

Detecção e quantificação de bactérias resistentes aos antibióticos ampicilina e cloranfenicol em estações de tratamento de esgoto doméstico

Detection and quantification of bacteria resistant to ampicillin and chloramphenicol in domestic sewage treatment plants

Elayne Cristina Machado¹ , Cíntia Dutra Leal¹ , Bruna Lopes Coelho¹ , Carlos Augusto de Lemos Chernicharo¹ , Juliana Calábria de Araújo^{1*} 

RESUMO

Estações de tratamento de esgotos (ETEs) estão entre as principais fontes de disseminação de bactérias resistentes a antibióticos (BRAs) e genes de resistência (GRAs) no ambiente. Este trabalho quantificou a ocorrência de bactérias resistentes aos antibióticos ampicilina e cloranfenicol no esgoto bruto (EB), no efluente tratado (ET) e no lodo de duas ETEs em escala plena por um período de nove meses. As unidades investigadas utilizavam os seguintes sistemas de tratamento: ETE-A, sistema de lodos ativados convencional; e a ETE-B, reatores anaeróbios (UASB) seguidos de filtros biológicos percoladores (FBP). Os resultados evidenciaram que a ETE-A foi mais eficiente na redução das concentrações de bactérias resistentes à ampicilina e ao cloranfenicol (cerca de 1,1 e 0,7 log₁₀UFC.mL⁻¹ de remoção, respectivamente), quando comparada com a ETE-B (0,5 log₁₀ UFC.mL⁻¹ de remoção para as bactérias resistentes ao cloranfenicol e nenhuma remoção para as resistentes à ampicilina). As amostras de lodo, de ambas ETEs, apresentaram elevadas concentrações de bactérias heterotróficas totais – BHTs (4,8-7,6 log₁₀UFC.mL⁻¹) e de BRAs (3,0-6,3 log₁₀UFC.mL⁻¹). A maioria das cepas resistentes à ampicilina e ao cloranfenicol isoladas foi identificada como sendo da família Enterobacteriaceae. Algumas das espécies identificadas são bactérias potencialmente patogênicas, tais como: *Klebsiella pneumoniae*, *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium*, *Salmonella* spp. Os resultados chamam a atenção para a disseminação de BRAs, potencialmente patogênicas, no meio ambiente a partir do efluente final (proveniente do tratamento secundário) das ETEs, independentemente do tipo de sistema adotado. Fica evidente que para reduzir significativamente a concentração das BRAs no ET, este deveria passar por tratamento adicional e desinfecção.

Palavras-chave: ampicilina; cloranfenicol; bactérias cultiváveis; resistência a antibiótico; estação de tratamento de esgoto.

ABSTRACT

Sewage treatment plants (STP) are among the main sources of dissemination of antibiotic-resistant bacteria (ARB) and antibiotic-resistance genes (ARG) into the environment. This work quantified the occurrence of cultivable ampicillin-resistant and chloramphenicol-resistant bacteria in raw sewage, treated effluent and sludge samples from two full-scale STP over nine months. The STP investigated used the following treatment systems: STP-A used conventional activated sludge system; and STP-B, anaerobic reactors (UASB) followed by percolating biological filters (PBF). Results showed that was more efficient in reducing the concentrations of ampicillin- and chloramphenicol-resistant bacteria (around 1.1 and 0.7 log₁₀UFC.mL⁻¹, respectively) when compared to STP-B (0.5 log₁₀ UFC.mL⁻¹ removal of chloramphenicol-resistant bacteria and no-removal of ampicillin-resistant bacteria). Sludge samples, from both STP, showed high concentrations of total heterotrophic bacteria (THB; 4.8-7.6 log₁₀UFC.mL⁻¹) and ARB (3.0-6.3 log₁₀UFC.mL⁻¹). Most of the isolated ampicillin- and chloramphenicol-resistant strains were identified as members of the Enterobacteriaceae family. Some of the identified species are potential pathogenic bacteria, such as *Klebsiella pneumoniae*, *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium*, *Salmonella* spp. These results call attention to the spread of ARB, potentially pathogenic, in the environment from the final effluent (from secondary effluent) on the STP, regardless of the type of system adopted. It is evident that in order to significantly reduce the concentration of ARB in the treated effluent, it should undergo additional treatment and disinfection.

