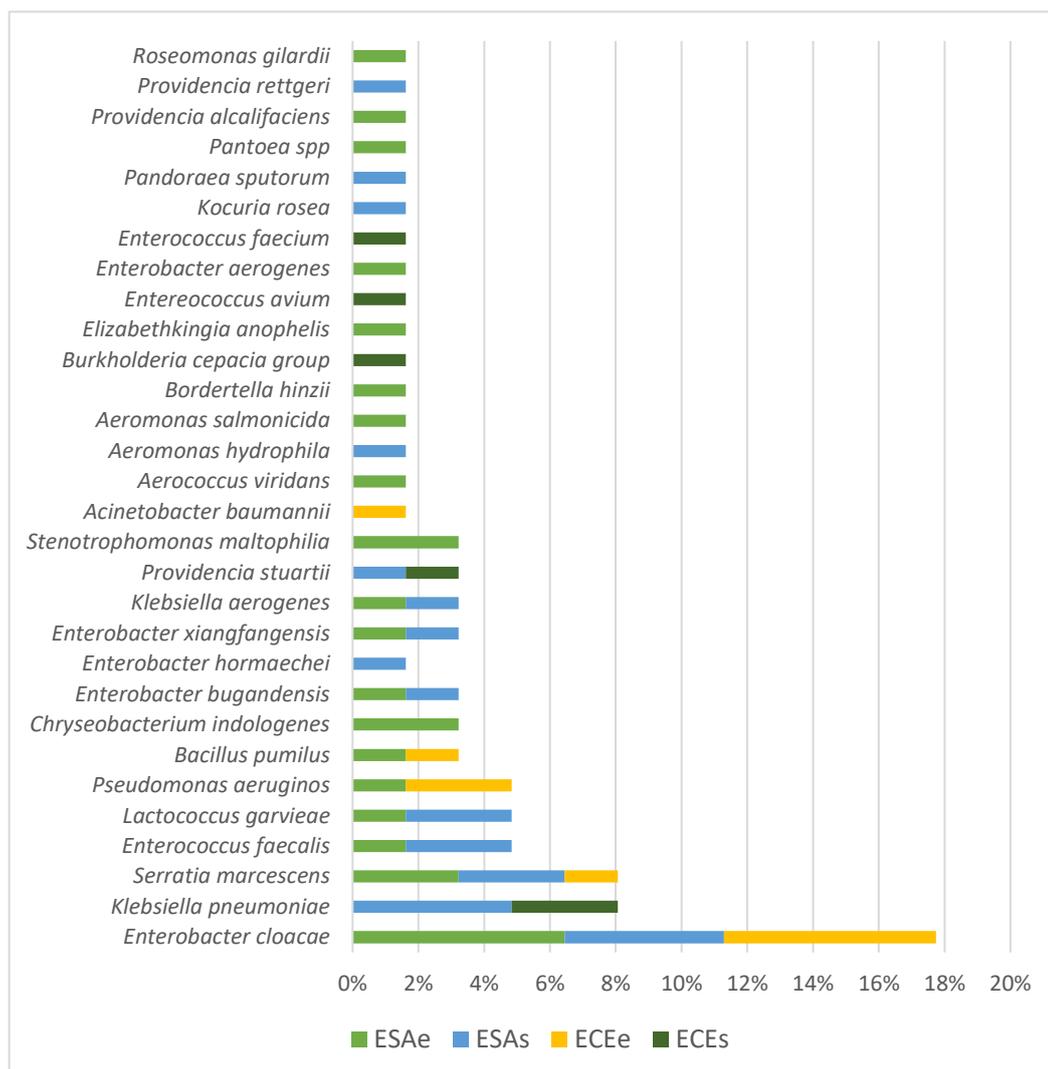
4. RESULTADOS

4.1 Isolamento e identificação

Foi verificado crescimento microbiano nos 6 meios de cultivo seletivos utilizados. A coleta 1 realizada em 2020 resultou no isolamento 78 microrganismos, sendo 54 Gram-negativos (GN) e 24 Gram-positivos (GP). Já a coleta 2 realizada em 2021 resultou no isolamento de 69 organismos, destes 34 GN e 35 GP. Na coleta 1 foi verificada a prevalência de isolados Gram-negativos, já na coleta 2 não foi observado grupo predominante.

Na primeira coleta foram identificados 62 isolados, sendo 40 desses pelo sistema Vitek II, e os 22 restantes pelo sistema Maldi-TOF, ambos identificados a nível de espécie. Destes, 43,5% (27/62) pertencentes à ordem *Enterobacteriales*, sendo 16% de *Enterobacter cloacae* e 35 isolados de diferentes espécies, incluindo a *Elizabethkingia anophelis* (Figura 12).

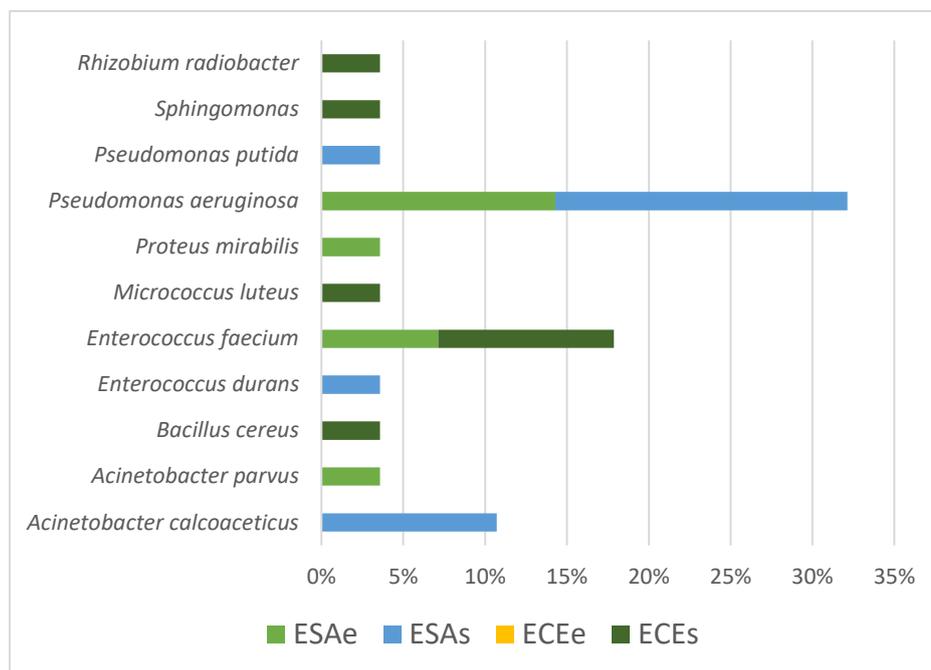
Figura 12. Percentual de microrganismos identificados na coleta 1



Legenda: Estação Alternativa de Tratamento (ESAe - entrada e ESAs - saída); Estação Central de Tratamento de Esgoto (ECEe - entrada e ECEs - saída)

Na coleta 2 foram identificados 28 isolados pelo sistema Maldi-TOF, houve prevalência de *Pseudomonas spp.* 35% (10/28), sendo 32% (9/28) de *Pseudomonas aeruginosa* (Figura 13).

Figura 13. Percentual de microrganismos identificados na coleta 2

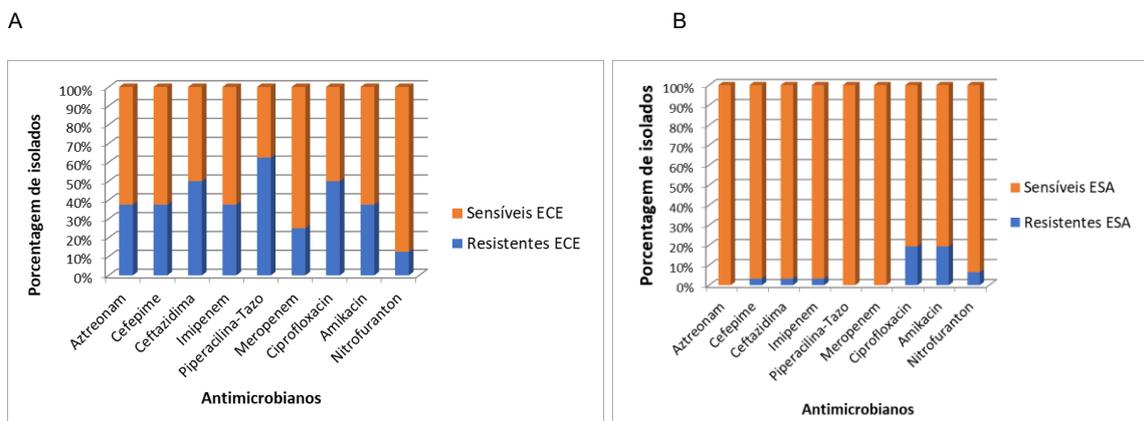


Legenda: Estação Alternativa de Tratamento (ESAe - entrada e ESAs - saída); Estação Central de Tratamento de Esgoto (ECEe - entrada e ECEs - saída)

4.1 Resistência antimicrobiana

Foi realizada a avaliação da suscetibilidade de 38 isolados da primeira e segunda coletas. Como critério de seleção, aqueles que apresentaram prevalência na identificação, sendo, *Enterobacteriales* (n=27), na primeira coleta e *Pseudomonas* spp. (n=10) na segunda coleta (Figuras 14 A e B). Além desses, uma espécie pertencente a classe *Flavobacteriaceae* (n=1), *Elizabethkingia anophelis*, recuperada da entrada da estação, que foi selecionada para a avaliação da suscetibilidade por sua relevância no estudo da resistência aos antimicrobianos, *E. anophelis* está relacionada a surtos clínicos, tanto nos EUA (2016), quanto recentemente no Brasil, em São Paulo. Um estudo anterior realizado por nosso grupo de trabalho revelou a presença de isolados XDR e PDR dessa espécie.

Figura 14. Suscetibilidade aos antimicrobianos de Enterobacteriales e Pseudomonas spp. das 2 coletas



ECE- Estação Central de tratamento – FIOCRUZ; ESA- Estação Alternativa de Esgoto

Na primeira coleta, dos 27 isolados de *Enterobacteriales* (9 ECE 18 ESA), 15 apresentaram resistência a pelo menos um antibiótico, os outros 12 foram sensíveis aos 9 antibióticos analisados. Dos 15 isolados que apresentaram resistência, 60 % (9/15) apresentou perfil de resistência não MDR, 20% (3/15) perfil de resistência MDR e 13,3 % (2/15) perfil XDR (Tabela 3).

Tabela 3. Perfis de suscetibilidade de *Enterobacteriales* das duas estações de tratamento de esgoto.