Keywords: ampicillin; chloramphenicol; cultivable bacteria; antibiotic resistance; sewage treatment plant.

¹Universidade Federal de Minas Gerais - Belo Horizonte (MG), Brasil.

*Autora correspondente: juliana@desa.ufmg.br

Recebido: 04/06/2018 - Aceito: 01/09/2019 - Reg. Abes: 20180001

INTRODUÇÃO

Uma das maiores preocupações em saúde pública no mundo é a resistência aos antimicrobianos. Estes estão sendo usados indiscriminadamente e têm se tornado pouco eficientes, o que faz com que seja cada vez mais difícil tratar um número crescente de infecções (ANVISA, 2017). Os antimicrobianos são compostos naturais ou sintéticos utilizados para melhorar a saúde humana, animal e vegetal, bem como prevenir e tratar infecções causadas por bactérias patogênicas em humanos e animais (BOUKI; VENIERI; DIAMADOPOULOS, 2013).

No Brasil, o consumo de antimicrobianos e o cenário da resistência que eles vêm induzindo preocupam. De acordo com dados do Sistema de Acompanhamento de Mercado de Medicamentos (SAMMED), em 2015, quase 73 milhões de embalagens de antimicrobianos foram comercializadas pela indústria farmacêutica. Apesar de não haver tendência de aumento na venda de antimicrobianos para a saúde humana, preocupa o fato de que a comercialização desses medicamentos também não diminuiu (ANVISA, 2017).

Os antimicrobianos e seus metabólitos chegam ao meio ambiente por diversas rotas, sendo os esgotos (doméstico e hospitalar) e os efluentes das estações de tratamento de esgotos (ETEs) as principais fontes de contaminação. Esses resíduos químicos podem interferir diretamente na ecologia microbiana, selecionando bactérias resistentes, aumentando a variabilidade genética e fenotípica, afetando a formação de biofilmes e a expressão gênica entre populações bacterianas (CAIRNS *et al.*, 2018). Tais efeitos podem modificar as interações competitivas das espécies e, com isso, o funcionamento e a estrutura das comunidades microbianas (BAQUERO; MARTÍNEZ; CANTÓN, 2008; BOUKI; VENIERI; DIAMADOPOULOS, 2013).

Diferenças nos tratamentos adotados nas ETEs podem influenciar a remoção das bactérias resistentes a antibióticos (BRAs) e genes de resistência (GRAs) das águas residuárias (BOUKI; VENIERI; DIAMADOPOULOS, 2013). No Brasil, foram realizadas diversas pesquisas sobre o papel das ETEs na remoção de matéria orgânica e outros poluentes (AQUINO; BRANDT; CHERNICHARO, 2013; FLORIPES *et al.*, 2018). Existem ainda trabalhos sobre a composição e a função da microbiota presente em etapa específica do tratamento (MAC CONELL *et al.*, 2013). Entretanto, pesquisas sobre o papel das ETEs na disseminação e/ou remoção das BRAs e GRAs são raras no Brasil. A maioria dos estudos investigou esgoto hospitalar e/ou fez isolamento de um grupo específico de bactérias, além de pesquisar patógenos resistentes (ABREU *et al.*, 2010; LOPES *et al.*, 2016; OLIVEIRA, 2011; PICÃO *et al.*, 2013; PRADO, 2007).

Diversos autores relataram que os efluentes das ETEs estão entre as principais fontes de disseminação de antibióticos, BRAs

e GRAs para o meio ambiente; e as ETEs são consideradas verdadeiros *hot spots* de elementos de resistência (GAO; MUNIR; XAGORARAKI, 2012; LAHT, *et al.*, 2014; RIZZO *et al.*, 2013; YUAN; GUO; YANG, 2015; ZHANG *et al.*, 2015; NOVO *et al.*, 2013; NOVO; MANAIA, 2010). Isso se deve ao fato de que as bactérias são continuamente misturadas aos antibióticos presentes no esgoto e, mesmo em concentrações subinibitórias, estes exercem efeito de pressão seletiva (BOUKI; VENIERI; DIAMADOPOULOS, 2013; CAIRNS *et al.*, 2018).