Isolados	Ponto	Perfil	ATM	CPM	CAZ	IMP	PIT	MER	CIP	AMI	NIT
<i>Serratia marcescens</i>	ECEe	XDR	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Enterobacter cloacae</i>	ECEe	MDR	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ECEs	XDR	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Providencia stuartii</i>	ECEs	MDR	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ECEs	não MDR	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Providencia alcalifaciens</i>	ESAe	MDR	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ESAe	não MDR	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Enterobacter xiangfangensis</i>	ESAe	não MDR	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Serratia marcescens</i>	ESAe	não MDR	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Enterobacter cloacae</i>	ESAe	não MDR	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Enterobacter bugandensis</i>	ESAe	não MDR	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Providencia stuartii</i>	ESAs	não MDR	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Serratia marcescens</i>	ESAs	não MDR	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Enterobacter cloacae complex</i>	ESAs	não MDR	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ESAs	não MDR	■	■	■	■	■	■	■	■	■

Legenda: Estação Alternativa de Tratamento (ESAe - entrada e ESAs - saída); Estação Central de Tratamento de Esgoto (ECEe - entrada e ECEs - saída); Aztreonam (ATM), Cefepime (CPM), Ceftazidima (CAZ), Imipenem, (MP), Piperacilina-Tazobactam (PIT), Meropenem (MER); Ciprofloxacina (CIP), Amikacina (AMI); Nitrofurantoina (NIT).

A susceptibilidade de *E. anophelis* aos antimicrobianos foi avaliada frente a 14 antimicrobianos, incluindo agentes como beta-lactâmicos (cefalosporinas, penicilinas e carbapenêmicos), quinolonas, aminoglicosídeos, glicilciclina e polimixinas, apresentando resistência a todos os antimicrobianos testados e perfil de resistência PDR (Tabela 4).

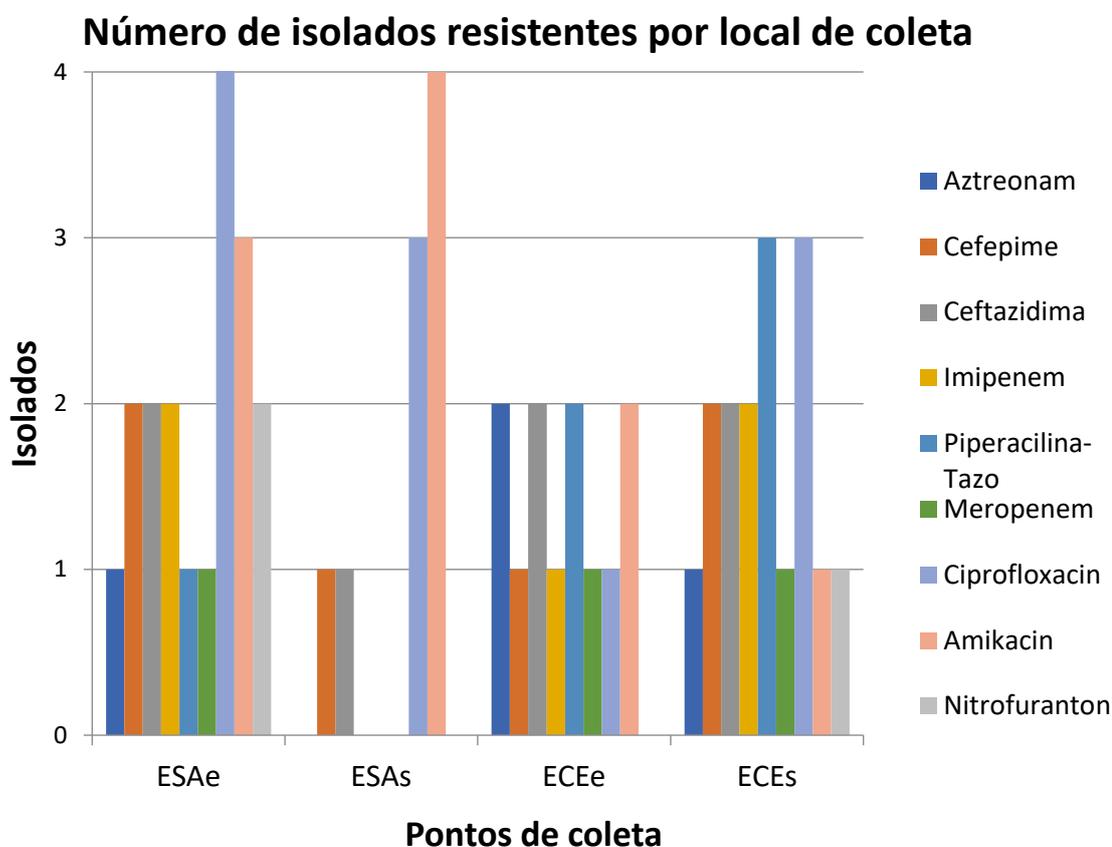
Tabela 4 Perfil de suscetibilidade de *E. anophelis* recuperada da entrada da estação alternativa.

<i>Elizabethkingia anophelis</i>	Piperacilina-Tazobactam	>= 128
	Cefuroxima	>= 64
	Cefoxitina	>= 64
	Ceftazidima	>= 64
	Ceftriaxona	>= 64
	Cefepima	>= 64
	Imipenem	>= 16
	Meropenem	>= 16
	Amikacina	>= 64
	Gentamicina	>= 16
	Ciprofloxacina	2
	Tigeciclina	4
	Colistina	>= 16

Na segunda coleta, os 09 isolados de *Pseudomonas aeruginosa* testados apresentaram sensibilidade aos antimicrobianos testados, e o isolado *P. putida*, foi resistente a ceftazidima, cefepime e ciprofloxacina, apresentando perfil de resistência MDR.

De modo geral, os isolados da ECE (n=5) apresentaram resistência a 88% (8/9) dos antimicrobianos analisados na entrada e saída da estação, enquanto na ESA (n=12) os isolados apresentaram resistência a 88% (8/9) dos antimicrobianos na entrada e 44% (4/9) na saída da estação (Figura 15).

Figura 15. Relação de isolados resistentes aos antimicrobianos na entrada e saída das estações



Legenda: Estação Alternativa de Tratamento (ESAe - entrada e ESAs - saída); Estação Central de Tratamento de Esgoto (ECEe - entrada e ECEs - saída);

Na primeira coleta foram obtidos 4 isolados prováveis produtores de ESBL, *Klebsiella pneumoniae* (saída da ECE), *Providencia stuartii* (saída da ECE) e *Serratia marcescens* (entrada da ECE) e *Elizabethkingia anophelis* (Entrada ESA). Os isolados de *K. pneumoniae* e *S. marcescens* e *E. anophelis* também foram considerados possíveis produtores das enzimas KPC e MBL. Na segunda coleta foi observado um possível produtor de ESBL, *P. putida* (saída da ESA).

1.9 Sequenciamento genômico

Inicialmente foram selecionados 2 isolados para o sequenciamento genômico, da ESA (*E. anophelis* (entrada da ESA) *P. putida* (saída da ESA)). *E. anophelis*

apresentou maior perfil de resistência observado (PDR), e foi classificada como possível KPC, ESBL e MBL. A *P. putida* aparentou ser produtora de ESBL. Os genomas dos 2 isolados apresentaram teor de C+G entre 35,5% - 62% e comprimento médio dos genomas 4,2 - 5,8 MB (Tabela 5).

Tabela 5 Características dos genomas obtidos

	<i>Elizabethkingia anophelis</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
Tamanho médio do genoma (MB)	4,2	5,8
Conteúdo GC	35,5%	62%
N50	58.896	132536
Contigs	141	81
Número de sequencias codificadoras	4122	5375

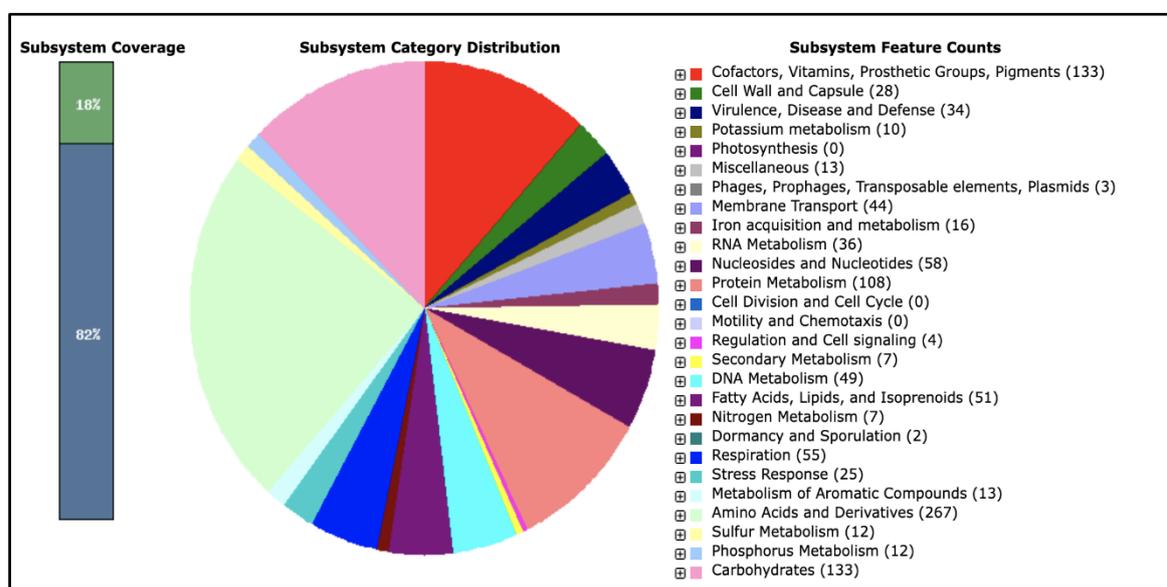
1.9.1 *Elizabethkingia anophelis*

Após a remoção de *contigs* curtos (<500 pb) e sequências com potencial contaminação, o genoma de *E. anophelis* resultou em 141 *contigs* com um N50 de 58.896 pb. Esse compreende 4,2MB com um teor de G+C de 35,5%. Possui 4122 sequencias codificadoras, incluindo 41 RNAs.

A partir da anotação genômica na plataforma RAST foi realizada uma reconstrução combinando genes a categorias funcionais de subsistemas metabólicos predefinidos. O gráfico gerado pelo RAST mostra a diversidade de genes anotados e classificados em subsistemas para grupos funcionais encontrando 256 subsistemas. Dentre eles, destacamos os Subsistemas de Resistência e o Subsistema de Fagos, Profagos, Elementos transponíveis e Plasmídeos (Figura 16).

A resistência às fluoroquinolonas foi representada pelo gene *adeF*. Foram revelados genes de resistência antimicrobiana consistentes com seus fenótipos de resistência, incluindo metalo- β -lactamase (*bla*_{GOB-1} e *bla*_{B-1}) e gene de resistência a agentes desinfetantes, *qacG*. De acordo com as análises do *PathogenFinder*, este isolado não foi previsto como patógeno com probabilidade de 0,30.

Figura 16. Representação gráfica da distribuição de Subsistemas no genoma de *E. anophelis*



A partir do MLST do core genoma (cgMLST) de *E. anophelis* (1546 genes altamente conservados da espécie) foi construída uma *minimum-spanning tree* usando o software GrapeTree (versão 1.5.0). O perfil cgMLST do isolado foi comparado no banco de dados Institut Pasteur com aqueles disponíveis publicamente. (<http://bigsd.b.pasteur.fr/elizabethkingia/>) (NIELSEN, 2018) (Figura 17)

Como apresentado na árvore, este isolado derivou diretamente da sublinhagem 15, de origem clínica, associada a um surto que ocorreu em Wisconsin, nos EUA, em 2016 (NIELSEN, 2018). O isolado é o único do *cluster*, e dele não deriva nenhuma sublinhagem. No entanto, em um outro estudo realizado pelo nosso grupo, foram encontrados 4 isolados de *E. anophelis*, de origem ambiental, derivadas da mesma sublinhagem 15 (NIELSEN, 2018). Os antecedentes a eles também eram de origem clínica (Figura 17 e 18).