As pesquisas por BRAs e GRAs circulando no meio ambiente, principalmente a partir do lançamento de efluentes de ETEs, têm ganhado destaque no meio científico (HUANG *et al.*, 2012; RIZZO *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2015). Não obstante, no Brasil não existem estudos sobre a ocorrência e a remoção das BRAs e de GRAs em ETEs em escala plena, tampouco sobre a eficiência dos processos de tratamento na redução das concentrações de BRAs e GRAs no efluente tratado (ET). Portanto, os objetivos deste trabalho foram: identificar e quantificar a ocorrência de bactérias totais cultiváveis e resistentes aos antibióticos ampicilina e cloranfenicol no esgoto bruto (EB), no ET e no lodo de duas ETEs, em escala plena, que utilizam diferentes processos biológicos de tratamento.

MATERIAL E MÉTODOS

Estações de tratamento investigadas e coleta de amostras

Neste trabalho foram investigadas duas ETEs, escala plena, situadas na Região Metropolitana de Belo Horizonte. A ETE-A utilizava sistema de lodos ativados convencional, enquanto a ETE-B utilizava reatores UASB seguidos de filtros biológicos percoladores. As principais características das ETEs investigadas são apresentadas na Tabela 1.

Amostras de EB, ET e lodo provenientes das duas ETEs foram coletadas mensalmente, no período de agosto de 2017 a abril de 2018. Para o EB e o ET, cerca de 4 a 5 L de amostras compostas (durante 24 horas) foram coletadas. Em ambas as ETEs, o efluente final tratado foi coletado na saída do decantador secundário. No caso das amostras de lodo, foram coletados 10 g. Na ETE-A, o lodo foi coletado após etapa de digestão anaeróbia e centrifugação. Na ETE-B, o lodo excedente dos reatores UASB foi coletado após a etapa de centrifugação.

Todas as amostras foram armazenadas em recipientes estéreis (frascos de polipropileno), identificadas e acondicionadas em caixas de isopor (com gelo) e, em seguida, transportadas ao Laboratório de Microbiologia do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Análises microbiológicas e moleculares para determinação das bactérias heterotróficas totais cultiváveis e bactérias resistentes a antibióticos

Bactérias heterotróficas totais cultiváveis e bactérias resistentes a antibióticos

Isolamento e quantificação

No laboratório, as amostras foram diluídas em série e 0,1 mL da maior diluição foi aplicado na placa (por *spread plate*) em meio de cultivo. Para a determinação das bactérias heterotróficas totais (BHTs) cultiváveis, utilizou-se o meio *Plate Count Agar* (PCA, KASVI) sem antibiótico (APHA, 1998). Para a determinação da concentração de BRAs, foi utilizado o meio PCA suplementado com um dos antibióticos testados: 32,0 mg.L⁻¹ de ampicilina e 32,0 mg.L⁻¹ de cloranfenicol. Após a inoculação, as placas foram incubadas a 37°C durante 48 horas e, em seguida, a 27°C por mais 5 dias (BROOKS *et al.*, 2007; MUNIR; WONG; XAGORARAKI, 2011). Após essa etapa foram realizadas as contagens

Tabela 1 - Características das estações de tratamento de esgotos avaliadas neste trabalho.