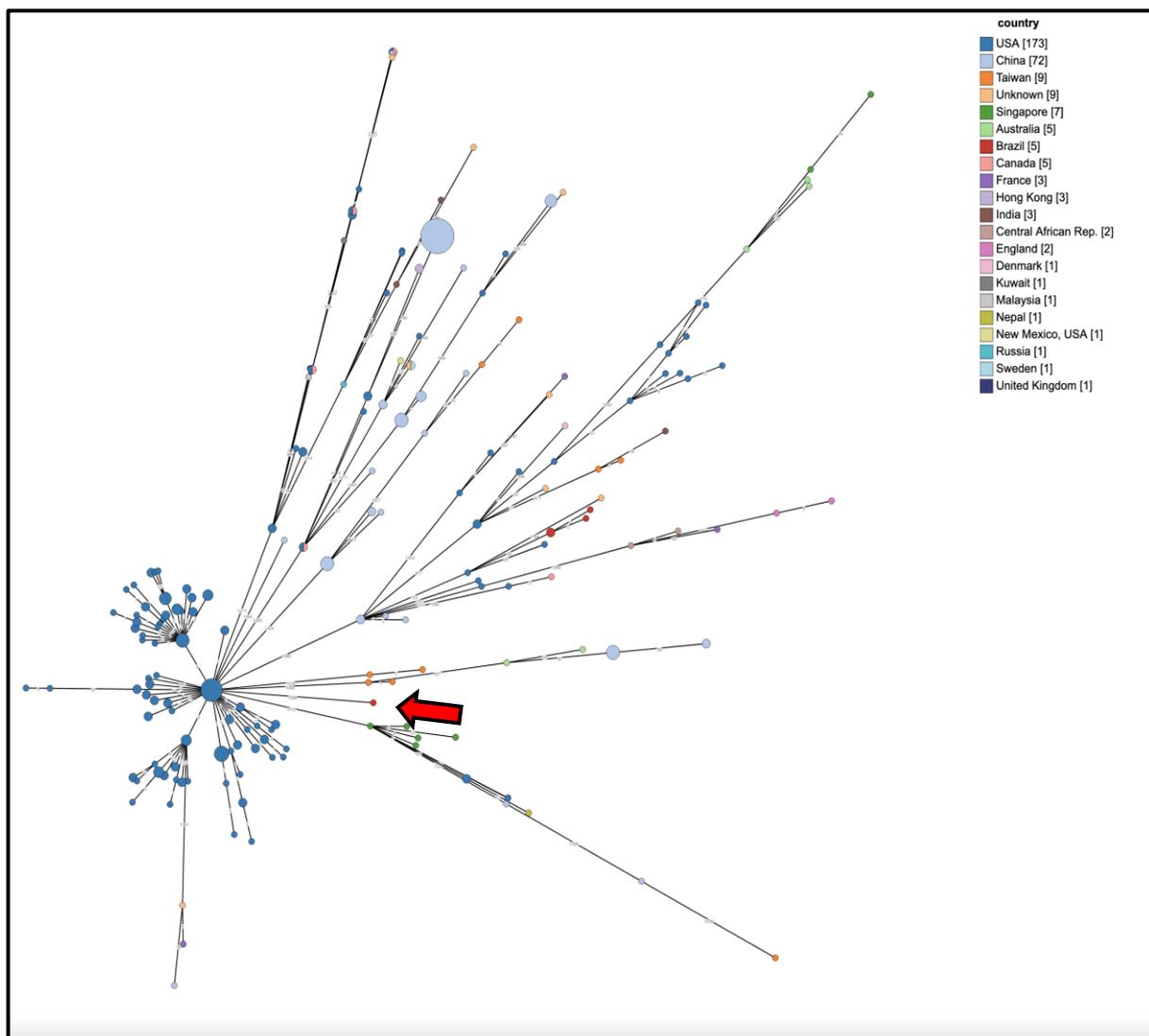
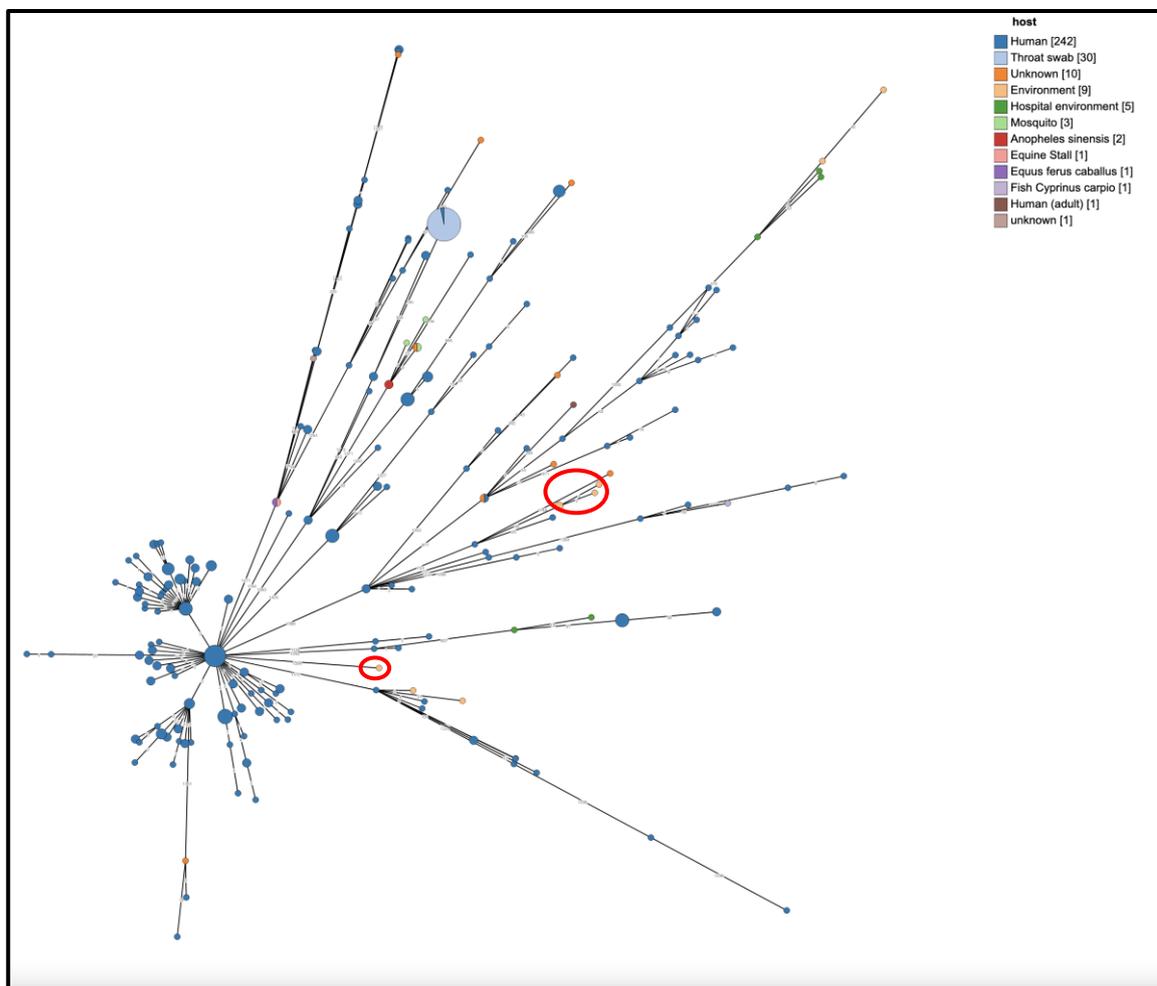
Figura 17. *Minimum-spanning tree* baseada no cgMLST de *E. anophelis* distribuídos nos países

Figura 18. *Minimum-spanning tree* baseada no cgMLST de *E. anophelis* e fonte de isolamento

1.9.2 *Pseudomonas putida*

Após a remoção de *contigs* curtos e sequências com potencial de contaminação, o genoma de *P. putida* resultou em 81 contigs com um N50 de 132566 pb. Esse compreende 5.785.771 pb com um teor de G+C de 62,0%. Possui 5375 sequências codificadoras, incluindo 71 RNAs.

A partir da anotação genômica na plataforma RAST foi realizada uma reconstrução combinando genes a categorias funcionais de subsistemas metabólicos predefinidos. O gráfico gerado pelo RAST mostra a diversidade de genes anotados e classificados em subsistemas para grupos funcionais encontrando 369 subsistemas. Dentre eles, destacamos o subsistema Resistência a antibióticos e compostos tóxicos como: Homeostase do cobre (*cutE* e *corC*); Cobalto- resistência ao zinco-cádmio (operon *czc*); Resistência às fluoroquinolonas (*gyrA* e *gyrB*); Homeostase do cobre - tolerância ao cobre (2); Beta-lactamase (*bla_{BLI}*); Resistência aos compostos de cromo (gene *chrA*). No subsistema Fagos, Profagos, Elementos transponíveis e Plasmídeos foi revelada ilha de patogenicidade de *Listeria LIPI-1* estendida (Figura 19).

A partir do MLST do PubMLST foi gerada uma *minimum spanning tree* usando o software GrapeTree (versão 1.5.0). Como apresentado na árvore, este isolado pertence ao ST 154 que derivou do ST 192 (EUA) que juntamente os STs 78 (China de origem clínica; 216 do Canadá, de origem ambiental e ST 150 (Espanha, origem clínica) são originários do ST central 69 da Polônia com linhagens de origem clínica e ambiental (Figura 20 e 21).

Figura 19. Representação gráfica da distribuição de Subsistemas no genoma de *P. putida*

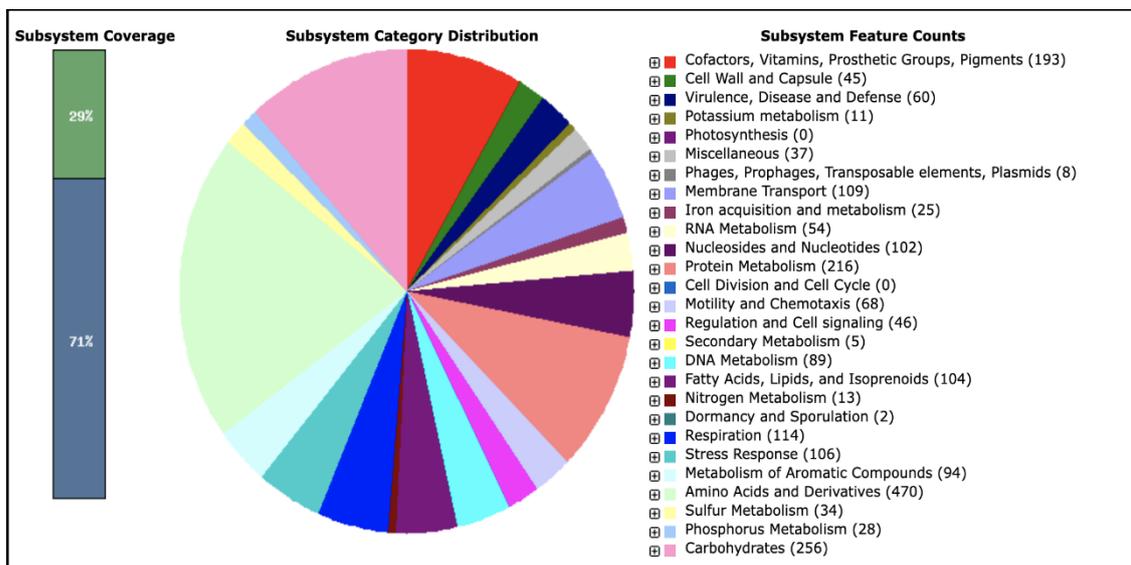


Figura 20. *Minimum-spanning tree* baseada no MLST de *P. putida* distribuídos nos países.