ETE	A	B
Tipo de esgoto	Doméstico	Doméstico
Processo de tratamento	Lodos ativados convencional	Reatores UASB + FBP
Vazão média (m ³)	2,42	1,62
TDH (hora)	9	12
População atendida (hab.)	1.500.000	1.200.000
Temp. °C EB	24,4 ± 1,3	24,6 ± 1,7
Temp. °C ET	25,0 ± 1,4	23,9 ± 1,8
pH EB	7,4 ± 0,3	7,7 ± 0,4
pH ET	7,2 ± 0,3	7,6 ± 0,2
SST- EB mg.L ⁻¹	245,1 ± 64,3	332,4 ± 137,0
SST- ET mg.L ⁻¹	91,0 ± 44,2	48,6 ± 21,4
Eficiência de remoção SST (%)	61,94	84,7
DBO-EB mg.L ⁻¹	199,82 ± 35,2	192,4 ± 55,7
DBO-ET mg.L ⁻¹	65,3 ± 31,4	30,8 ± 12,5
Eficiência de remoção DBO (%)	66,73	84,2
DQO-EB mg.L ⁻¹	503,5 ± 100,9	594,9 ± 245,2
DQO-ET mg.L ⁻¹	140,7 ± 63,9	138,9 ± 63,6
Eficiência de remoção DQO (%)	71,57	76,9
<i>Escherichia coli</i> EB (NMP/100.mL ⁻¹)	5,5×10 ⁷ ± 5,1×10 ⁷	3,0×10 ⁹ ± 2,2×10 ⁹
<i>Escherichia coli</i> ET (NMP/100.mL ⁻¹)	1,3×10 ⁶ ± 2,8×10 ⁶	7,5×10 ⁸ ± 4,4×10 ⁸

*Dados de monitoramento das estações de tratamento de esgoto fornecidos pela concessionária local (valores médios do período de agosto/2017 a abril/2018 ± desvio padrão); TDH: tempo de detenção hidráulica; ETE: estação de tratamento de esgoto; Temp.: temperatura; EB: esgoto bruto; ET: efluente tratado; SST: sólidos suspensos totais; DBO: demanda biológica de oxigênio; DQO: demanda química de oxigênio.

das unidades formadoras de colônia (UFC) por placa. Todas as determinações foram realizadas em duplicata.

Após contagem dos isolados de BHTs e BRAs, cerca de cinco colônias foram selecionadas para posterior extração de DNA e identificação taxonômica.

Extração de DNA

O DNA total das bactérias isoladas (BHTs e BRAs) foi extraído segundo o protocolo de Takeuchi *et al.* (1997) modificado. As colônias foram cultivadas em 1,0 mL de caldo *Brain Heart Infusion* (BHI), durante 18 horas sob agitação de 130 rpm, a temperatura de 37°C. As células foram separadas do meio por centrifugação (4.000 rpm por 20 minutos), sendo o sobrenadante descartado. Os *pellets* foram lavados com tampão fosfato-salino (NaCl, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, pH 7.2), centrifugados a 4.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, e as demais etapas de extração foram realizadas de acordo com o protocolo de Takeuchi *et al.* (1997).

Amplificação do DNAr 16S pela técnica da reação em cadeia da polimerase

Para amplificação do gene RNAr 16S a partir dos DNAs extraídos das BHTs e BRAs isoladas, foram utilizados os *primers*: 341F (5'- CCT ACG GGA GGC AGC AG - 3') e 1492R (5'- ACG GTT ACC TTG TTA CGA CTT - 3') (SIMMONS *et al.*, 2004). Após extração do DNA, as reações de amplificação foram efetuadas em 50 µL de solução contendo os seguintes componentes: 25 µL de Pré-mix 2x IB (Phoneutria, Brasil), 3,0 µL BSA (soro albumina bovina) (5 µg.µL⁻¹), 18 µL de água ultrapura (Ambion, Life Technology, Frankfurt, Germany), 0,5 µL de cada primer (25 µM), e 3 µL de DNA (concentração 30 ng.µL⁻¹). A reação de amplificação foi realizada no termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) na seguinte condição: desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 49°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 3 minutos durante 30 ciclos e extensão final de 7 minutos a 72°C. Os fragmentos do gene RNAr 16S amplificados foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,2% (Invitrogen Life Technologies, Brasil), utilizando uma alíquota do produto da PCR corado com 2,0 µL de *Loading buffer* (0.25% azul de bromofenol e 40% sacarose) e o padrão de peso molecular 1Kb DNA *Plus Ladder* (Invitrogen Life Technologies, Brasil).

Análise de restrição do DNAr 16S amplificado

A seleção dos isolados, para sequenciamento do DNA e posterior identificação taxonômica, foi feita a partir da análise do perfil de restrição (ARDRA). Essa análise se baseia na digestão do produto amplificado do gene RNAr 16S usando enzimas de restrição e posterior separação dos fragmentos em gel de agarose.