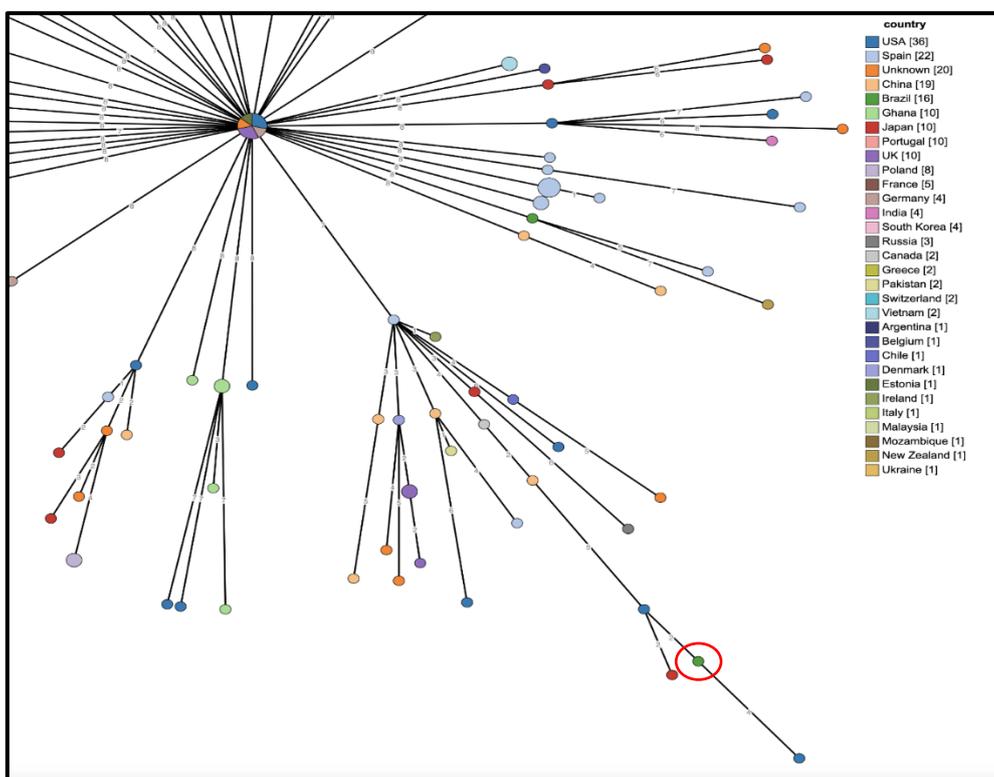
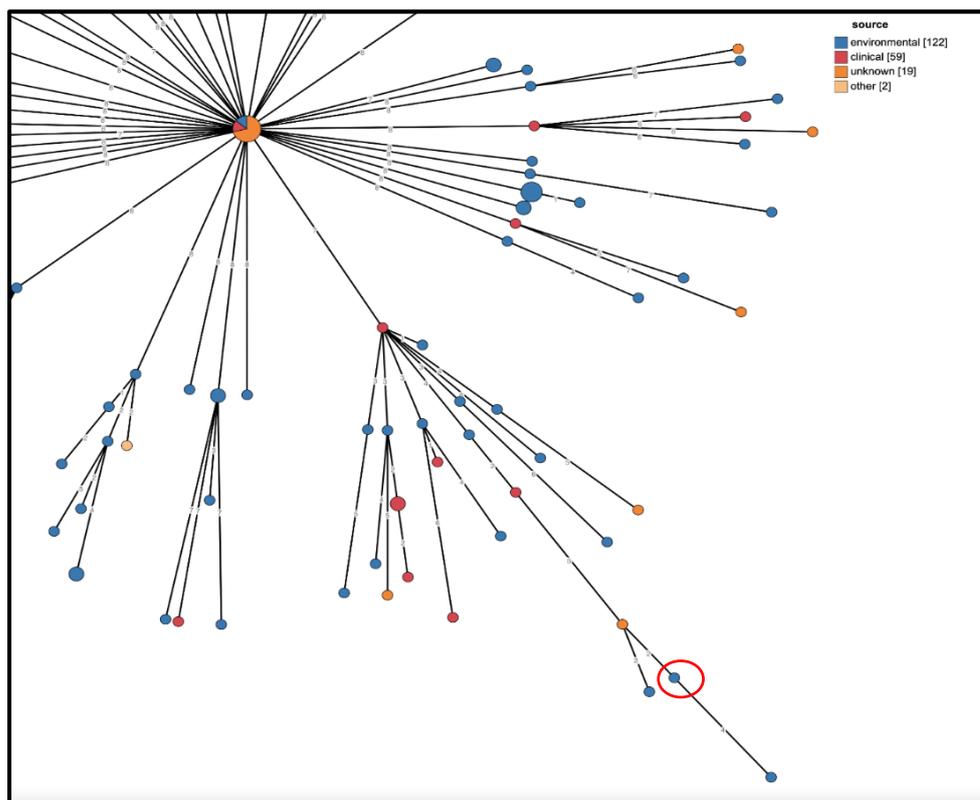


Figura 21. Minimum-spanning tree baseada no MLST de *P. putida* e fontes de isolamento

5. DISCUSSÃO

O saneamento é fundamental para uma vida saudável e produtiva, e a prestação de serviços de saneamento para populações urbanas e rurais com rápido crescimento é um dos desafios mais urgentes do mundo. Atualmente, mais de 700 milhões de residentes urbanos carecem de acesso ao saneamento em todo o mundo, incluindo 80 milhões que praticam a defecação a céu aberto (UNICEF, 2015). Mais de 80% da população não atendida vive na África Subsaariana, Sul da Ásia ou Leste Asiático. As lacunas de saneamento são particularmente críticas em áreas urbanas, exacerbando desigualdades e processos de desenvolvimento insustentáveis (UNESCO, 2016). A população brasileira que vive nas zonas rurais é muitas vezes alheia às soluções coletivas ou empreendidas pelo poder público, tal qual a população das periferias das cidades (SANTOS, 2020).

Ao mesmo tempo, os sistemas de saneamento em centros urbanos de alguns países desenvolvidos estão começando a se deteriorar. De 2000 a 2030, a população urbana nos países em desenvolvimento deverá dobrar (ANGEL, 2022). Sendo assim, serão necessários grandes investimentos para fornecer e manter sistemas de saneamento adequados para atender as cidades em crescimento e alterar a realidade de saneamento básico no mundo é um desafio permeado por dificuldades políticas de gestão e interesses.

No presente estudo foi observado maiores níveis de resistência antimicrobiana nos isolados da ECE do que naqueles isolados da ESA. A maioria dos isolados da ESA apresentaram perfil non-MDR e alguns MDR, enquanto na ECE os isolados apresentaram apenas perfis MDR e XDR. Isso pode estar relacionado a vários fatores, como o fato da ESA ser um sistema unifamiliar onde as águas negras possuem baixos níveis de poluentes emergentes químicos. Desta forma, a estação alternativa pode estar proporcionando menor pressão seletiva na comunidade microbiana e, com isso menor disseminação de genes de resistência (KNIGHT, 2021).

No presente estudo foi verificada a presença de BRAs nos efluentes não tratados e tratados da TEvap, o que nos leva a sugerir que o consumo de alimentos desse sistema deveria ser evitado, visto que os genes de resistência existem não apenas na natureza e em humanos, mas também em animais e vegetais como um reservatório desses genes que podem ser transferidos para patógenos humanos por

contato direto ou indiretamente através do consumo de alimentos contaminados (ROLAIN, 2013). Vale ressaltar que os isolados da TEvap apresentaram redução nos níveis de resistência aos antimicrobianos. Enquanto, no início do tratamento verificamos resistência aos β -lactâmicos, quinolonas, aminoglicosídeos e nitrofurantoína, no final só foi observada resistência às classes das quinolonas e aminoglicosídeos, mais uma vez, pode indicar que a ESA proporciona menor pressão seletiva na comunidade microbiana (KNIGHT, 2021). Ao contrário da TEvap, os isolados provenientes da ECE não apresentaram diferenças significativas nos níveis de resistência aos antimicrobianos, demonstrando isolados não suscetíveis a 3 classes de antimicrobianos analisadas (β -lactâmicos, quinolonas e aminoglicosídeos). Embora se reconheça que as ETEs reduzam a quantidade e a diversidade de GRAs e, portanto, as chances de disseminação da resistência, alguns estudos afirmam que essas são fontes relevantes de BRAs (AMOS, 2014), contribuindo para a disseminação de GRAs (HULTMAN, 2018). A água negra pode conter substâncias que estimulam a disseminação de GRAs, como a presença de EGM (GUO, 2021). Outro estudo demonstra que água cinza não tratada pode abrigar ARBs e ARGs de origem humana, inclusive, relatando a presença de bactérias MDR produtoras de ESBL nesses efluentes (POROB, 2020).

Foi observada a presença de organismos resistentes aos antimicrobianos na entrada das duas estações avaliadas, o que pode sinalizar que esses microrganismos já chegaram às estações portando genes de resistência. Esses resultados evidenciam a importância do saneamento e a necessidade urgente da implementação de estratégias eficazes de gestão de águas residuais, a fim de evitar a disseminação de bactérias MDR (POROB, 2020).

Dentre os microrganismos resistentes aos microbianos, o presente estudo revelou a presença de *E. anophelis* com perfil PDR na saída do efluente da TEvap (ESA). Pertencente à família *Flavobacteriaceae*, *E. anophelis* tem emergido nos últimos anos como um relevante patógeno humano, envolvido em meningite e sepse neonatal, bem como em surtos nosocomiais. Foi inicialmente isolada do intestino médio do mosquito *Anopheles gambiae*, no entanto não há evidências de a transmissão aos humanos pelo mosquito, suas vias de transmissão também são pouco conhecidas. Evidências indicam que *E. anophelis* é o patógeno predominante em humanos, e não *E. meningoseptica*, como se acreditava (KÄMPFER, 2011).

No presente estudo, a árvore baseada no cgMLST de *E. anophelis* demonstrou que esse isolado derivou diretamente da sublinhagem 15, de origem clínica, associada a um surto que ocorreu em Wisconsin, nos EUA, em 2016 (NIELSEN, 2018). Durante o surto os pacientes foram testados em um período de 21 dias, em mais de 4 regiões diferentes. O locus cgMLST desses isolados foi praticamente idêntico, indicando que os pacientes foram infectados por uma população de patógenos de uma mesma variante genética (PERRIN, 2017). O isolado de *E. anophelis*, recuperado na ESA, derivou diretamente dessa mesma sublinhagem, sendo observada a transição da origem clínica para a ambiental, ilustrando a complexidade da resistência antimicrobiana e a importância do sequenciamento genômico no entendimento da disseminação da RAM.

É importante ressaltar que, embora os níveis de resistência aos antimicrobianos tenha sido menor na ESA que da ECE, foi revelada nessa estação a presença de resistência a nitrofurantoína. O estudo de Ho e colaboradores (2015) mostrou que embora a prevalência de resistência à nitrofurantoína ter permanecido baixa, um aumento exponencial no consumo deste antimicrobiano destaca a necessidade de manter a vigilância da resistência a essa droga. No presente estudo, foi observada resistência a nitrofurantoína (ESA) em *K. pneumoniae* (saída ETE), *P. alcalifaciens* (saída ETE) e *E. bugandensis* (entrada da ETE). A resistência à nitrofurantoína em *Escherichia coli* foi atribuída principalmente a mutações nos genes cromossômicos de nitrorredutase (*nfsA* e *nfsB*) que estão envolvidos na conversão da droga em compostos intermediários tóxicos (SANDEGREN, 2008). No entanto, a resistência à nitrofurantoína também pode ser codificada por plasmídeo (BREEZE, 1983). Em 2003, uma bomba de efluxo codificada por plasmídeo OqxAB, foi detectada em um isolado de *E. coli* multirresistente originário de esterco suíno de uma fazenda dinamarquesa que usava olaquinox (OLA) como aditivo alimentar (SORENSEN, 2003). Além disso, genes *oqxAB*, flanqueados por elementos IS26, foram encontrados em plasmídeos de *E. coli* e *Salmonella 63 entérica* e no cromossomo nativo de *Klebsiella* spp. sem os elementos IS26 (GUILLARD *et al*, 2015). A alta prevalência do gene *oqxAB* foi relatada entre isolados de *E. coli* e *Salmonella* de origem animal ou carne na China (CHEN *et al*, 2012)

Outro estudo documentou que a aquisição de genes *oqxAB* em *E. coli* poderia mediar a resistência à nitrofurantoína enquanto a cura do plasmídeo causou reduções acentuadas de MIC. Ainda nesse estudo foi verificado que a bomba de efluxo também

facilitou o desenvolvimento de níveis clinicamente importantes de resistência à nitrofurantoína. Segundo os autores, a resistência emergente à nitrofurantoína em isolados clínicos de *E. coli* é preocupante, pois este medicamento é um medicamento fundamental para o tratamento de infecção urinária não complicada (Ho *et al.*, 2015)

No presente estudo, dentre os 22 fatores no sub-sistema de resistência, foi encontrado o operon MAR, regulador que controla a expressão de mais de 60 genes, incluindo a regulação positiva de sistemas de efluxo de drogas. Em *E. coli*, este locus foi identificado como determinante para a resistência cruzada a tetraciclina, quinolonas e β -lactâmicos (GEORGE e LEVY, 1983), o que pode ter contribuído para a resistência a esses fármacos conforme demonstrado no perfil fenotípico da *E. anophelis*, no presente estudo. Além disso, foi revelado também a presença de genes de metalo- β -lactamase (MBL) *bla*_{B-1} e *bla*_{GOB-21}, codificados cromossomicamente e presentes somente nesse gênero bacteriano (GONZÁLEZ e VILA., 2012; BELLAIS *et al.*, 2000). Alguns estudos relatam a existência de padrões distintos de genes MBL em diferentes espécies de *Elizabethkingia* (BELLAIS *et al.*, 2000, Yum *et al.*, 2010). Os genes *bla*_B e *bla*_{GOB} de *Elizabethkingia* foram funcionalmente expressos em *E. coli* DH5 α e aumentaram a resistência da *E. coli* a cefalosporinas (cefuroxima, ceftazidima e cefoxitina), carbapenêmicos (meropenem, imipenem) e todos os tipos de inibidores β -lactâmicos, em comparação com o controle negativo (HU *et al.*, 2020). Em relação às fluoroquinolonas, a presença dos genes *gyrA* e *gyrB* foi compatível com o perfil de susceptibilidade à ciprofloxacina observado no presente estudo. Esse dado também foi demonstrado entre os isolados de *Elizabethkingia* spp., onde 91% e 77% foram resistentes a ciprofloxacina e levofloxacina, respectivamente. As alterações mais prevalentes foram duas mutações simples no *gyrA*, Ser83Ile e Ser83Arg, detectadas em 76% dos isolados exibindo MIC de fluoroquinolona entre 8 e 128 mg/mL e que nenhum dos isolados apresentou alterações nos genes *gyrB*, *parC* ou *parE* (JIAN *et al.*, 2020).

Compostos não antibióticos, como biocidas antibacterianos e metais, também podem contribuir para a promoção da resistência a antibióticos por meio da co-seleção. No presente estudo foi revelado o gene *qacG* que confere resistência ao quaternário de amônio. Ainda no genoma de *E. anopheles* observamos os genes *czcB* e *czcR* envolvidos na co-resistência do fenótipo de resistência a antibióticos e metais, em isolados clínicos e ambientais (DAVIS *et al.*, 2005; BTHATTACHARYA *et al.*, 2000). A proteína sensora de dois componentes CzcS de *P. aeruginosa* foi considerada

responsável pela resistência tanto ao zinco quanto ao imipenem. Conejo e colaboradores (2003) descobriram que o zinco eluído do látex de silicone de cateteres urinários exerceram um efeito negativo sobre a expressão de OprD2, uma porina de membrana responsável pela resistência aos carbapenêmicos o que conseqüentemente aumentou a resistência geral a esta classe de antibiótico. Em um exemplo de co-resistência em isolados clínicos, as espécies de *Staphylococcus* foram resistentes a múltiplos metais e antibióticos: a co-resistência mais comum envolveu cromo, chumbo e penicilina G (UQ e CEYLAN, 2003). Potenciais preocupações de saúde pública para a co-resistência de metais e antibióticos foram levantadas por Pettibone e colaboradores (1996) e Pathak e Gopal (2005), que observaram que isolados bacterianos obtidos de tecidos de peixes comumente consumidos por humanos apresentavam resistência a múltiplos metais e antibióticos.

Outro microrganismo que teve seu genoma sequenciado foi a *P. putida*, recuperada da saída da ESA. Trata-se de uma bactéria saprófita onipresente na rizosfera que atrai considerável atenção como uma célula hospedeiro para biologia sintética e engenharia metabólica, devido ao versátil metabolismo que possui; evoluiu para suportar condições ambientais adversas e estresse físico-químico (VOLKE *et al*, 2020). Tem potencial considerável para aplicações biotecnológicas na agricultura, biocatálise, biorremediação e produção de bioplásticos (NELSON, 2002). Entre *Pseudomonas* spp., a resistência intrínseca é principalmente conferida por mecanismos de co-ocorrência, como baixa permeabilidade da membrana, síntese de β -lactamases, e os sistemas de efluxo. No entanto, devido à plasticidade notável de seu genoma, os membros de *Pseudomonas* spp. aparentam capacidade de adquirir quase todos os conhecidos mecanismos de resistência aos antimicrobianos (LIVERMORE, 2002).

No presente estudo foram encontrados 44 fatores de resistência aos antibióticos e compostos tóxicos no subsistema virulência, doença e defesa nesta espécie. Apesar de apresentar perfil de resistência aos antimicrobianos não-MDR, a cepa apresentou resistência à cefepime, ceftazidima e ciproflaxacina e a análise do genoma revelou a presença dos genes *gyrA* e *gyrB* em conformidade ao perfil fenotípico observado, assim como demonstrado no estudo de Jian e colaboradores (2020). Além disso, foi encontrado o gene *adeF*, também vinculado à resistência às fluoroquinolonas e tetraciclinas (LAMA, 2021). Foi revelada também a presença da enzima metalo- β -lactamase (BLI), que pode estar associada à resistência às

cefalosporinas de espectro estendido (ceftazidima e cefepima) (HU *et al*, 2020). Trata-se de um fenômeno natural desenvolvido para proteger bactérias produtoras de antibióticos de seus próprios produtos e para aumentar sua sobrevivência em ambientes microbianos altamente competitivos (ROLAIN, 2013). Em um outro estudo realizado com *Pseudomonas* spp. isolados de ETEs e de um emissário marinho resultou no isolamento de 60% de *P. putida* (87/146) e demonstrou resistência à cefepima em efluentes brutos (9,5 % (2/21)) e no efluente tratado (23,9 % (11/46)). Todos os pontos analisados apresentaram isolados com perfil de resistência aos antimicrobianos MDR. Um fato relevante foi o aumento da taxa de resistência a todos os β -lactâmicos e fluoroquinolonas entre os isolados de *P. putida* durante o curso de águas residuais, o que levou os autores a sugerirem que esta espécie pode ser um reservatório de resistência antimicrobiana ao longo do curso de águas residuais (LUCZKIEWICZ, 2015).

Um outro resultado obtido a partir da análise do genoma da *P. putida*, isolada no presente estudo, foi a presença dos genes *creA* e *creD* que participam do mecanismo de resistência a biocidas, especificamente à colicina E2. O gene *creA* codifica uma ORF (*open reading frame*) hipotética, e o *creD* uma proteína de membrana interna de função desconhecida, relacionada à resistência à colicina e outros antibióticos (AVISON, 2001). Um outro estudo avaliou o potencial da proteína CREC, codificada pelo gene *creC* que faz parte do mesmo operon (*creABCD*), como uma nova ferramenta para o projeto de cepas bacterianas adequadas para a síntese de diferentes bioprodutos em *E. coli*, como o succinato (GODOY, 2015).

No presente estudo, o sequenciamento do genoma de *P. putida* também revelou 18 genes potencialmente envolvidos na resistência simultânea ao cobalto, zinco e cádmio, incluindo múltiplas cópias dos genes *czcD*, e *czcR* e do regulador histidina quinase de resposta aos metais HmrR e *cusR* e o sensor histidina quinase codificado pelo gene *cusS*. As proteínas CzcC, constituem um sistema de efluxo que transporta ativamente os cátions para fora da célula bacteriana, enquanto a proteína CzcR são proteínas de regulação, semelhantes aos CopS/CopR e PcoS/PcoR envolvidos na regulação de determinantes resistentes ao cobre transmitidos por plasmídeo. Outrossim, o estudo de Hassan (1999) indicou forte conservação do gene *czr* em isolados ambientais e clínicos de *P. aeruginosa*, a partir da hibridização DNA-DNA.

Sugere-se que poluentes em águas residuais, como resíduos de antimicrobianos, metais, desinfetantes, entre outros, podem resultar na seleção de bactérias resistentes a antibióticos (ZHANG *et al.*, 2011; KOTLARSKA *et al.*, 2015) e afetar positivamente a transferência de determinantes de resistência (MERLIN *et al.* 2011). Já foi observado que a transferência de plasmídeos entre cepas de *P. putida* pode ocorrer, pois bactérias ativas em processos de águas residuais parecem ter alto potencial como portadoras de plasmídeos. No entanto, essa transferência é limitada pela disponibilidade de nutrientes e pela atividade fisiológica do receptor (TSUJI *et al.* 2005). No presente estudo não foi observada presença de plasmídeo no isolado *P. putida*.