Os produtos amplificados (10 µL) foram digeridos com 0,6 µL (10 U. µL⁻¹) da enzima HaeIII (GG/CC - CC/GG - Sinapse Biotecnologia, São

Paulo, SP, Brasil), 3 μL de tampão C (Sinapse Biotecnologia, São Paulo, SP, Brasil), completando com H_2O MilliQ estéril para volume final de 30 μL , por 2 horas, em banho-maria a temperatura de 37°C, de acordo com protocolo de Massol-Deya *et al.* (1995). A separação e visualização dos perfis de restrição foi realizada em eletroforese em gel de agarose 2,0% (Invitrogen Life Technologies, Brasil) com 10 μL desse material.

Sequenciamento e identificação taxonômica dos isolados a partir do DNAr 16S
A identificação de cada isolado selecionado foi obtida por meio do sequenciamento do gene RNAr 16S. A amplificação desse gene foi realizada utilizando os *primers* 341F e 1492R nas condições mencionadas anteriormente. Após amplificação, os produtos da PCR foram quantificados em gel de agarose 1,2% e posteriormente enviados para sequenciamento unidirecional na empresa Macrogen Inc. (Coreia) (em Sequenciador 3730XL). As seqüências de DNA obtidas foram analisadas e editadas manualmente utilizando o programa BioEdit Sequence Alignment Editor versão 6.0.3 (Isis Pharmaceuticals, Inc.) e alinhamentos múltiplos foram realizados por intermédio do programa Clustal W. As seqüências de DNA foram comparadas com aquelas disponíveis no banco de dados GenBank utilizando o programa BLAST

do Centro Nacional para Informação Biotecnológica (National Center for Biotechnology Information — NCBI) (ALTSCHUL *et al.*, 1990).

Análise estatística dos dados

Para avaliação das diferenças estatísticas entre as concentrações de BHTs e BRAs determinadas, foi utilizado o teste de comparação entre duas amostras de Mann-Whitney, com nível de significância de 5%. O software utilizado foi o Statistica 12.5 (StataSoft EUA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Bactérias heterotróficas totais cultiváveis e resistentes a antibióticos

Estação de tratamento A: sistema de lodos ativados convencional

As concentrações de BHTs e de bactérias resistentes aos antibióticos ampicilina e cloranfenicol, nas amostras de EB, ET e lodo da ETE-A são apresentadas na Figura 1.

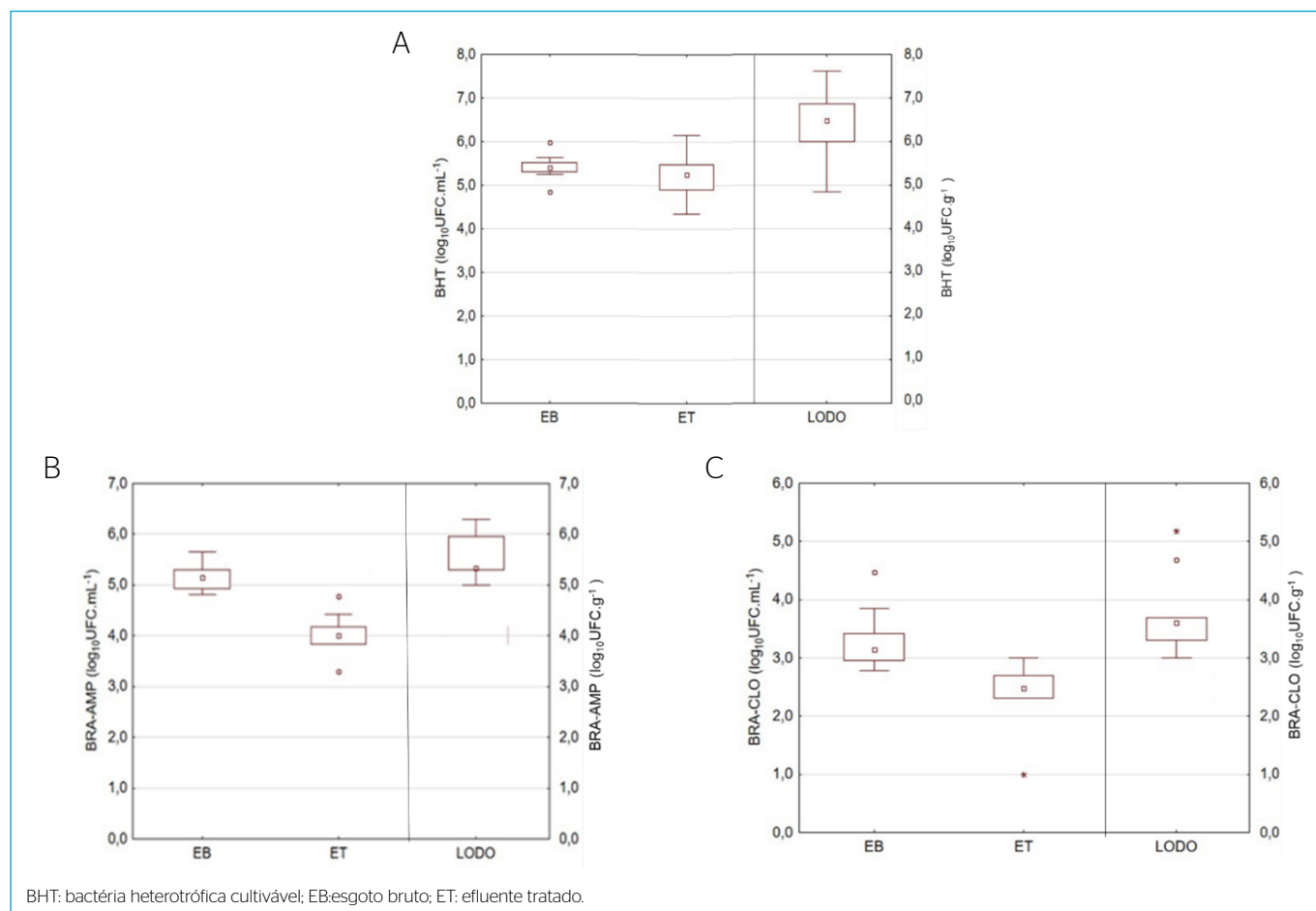


Figura 1 – Log da concentração (UFC.mL⁻¹ ou UFC.g⁻¹) de bactérias heterotróficas cultiváveis (A) e bactérias resistentes à (B) ampicilina e ao (C) cloranfenicol nas amostras de esgoto bruto e efluente tratado e lodo da estação de tratamento de esgoto A (sistema de lodos ativados convencional) (n = 9).

As concentrações de BHTs variaram de 4,5 a 5,6 log₁₀ UFC.mL⁻¹ no EB; de 3,3 a 5,0 log₁₀ UFC.mL⁻¹ no ET; e de 5,3 a 7,3 log₁₀ UFC.mL⁻¹ no lodo (Figura 1A). As concentrações de BHTs no EB estiveram abaixo dos valores reportados pela literatura. Zhang *et al.* (2015), analisando três ETEs com sistema de lodos ativados, verificaram concentrações de BHTs da ordem de 5,7 a 6,5 log₁₀ UFC.mL⁻¹ e Munir, Wong e Xagorarakis (2011) reportaram valores na faixa de 6,0 a 7,0 log₁₀ UFC.mL⁻¹. Não obstante, para as concentrações de BHTs no lodo e no ET, os valores do presente estudo foram mais próximos aos reportados por Munir, Wong e Xagorarakis (2011). Esses autores determinaram a concentração de BHTs em amostras de EB, ET (antes e após etapa de desinfecção) e lodo em cinco ETEs que utilizavam tecnologias de tratamento diferentes. No ET (antes da desinfecção), os valores reportados foram de 3,0–5,0 log₁₀ UFC.mL⁻¹. Já para o lodo as concentrações de BHT foram de 6,0 a 8,0 log₁₀ UFC.mL⁻¹ (após diferentes tratamentos) e cerca de 8,0 log₁₀ UFC.g⁻¹ no lodo após digestão anaeróbia, evidenciando, portanto, que o lodo, mesmo após digestão anaeróbia, ainda apresentou elevada concentração de BHT, característica também verificado no presente trabalho.