Embora tenha sido demonstrada queda nas taxas de resistência aos antimicrobianos no final do tratamento da ESA, no presente estudo, a recuperação de um isolado de *E. anophelis* pan-resistente da entrada da ESA, um sistema que inclui o cultivo de hortaliças e outros vegetais, sugere a necessidade de avaliação da microbiota e do resistoma do solo e no entorno dessa ETE, incluindo folhas e frutos cultivadas nesse sistema. Considerando que vegetais também podem ser fonte de genes de resistência via contaminação de frutas e vegetais frescos não higienizados adequadamente (RUIMY *et al.*, 2010). Por exemplo, cepas de *P. aeruginosa* resistentes a diferentes classes de antibióticos foram isolados de alface fresca, cenoura, tomate e pepino dos mercados da Jamaica (ALLYDICE-FRANCIS e BROWN, 2012).

O sistema TEvap se apresenta como uma metodologia de desenvolvimento sustentável para a promoção da inclusão sócio-produtiva. Apesar deste sistema se apresentar como alternativa na resolução de problemas como a falta de saneamento urbano e rural, os resultados obtidos neste estudo sinalizam a necessidade de aprimoramentos, como por exemplo, na avaliação do microbioma e do conjunto de genes de resistência, bem como de sua disseminação no que se refere a preservação do meio ambiente, manutenção do solo, de recursos hídricos e da saúde pública.

6. CONCLUSÕES

A queda nos níveis de resistência aos antimicrobianos na ESA quando comparadas com o comportamento dos níveis de resistência demonstrados na ECE, pode estar relacionada a vários fatores, como o fato da ESA ser um sistema unifamiliar com baixos níveis de poluentes emergentes, o que gera menor pressão seletiva na comunidade microbiana e, com isso menor disseminação de genes de resistência.

Estudos com metodologias genômicas, como o sequenciamento completo do genoma, vêm se mostrando eficientes na investigação de muito aspectos como identificação epidemiológica, perfil de resistência, perfil de virulência, entre outros. É importante ressaltar que os 5 isolados de *E. anophelis* do cgMLST que foram depositados pelo nosso grupo de pesquisa, todos foram de origem ambiental e apresentaram perfis XDR e PDR de resistência aos antimicrobianos. Todos derivaram de sublinhagens de origem clínica, evidenciando a abordagem da saúde única.

Em países com tratamento precário de esgoto é provável que a água atue como um relevante veículo na transmissão de BRAs e/ou GRAs. O presente estudo reforça a necessidade de uma maior cobertura na captação e tratamento de esgotos, bem como de tratamentos eficientes na desinfecção de efluentes que serão descartados nos corpos hídricos receptores, uma vez observada presença de BRAs na saída dos efluentes de ambas as estações.

Soluções seguras de tratamento local de esgoto podem ser uma alternativa de universalização desses serviços, nas regiões urbana e rural, com objetivo de preservar o meio ambiente e a saúde humana. Esse estudo colabora para a continuidade na investigação de sistemas alternativos de saneamento para auxiliar na universalização dos serviços de esgotamento no Brasil, no combate à dispersão de resistência antimicrobiana na perspectiva da Saúde Única e na conscientização do consumo sustentável de antimicrobianos, uma vez que o uso racional de antimicrobianos é dever de todos.

7. REFERÊNCIAS

ALEXANDER, J., *et al.* *Evaluation of antibiotic resistance dissemination by wastewater treatment plant effluents with different catchment areas in Germany.* Scientific **Reports** volume 10, número 1, pags. 1–9. 2020.

ALLYDICE-FRANCIS, K. BROWN, P. D. *Diversity of antimicrobial resistance and virulence determinants in Pseudomonas aeruginosa associated with fresh vegetables.* **International Journal of Microbiology.** 2012

AMARO, A. *et. al.* Resistência aos antibióticos em bactérias com origem em animais de a cadeia alimentar. Site **Veterinária Atual**. Disponível em: [Resistência aos antibióticos em bactérias com origem em animais da cadeia alimentar - Veterinaria Atual \(veterinaria-atual.pt\)](http://veterinaria-atual.pt) Acesso em: 30/05/22. Agosto, 2020.

AMOS, G. C. A. *et al.* *Wastewater efuent contributes to the dissemination of CTX-M-15 in the natural environment.* **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** volume 69, págs. 1785–1791. 2014.

ANDERSSON, K. *et al.* *Towards “Sustainable” Sanitation: Challenges and Opportunities in Urban Areas.* **MDPI, Stockholm Environment Institute**, dezembro, 2016.

ANDRADE, L. C. *et al.* Lago Guaíba: uma análise histórico-cultural da poluição hídrica em Porto Alegre, RS, Brasil. **Engenharia Sanitária Ambiental**, volume 24, número 02. Fevereiro, 2019.

ANGEL, S. *et al.* *Making Room for a Planet of Cities; Lincoln Institute of Land Policy. Policy Focus Report.* 76p. Cambridge, EUA, 2011.

ANVISA. **Consenso sobre o uso racional de antimicrobianos.** 36p. Ministério da Saúde, Brasília, 2001.

AQUINO, S. F. BRANDT, E. M. Remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto: revisão da literatura. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, Setembro, 2013. Volume 18, número 3.

ARY, I. J. J. **Avaliação da ação antimicrobiana do Cimento Portland (AACP) e do desempenho do concreto produzido com esgoto doméstico tratado e bruto**. 2018. 127 f. Tese (doutorado em engenharia civil) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil: Saneamento Ambiental, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.

ASHELFORD K. E. *et al.* *Plasmid transfer between strains of Pseudomonas putida, and their survival, within a pilot scale percolating-filter sewage treatment system.* **FEMS Microbiology Ecology** volume 18, págs 15–26. 1995

AVISON, M. B. *et. al.* *Escherichia coli CreBC is a global regulator of gene expression that responds to growth in minimal media.* **Journal of biological chemistry** volume 276, número 29. Julho, 2001

BARONI, I. R. **Cloro hidrato : avaliação de risco à saúde humana como subproduto da desinfecção da água**. 2019. 56 f. Dissertação (mestrado em tecnologia ambiental). Universidade de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto, 2019.

BATISTA. J. A. *et. al.* Biorreator à membrana-nova: tecnologia para tratamento de efluentes. **S&G**, Volume 15, número 1. Goiatuba, 2020

BELLAIS, S. *et. al.* Molecular and Biochemical Heterogeneity of Class B Carbapenem- Hydrolyzing-Lactamases in Chryseobacterium Meningosepticum. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, volume 44, págs. 1878–1886. 2000.

BERMAN, J. J. **Taxonomic Guide to Infectious Diseases**. Elsevier Inc. Segunda Edição. 2019

BHATTACHARYA, M. *et al.* *Antibiotic- and metal-resistant strains of Vibrio parahaemolyticus isolated from shrimps.* **Microbial Drug Resistance** volume 6, págs 171–172. 2000.

BIZZINI, A. G. *Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification.* **Clinical Microbiology and Infection**, Novembro, 2010. Volume 16, número 11.

BRASIL, Programa de Controle de Infecções Hospitalares Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. **Diário Oficial da União**, Portaria nº 2616. Maio, 1998.

BRASIL. Constituição da República Federativa do Brasil de 1988. **Presidência da Casa Civil** Brasil. Senado Federal, 1988.

BRASIL. Fundação Nacional de Saúde. Vigilância ambiental em saúde. **Fundação Nacional de Saúde**, Brasília, 2002. 12p.

BRASIL. Portaria nº 171, de 13 de dezembro de 2018. **Diário Oficial Da União**, Brasília, seção 1, pág. 23. 15 de Julho de 2020.

BRASIL, LEI Nº 11.445, de 5 de janeiro de 2007. **Presidência da República**, Casa Civil, Subchefia para Assuntos Jurídicos. 2020

BRASIL, LEI Nº 14.026 de 15 de julho de 2020. **Presidência da República**, Secretaria-Geral, Subchefia para Assuntos Jurídicos. 2020

BREEZE A. S., OBASEIKI-EBOR E.E. Transferable nitrofurantoin resistance conferred by R-plasmids in clinical isolates of Escherichia coli. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, volume 12, págs. 459–467. 1983.

Carramaschi, I. N. **Dípteros Muscoides como Veiculadores de Bactérias Resistentes aos Antimicrobianos.** 2019. 186p. Tese (doutorado em Biodiversidade e Saúde). Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, Setembro,

2019.

CARVALHO, D. O. S. **Caracterização do metagenoma e do resistoma microbiano de efluente hospitalar e de suas possíveis implicações na Vigilância Ambiental em Saúde**. 122 f., il. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária), Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2016.

CARVALHO, I.T., SANTOS, L., *Antibiotics in the aquatic environments: a review of the European scenario*. **Environment International** volume 94, págs. 736–757. Setembro, 2016.

CDC. *One Health Basics, History*. **Centers for Disease Control and Prevention**. EUA, 25 de outubro, 2016. Disponível em: <https://www.cdc.gov/onehealth/basics/history/index.html>. Visualizado em 19/10/21.

CHAIT, R. *et al. Pervasive selection for and against antibiotic resistance in inhomogeneous multistress environments*. **Nature communications**. 2016

COHEN, J. *et al. Infectious Diseases*. Elsevier, 2017. Quarta edição.
COMUSA. O processo de tratamento de esgotos – uma breve introdução, **Serviços de Água e Esgoto de Novo Hamburgo**, 2019. Disponível em: [Tratamento de Esgoto - COMUSA | Serviços de Água e Esgoto de Novo Hamburgo](#). Acesso em 30/10/2020.

COLLIGNON, P. J. MCEWEN, S. A. *One Health—Its Importance in Helping to Better Control Antimicrobial Resistance*. **TropicalMed**, volume 4 número 1. Janeiro, 2019.

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** volume 47, págs. 2313–2315. 2003

COURY, G. C. **Sistemas descentralizados de tratamento de esgoto em assentamentos precários urbanos: proposta de um modelo multicritério de apoio à decisão**. 2020. 112p. Dissertação (mestrado em desenvolvimento sustentável). Universidade de Brasília, Brasília, 2020.

DAVIS, I.J. *et al.* *Isolation of silver- and antibiotic-resistant Enterobacter cloacae from teeth*. **Oral Microbiology and Immunology**, volume 20, págs 191–194. 2005.

DINSDALE, E. A *et al.* *Functional Metagenomic Profiling of Nine Biomes*. **Nature**, 452, 629–632, 2008.

DOMENECH, A. *et. al.* Fluoroquinolone-resistant pneumococci: dynamics of serotypes and clones in Spain in 2012 compared with those from 2002 and 2006. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, volume 58, número 4. Universidade de Barcelona, Espanha. Fevereiro, 2014.

EMATER. Tanque de evapotranspiração para o tratamento de efluentes do vaso sanitário domiciliar. **EMATER**. Disponível em: https://www.emater.mg.gov.br/doc/intranet/upload/DETEC_Ambientaltvap_coom_defludio.pdf. Acesso em: 26/04/2022.