Com relação às bactérias resistentes à ampicilina (Figura 1B), verificaram-se concentrações que variaram de 4,8 a 5,7 log₁₀ UFC.mL⁻¹ no EB; de 3,3 a 4,8 log₁₀ UFC.mL⁻¹ no ET; e de 5,0 a 6,3 log₁₀ UFC.mL⁻¹ no lodo. Já para as bactérias resistentes ao cloranfenicol (Figura 1C), as concentrações foram menores e variaram de 2,8 a 4,5 log₁₀ UFC.mL⁻¹ no EB; de 1,0 a 3,0 log₁₀ UFC.mL⁻¹ no ET; e de 3,0 a 5,2 log₁₀ UFC.mL⁻¹ no lodo. Portanto, houve remoção das BRAs na ETE-A, sendo que maior redução foi verificada para as bactérias resistentes à ampicilina (1,1 log₁₀), quando comparadas com as bactérias resistentes ao cloranfenicol (redução de 0,7 log₁₀). Munir, Wong e Xagorarakis (2011) verificaram remoção de 2 a 3 log de bactérias resistentes aos antibióticos tetraciclina e sulfonamida em diferentes sistemas de tratamento

(incluindo sistema de lodos ativados convencional). Já Reinthaler *et al.* (2003) verificaram remoção de 2 a 4 unidades log de BRA (para 24 antibióticos diferentes) em sistema usando processo de lodos ativados seguido de desinfecção do efluente (cloração). Le *et al.* (2018) reportaram concentrações de BRAs (resistentes a 10 antibióticos, incluindo cloranfenicol) EB de 4 a 6 log₁₀ UFC.mL⁻¹ no e de 2 a 4 log₁₀ UFC.mL⁻¹ no ET, resultados similares aos valores encontrados no presente estudo. Esses autores verificaram remoção de cerca de 2 a 3 unidades log de BRAs no sistema de lodos ativados convencional e reportaram que não houve diferença significativa de remoção das BRAs em função do tipo de antibiótico testado.

Assim, os valores de remoção do presente estudo estão abaixo daqueles reportados na literatura para o mesmo processo biológico (lodos ativados). As diferenças observadas podem estar relacionadas com a forma de operação dos sistemas (além da etapa de desinfecção no caso do trabalho de Reinthaler *et al.*, 2003), porque os autores citados não mencionaram detalhes de operação, como, por exemplo, o tempo de detenção hidráulica (TDH) dos referidos sistemas, tampouco eficiência de remoção (incluindo remoção do indicador *E. coli*). No presente estudo, de acordo com dados da Tabela 1, a remoção do indicador de contaminação (*E. coli*) foi de 1 unidade log para a ETE-A, semelhante à remoção de BRA observada.

Com relação à porcentagem de bactérias resistentes aos antibióticos em relação ao total de bactérias heterotróficas cultiváveis (BHTs) nas amostras da ETE-A (Figura 2), verificou-se maior porcentagem de bactérias resistentes a ampicilina no EB, ET e no lodo (97,3, 91,6, 86,1%, respectivamente (Figura 2A), quando comparada com a porcentagem de bactérias resistentes ao cloranfenicol (62,6% no EB, 59,2% no ET e 56,3% no lodo, Figura 2B). Valores similares foram reportados por Zhang *et al.* (2015) para a porcentagem de bactérias resistentes à ampicilina no EB e no ET. Não obstante, esses autores encontraram