ENGLERT, C. S., *Nanomaterials and the Environment: Uses, Methods and Measurement*. **Journal of Environmental Monitoring**, volume 9, número 11, pág. 1154-61. Julho, 2007.

ESTRELA, T. S. Resistência antimicrobiana: enfoque multilateral e resposta brasileira. In: BRASIL, Saúde e Política Externa: os 20 anos da Assessoria de Assuntos Internacionais de Saúde (1998-2018). 364p. **Ministério da Saúde**. Brasília, 2018.

EUCAST. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 10.0*, 2020

FIETTO, J. L. R. MACIEL, T. E. F. Sequenciando genomas. In: **Ciências genômicas: fundamentos e aplicações** . Editora Cubo. 2016

FIGUEIREDO, I. C. S. **Tratamento de esgoto na zona rural: diagnóstico participativo e aplicação de tecnologias alternativas**. 2019. 318p. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo, Campinas, SP, 2019.

FIN, W. L. G. **Avaliação da eficiência do sistema de lodos ativados da estação de tratamento de efluentes de uma empresa de batatas chips exposto a diferentes vazões de ar**". 2018. Monografia (Graduação em Engenharia Ambiental) – Universidade do Vale do Taquari - Univates, Lajeado, 02 julho 2018.

GASTALHO, S. et al. Uso de antibióticos em aquacultura e resistência bacteriana: Impacto em saúde pública. **Acta Farmacêutica Portuguesa**, volume 3, número 1, págs. 29-45. 2014

GEHLING,G. Capítulo 15: Lodos Ativados. In: GEHLING,G. **Tratamento de Água e Esgotos**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Julho, 2017.

GEORGE, A. M. & Levy, S. B. *Amplifiable resistance to tetracycline, chloramphenicol, and other antibiotics in Escherichia coli: involvement of a non-plasmid-determined efflux of tetracycline*. **Journal of Bacteriology**, volume 155, págs. 531–540. 1983.

GIBBS, E. P. J. *The evolution of One Health: a decade of progress and challenges for the future*. **Veterinary Record**, volume 174, número, pag. 85–91. Janeiro, 2014.

GODOY, M. S. The CreC Regulator of Escherichia coli, a New Target for Metabolic Manipulations. **Applied and Environmental Microbiology**, volume 82, numero 1. Dezembro, 2015.

GOMES, T. S. B. **O direito à água doce frente à escassez hídrica: instrumentos jurídicos para a mitigação do problema**. 24p. Dissertação de mestrado (direito do ambiente, dos recursos naturais e da energia). Universidade de Lisboa. Portugal, 2020.

GONÇALVES, C. Veja as principais mudanças no novo Marco Legal do Saneamento.. **Empresa Brasil de Comunicações**,2020. Disponível em: [Veja as principais mudanças no novo Marco Legal do Saneamento | Agência Brasil \(ebc.com.br\)](https://www.ebc.com.br/saneamento) Acesso em: 26/04/2022.21/04/2022.

GONZÁLEZ, L. J. VILA, A.J. *Carbapenem Resistance in Elizabethkingia Meningoseptica Is Mediated by Metallo- β -Lactamase BlaB*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, volume 56, págs 1686–1692. 2012.

GUILLARD T, *et. al. Discrimination between native and Tn6010-associated oqxAB in Klebsiella spp., Raoultella spp. and other Enterobacteriaceae using a two-step strategy*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** volume 59, págs 5838 –5840. 2015.

GUO, B. *et al. Effects of micro-aeration on microbial niches and antimicrobial resistances in blackwater anaerobic digesters*. **Water Research**, volume 196. Maio, 2021.

HAANDEL, A. v. Aplicação do sistema UASB-lagoas de polimento para o tratamento de esgoto visando ao reúso agrícola ou industrial ou à proteção de recursos hídricos. **Revista DAE**, volume 69, número 229. São Paulo. Março, 2021.

HASSAN, M. *et al. Identification of a gene cluster, czr, involved in cadmium and zinc resistance in Pseudomonas aeruginosa*. **Gene** volume 238, número 2. Outubro, 1999.

HIRAI, C. H. Microbiologia: Pseudomonas. **Analytica**, volume 94. Disponível em: [Microbiologia: Pseudomonas | Analytica 94 | Revista Analytica](#) . Acesso

em: 12/ 05/ 2022.

HO P. L., *Antimicrobial resistance in Escherichia coli outpatient urinary isolates from women: emerging multidrug resistance phenotypes*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease** volume 59, págs. 439 –445. 2007.

HO, P. et al. *Plasmid-Mediated OqxAB Is an Important Mechanism for Nitrofurantoin Resistance in Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, volume 60 número 1. Janeiro, 2016

HOMES, A. H. et al. *Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance*. **Revista The Lancet**, volume 387, número 10014, pag.176-87. Janeiro, 2016.

HU R. et. al. *Molecular diversity of chromosomal metallo- β -lactamase genes in Elizabethkingia genus*, **International Journal of Antimicrobial Agents**, volume 56, número 1, 2020.

HULTMAN, J. et al. *Host range of antibiotic resistance genes in wastewater treatment plant influent and effluent*. **FEMS microbiology ecology** volume 94, 2018.

IOP, J. F. M. **Relatório de estágio curricular supervisionado em medicina veterinária - área: vigilância ambiental em saúde**. 57 p. Relatório (graduação em Veterinária) Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, 2018.

JIA, B. *The Comprehensive Antibiotic Resistance Database*. **Nucleic Acids Research**, Volume 4, número 45, pag. D566-D573. Janeiro, 2017.

JIAN et al. *Molecular typing and profiling of topoisomerase mutations causing resistance to ciprofloxacin and levofloxacin in Elizabethkingia species*. **PeerJ**, número 6. Setembro, 2018.

JOLLEY, K. A. et. al. *Open-access bacterial population genomics: BIGSdb*

software, the PubMLST.org website and their applications. **Wellcome Open Res**, volume 3 , numero 124. 2018.

KAHN, L. H. *Integrating a One Health approach into epidemiology to improve public policy. **International Journal of Epidemiology***, Volume 48. Dezembro, 2019.

KASVI. Você sabe como é realizada a Extração de DNA? **KASVI**. 6/10/17. Disponível em: Você sabe como é realizada a Extração de DNA? - Kasvi. Visualizado em: 10/05/2022

KATUKIZA, A. Y. *et al. Sustainable sanitation technology options for urban slums. Revista **Biotechnology Advances***. Volume 30. Fevereiro, 2012.

KNIGHT, G. M., *et al. Antimicrobial resistance and COVID-19: Intersections and implications, **Epidemiology and Global Health***. Fevereiro, 2021.

KOZICH, James J. *et al. Development of a Dual-Index Sequencing Strategy and Curation - Pipeline for Analyzing Amplicon Sequence Data on the MiSeq Illumina Sequencing Platform. **Environmental Microbiology***. Setembro, 2013.

LAMA, *et al. Genomic and phylogenetic analysis of a multidrug-resistant Burkholderia contaminans strain isolated from a patient with ocular infection. **Journal of Global Antimicrobial Resistance***, volume 25, págs 323-325. Junho, 2021.

LEITE, M. D. S. O Novo Marco do Saneamento (Lei Federal nº. 14.026 de 2020) e os possíveis impactos nos pequenos municípios brasileiros. **Research, Society and Development**, volume 10, número 9, 2021.

LEONEL, L.F. *et al. Avaliação do efluente de fossa séptica biodigestora e jardim filtrante. **Symposium on agricultural and agroindustrial waste management***. São Pedro. Março, 2013.

LIMA, T. R. T. **Serratia spp., Morganella spp. e Providencia spp.: o estado da arte**. Monografia. Universidade Federal do Rio Grande do Norte - Natal, RN, 2020.

LIRA, F. *et al.*, *Metagenomic analysis of an urban resistome before and after wastewater treatment*, **Scientific Reports**, volume 10, número 8174. Maio, 2020.

LIU, X. *et al.* *Antibiotics in the aquatic environments: A review of lakes, China*. **Science of The Total Environment**, volume 627, número 15, pags 1195-1208. Junho, 2018.

LIVERMORE D.M. *Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in Pseudomonas aeruginosa: our worst nightmare?* **Clinical Infectious Diseases** volume 34, págs. 634–640. 2002.

LOGICAMBIENTAL. Lodos Ativados. **Logicambiental**, Macapá, 1 de julho de 2020. Disponível em: [Lodos Ativados - sistema de tratamento de esgoto de alta eficiência \(logicambiental.com.br\)](http://logicambiental.com.br) . Acesso em: 05/05/2022.

LOUREIRO, R. J. *et al.* O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**. Abril, 2016

LUCZKIEWICZ, A. *et al.* *Antimicrobial resistance of Pseudomonas spp. isolated from wastewater and wastewater-impacted marine coastal zone*. **Environmental Science and Pollution Research**, volume 22, págs. 19823–19834. 2015.

KÄMPFER, P. *Elizabethkingia anophelis sp. nov., isolated from the midgut of the mosquito Anopheles gambiae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, volume 61. Novembro, 2011.

MACHADO, E, C. *et al.* Detecção e quantificação de bactérias resistentes aos

antibióticos ampicilina e cloranfenicol em estações de tratamento de esgoto doméstico. **Engenharia Sanitária Ambiental**, volume 25, número 6. Dezembro, 2020.

MACHADO, C. R. A. *et al.* A busca por soluções para a poluição hídrica: um estudo de caso sobre tratamento de efluentes. **Brazilian Journal of Development**, número 14115. Fevereiro, 2022.

MANAIA, C. M. *et al.* Antibiotic resistance in wastewater treatment plants: Tackling the black box. **Environment International**, volume 115, pages 312-324. Junho, 2018.

MAPA. Semana mundial de conscientização do uso racional de antibióticos. **MAPA**. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/resistencia-aos-antimicrobianos/semana-mundial-de-conscientizacao-do-uso-racional-de-antibioticos/>. Acesso em: 26/04/2022.

MCEWEN, S. A. COLLIGNON, P. J. *Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective*. **Microbiology Spectrum**, volume 6 número 2. Março, 2018.

MEDEIROS, R. C. *et al.* Desinfecção sequencial: estudo de caso em ETE em escala plena. **Revista Ibero Americana de Ciências Ambientais**, volume 9, número 3, p.149-160. Maio, 2018.

MEIRELES C, *et al.* *Pseudomonas putida* are environmental reservoirs of antimicrobial resistance to β -lactamic antibiotics. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** volume 29, págs. 1317–1325. 2013

MELLO, E. J. R. **Tratamento de esgoto sanitário: Avaliação da estação de tratamentode esgoto do Bairro Novo Horizonte na cidade de Araguari MG**. 99p. Monografia (Pós- Graduação em Engenharia Sanitária). Uberlândia, 2007.

MERLIN C. *et al.* Persistence and dissemination of the multiple-antibiotic-resistance plasmid pB10 in the microbial communities of wastewater sludge microcosms. ***Water Research***, volume 45, número 9, págs. 2897–2905. 2011.

MESQUITA, T.C.R. **Tratamento descentralizado de esgotos sanitários em sistemas constituídos por tanques sépticos e filtros anaeróbios**. 209p. Dissertação (Pós- Graduação em Engenharia Agrícola). Viçosa, MG, 2019.

MEYER, G. PICOLI, S. U. Fenótipos de betalactamases em *Klebsiella pneumoniae* de hospital de emergência de Porto Alegre. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, número 47, volume 1. Fevereiro, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Uso Indiscriminado de Antimicrobianos e Resistência microbiana**. Brasília, 2010.

MIRANDA, C. A. C. **Relações clonais entre *Pseudomonas aeruginosa* multidroga resistentes de origem clínica e do efluente hospitalar**. 183 f. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2015.

MOTA, F. S. *et al.* **Perfil e prevalência de resistência aos antimicrobianos de bactérias Gram-negativas isoladas de pacientes de uma unidade de terapia intensiva**. Pontifícia Universidade Católica de Goiás – Goiânia-GO, Brasil, 2018.

NASCIMENTO, A. P. A. **Poluentes emergentes e seus possíveis impactos na disseminação da resistência aos antimicrobianos em efluentes de indústria farmacêutica**. 93 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária). Rio de Janeiro, INCQS/FIOCRUZ, 2022.

NASCIMENTO, J. N. **Utilização de biorreator anaeróbio de membrana dinâmica no tratamento de esgoto doméstico para uso agrícola**. 49p. Dissertação (mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental). Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2020.

NELSON, K. E. *et al.* Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. **Environmental Microbiology**, volume 4 número 12. Dezembro, 2002.

NIELSEN *et al.* Rare Elizabethkingia anophelis meningitis case in a Danish male. **JMM Case Reports** volume 5. 2018.

NOGUEIRA, L. F. B. Avaliação da atividade antibacteriana e sinérgica da curcumina com oxacilina e vancomicina frente a cepas de Staphylococcus aureus sensíveis e resistentes a metilicina (MRSA), e análise do seu mecanismo de ação. 2019. 61 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.

OLIVEIRA, S.C. SPERLING, M. Análise da confiabilidade de estações de tratamento de esgotos. **Engenharia Sanitária Ambiental**, Volume 12, Número 4. Rio de Janeiro, 2007

OMS. *Antimicrobial resistance*. **World Health Organization**. Disponível em www.who.int/health-topics/antimicrobial-resistance. Acesso em 04/08/2021.

ONEHEALTHBRASIL, O que é Saúde Única?. **One Health Brasil**. Disponível em www.onehealthbrasil.com. Acesso em 04/08/2021.

ORTEGA, L. L. **Resistência bacteriana: aquisição, mecanismos e prevenção**. Trabalho de conclusão de curso (graduação em Odontologia). 43p. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2019.

OTTERPOHL, R. Design of highly efficient source control sanitation *and practical experiences*. **EURO-Summer School DESAR**, pag 18-23, Wageningen. Junho, 2000.

OTTERPOHL, R. Options for alternative types of sewerage and treatment

systems directed to improvement of the overall performance. **Water science and technology**, volume 5, número 3, pag. 149-58. 2002.

PARKINSON, J., Lüthi, C. Walther D. **Sanitation21 - A Planning Framework for Improving City-wide Sanitation Services**. IWA, Eawag-Sandec, GlZ. Setembro, 2014.

PATHAK, S.P. and GOPAL, K. *Occurrence of antibiotic and metal resistance in bacteria from organs of river fish*. **Environmental Research**. volume 98, págs 100–103. 2005.

PAULO, P. L. et al. *Natural systems treating greywater and blackwater on-site: Integrating treatment, reuse and landscaping*. **Ecological Engineering**, volume 50, págs 95–100. Campo Grande, 2013.

PAZDA, M. et al. *Antibiotic resistance genes identified in wastewater treatment plant systems – A review*. **Science of The Total Environment**, volume 697. Dezembro, 2019.

PEI, M. et al. *State of the art of tertiary treatment technologies for controlling antibiotic resistance in wastewater treatment plants*. **Environment International**, volume 131. Outubro, 2019.

PERRIN, A. et al. *Evolutionary dynamics and genomic features of the Elizabethkingia anophelis 2015 to 2016 Wisconsin outbreak strain*. **Nature Communications**. Maio, 2017.

PETTIBONE, G.W. et al. *Incidence of antibiotic and metal resistance and plasmid carriage in Aeromonas isolated from brown bullhead (Ictalurus nebulosus)*. **Letters in Applied Microbiology** volume 23, págs 234–240. 1996.

POGUE, J. M. et al. Ceftazidime/Avibactam, Meropenem/Vaborbactam, or Both? Clinical and Formulary Considerations. *Clinical Infectious Diseases*,

volume 68, número 3. Fevereiro, 2019.

POROB, S. *Quantification and Characterization of Antimicrobial Resistance in Greywater Discharged to the Environment*. **Water**, volume 12, número 1460. Abril, 2020

PORTAL TRATAMENTO DE AGUA. Sistema de lodos ativados. **Portal Tratamento de Agua**. Disponível em: [Sistema de lodos ativados \(tratamentodeagua.com.br\)](http://tratamentodeagua.com.br) Acesso em: Acesso em: 26/04/2022 .2019.

PRADO, T. MIAGOSTOVICH, M. P. *Virologia ambiental e saneamento no Brasil: uma revisão narrativa*. **Caderno Saúde Pública**, volume 30, número 7, Rio de Janeiro. Julho, 2014.

RAZA, S. *et al. Higher abundance of core antimicrobial resistant genes in effluent from wastewater treatment plants*. **Water Research**, volume 208. 2022.

REZENDE, D. C. V. **Tanque de evapotranspiração no tratamento de Esgoto sanitário em comunidades rurais**. 39p. Dissertação (mestrado em Conservação dos Recursos Naturais do Cerrado). Urutaí, 2019.

ROLAIN, J. M. *Food and human gut as reservoirs of transferable antibiotic resistance encoding genes*. **Frontiers in Microbiology**. Junho, 2013

ROUCH, D. *et al. Understanding cellular responses to toxic agents: a model for mechanism-choice in bacterial metal resistance*. **Journal of Industrial Microbiology**, volume 14, págs. 132-141. 1995.

RUIMY, R. *et al. Organic and conventional fruits and vegetables contain equivalent counts of Gram-negative bacteria expressing resistance to antibacterial agents*. **Environmental Microbiology**, volume 12, págs 608–615.

2010.

SANDEGREN, L, *et al.* Nitrofurantoin resistance mechanism and fitness cost in *Escherichia coli*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** volume 62, págs. 495–503. 2008.

SANTOS, G. R. SANTANA, A. S. Gestão comunitária da água: soluções e dificuldades do Saneamento rural no Brasil. **Texto para discussão**. Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada. Brasília, 2020.

SANTOS, I. A. L. *et al.* **Mecanismos de resistência antimicrobiana em *Pseudomonas aeruginosa***. ARCA, Artigo de Revisão. Rio de Janeiro, 2015.

SHIELDS, R. K. *Emergence of Ceftazidime-Avibactam Resistance Due to Plasmid-Borne blaKPC-3 Mutations during Treatment of Carbapenem-Resistant Klebsiella pneumoniae Infections*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, volume 61, número 3. Fevereiro, 2017.

SILVA, R. A. *et al.* Resistência a Antimicrobianos: a formulação da resposta no âmbito da saúde global. **Saúde em debate**, volume 44. Novembro, 2020.

SILVEIRA, L. S. *et al.* Investigação do gene mcr-1 em isolados resistentes à colistina na região de Santa Maria-RS. **DisciplinarumScientia**, volume 20, número 2. 2019.

SINGER, A. C. *et al.* *Review of antimicrobial resistance in the environment and its relevance to environmental regulators*. **Frontiers in Microbiology** volume 7, número 1728. 2016.

SNIS. 25º Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgotos – 2021. 186p. **Ministério do Desenvolvimento Regional**, Brasília, 2021.

SORENSEN, A. H., *et al.* *Conjugative plasmid conferring resistance to olaquinox*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** volume 47, págs 798–799. 2003.

SOUSA, A. C. A. Gomes, J. P. Desafios para o investimento público em saneamento no Brasil. Revista **Saúde Debate**, Volume 43, Número Especial 7. Rio de Janeiro. Dezembro, 2019.

SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. 3^a Ed. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental. Universidade Federal de Minas Gerais. 2005.

SUKHUM, K. V. *et al.* *Genomic and metagenomic approaches for predictive surveillance of emerging pathogens and antibiotic resistance*. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, volume 106, número 3, págs. 512–524. Setembro, 2019.

TAVARES, F. B. R., *et al.* Análise do Acesso da População Brasileira a Serviços de Saneamento Básico. **Research, Society and Development**, volume 8, número 4. Fevereiro, 2019.

TOMACHEWSKI, D. **Utilização de aprendizado de máquina para classificação de bactérias através de proteínas ribossomais**. Ponta Grossa, 2017.

TONETTI, A. *et al.* **Tratamento de esgotos domésticos em comunidades isoladas: referencial para a escolha de soluções**. Campinas, SP. Biblioteca/Unicamp, 2018

TORDIN, C. Contaminantes emergentes podem ser uma ameaça na água para consumo humano. **Embrapa**, São Paulo, 2018. Disponível em: [Contaminantes emergentes podem ser uma ameaça na água para consumo humano - Portal Embrapa](#). Acesso em: 21/04/2022.

TRATA BRASIL. Acesso em www.tratabrasil.org.br. Visualizado em 11/08/2021.

TSUJI A. *et al.* An epidemiological study of the susceptibility and frequency of multiple-drug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated at medical institutes nationwide in Japan. **Journal Infection and Chemotherapy**, volume 11, número 2, págs: 64-70. Abril, 2005.

UG, A., CEYLAN, O. Occurrence of resistance to antibiotics, metals, and plasmids in clinical strains of *Staphylococcus spp.* **Archives of Medical Research** volume 34, págs 130–136. 2003.

UNESCO. **World Social Science Report: Challenging Inequalities: Pathways to a Just World.** International Social Science Council (ISSC); The Institute of Development Studies (IDS). Paris, França, 2016.

UNICEF. **Progress on Sanitation and Drinking Water. Update and MDG Assessment United Nations Children's Fund (UNICEF); World Health Organization.** New York, NY, EUA, 2015.

VENTER, H. *et al.*, Antimicrobial resistance in healthcare, agriculture and the environment: the biochemistry behind the headlines. **Essays in Biochemistry**, volume 61, número 1, pag. 1-10. Fevereiro, 2017.

VERHOEVENA, J.T.A. Meuleman, A.F.M. *Wetlands for wastewater treatment: Opportunities and limitations.* Revista **Ecological Engineering** Volume 12. Janeiro, 1999.

VOLKE, D. C. *et al.* *Pseudomonas putida.* **Trends in Microbiology**, volume 28, número 16, págs. 512-513. 2020.

VOLTOLINI, I. *et al.* Esterilizador ultravioleta em estação de tratamento de esgoto visando reuso agrícola. Revista **Ciência, Tecnologia & Ambiente**, volume 11, número 11190. 2021.

YENDO *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* as an uncommon agent of infectious panniculitis. **Anais Brasileiros de Dermatologia.** Março, 2022.

YUM, J. H. *et al.* Genetic diversity of chromosomal metallo- β -lactamase genes in clinical isolates of *Elizabethkingia meningoseptica* from Korea. **Journal of Microbiology**, volume 48, págs. 358-364. 2010.