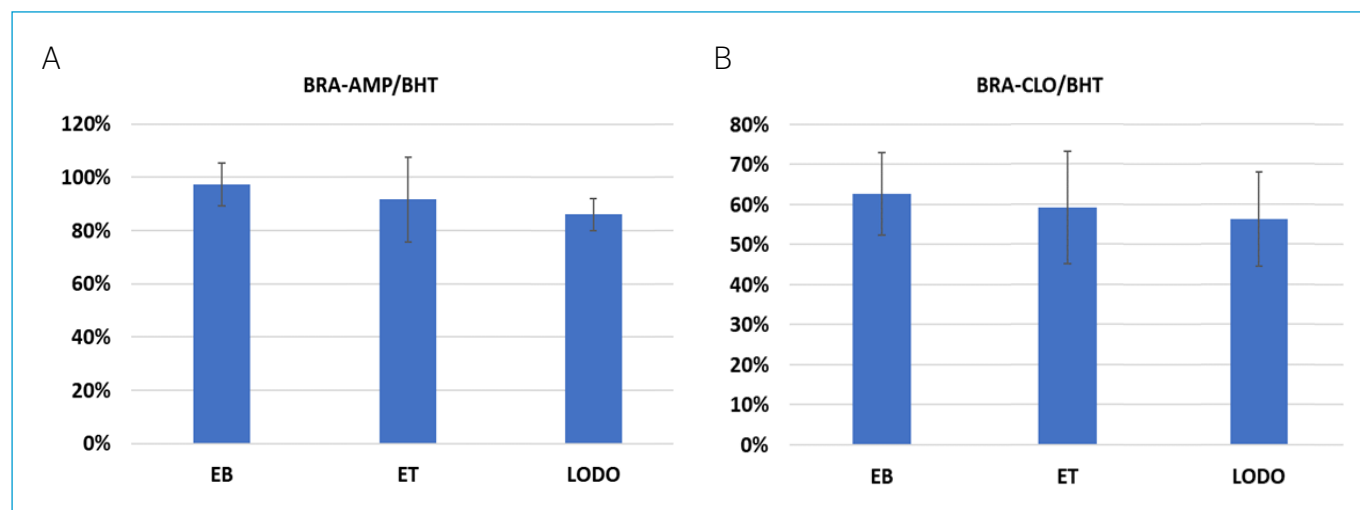


Figura 2 - Porcentagem de bactérias resistentes à (A) ampicilina e ao (B) cloranfenicol em relação ao total de bactérias heterotróficas cultiváveis nas amostras da estação de tratamento de esgoto A.

porcentagens maiores de bactérias resistentes ao cloranfenicol (cerca de 95%), quando comparadas ao presente estudo. Já Huang *et al.* (2012) reportaram porcentagens de bactérias resistentes ao cloranfenicol (69%) similares ao encontrado no presente estudo, mas diferentes para as resistentes à ampicilina (47%). Essa variação na porcentagem de resistência das BRAs no EB e no efluente de ETEs (de diferentes localidades e países) sugere diferença no consumo dos antibióticos por parte da população investigada entre os diferentes estudos.

É importante destacar, ainda, que a soma das porcentagens de bactérias resistentes à ampicilina e ao cloranfenicol em cada uma das amostras foi maior que 100% (Figura 2), o que indica a multirresistência das bactérias heterotróficas presentes nessas amostras. Fato semelhante foi reportado por Huang *et al.* (2012).

Estação de tratamento B: sistema composto de reator UASB seguido por filtros biológicos percoladores

As concentrações de BHTs e de bactérias resistentes à ampicilina e ao cloranfenicol para o EB, ET e lodo da ETE-B são apresentadas na

Figura 3. As concentrações de BHTs variaram de 4,8 a 6,0 \log_{10} UFC.mL⁻¹ no EB; de 4,3 a 6,1 \log_{10} UFC.mL⁻¹ no ET; e de 4,8 a 7,6 \log_{10} UFC.mL⁻¹ no lodo (Figura 3A). Esses resultados mostraram que não houve redução na concentração de BHT no ET (pelo sistema composto de reator UASB seguido de FBP), quando comparado ao EB. Quanto ao lodo, a concentração de BHT foi elevada, mas os valores encontrados foram semelhantes àqueles determinados no lodo da ETE-A e próximos aos valores reportados por Munir, Wong e Xagorarakis (2011) (6,0 a 8,0 \log_{10} UFC.mL⁻¹), que investigaram quatro ETEs com sistemas de tratamento diferentes (mas nenhuma empregava reatores UASB seguidos de FBP).

Com relação às BRAs, não houve redução significativa na concentração das bactérias resistentes à ampicilina na ETE-B. Entretanto, observou-se diferença significativa na concentração das bactérias resistentes ao cloranfenicol entre as amostras de EB e ET, demonstrando que o sistema combinado (reator UASB seguido de FBP) removeu cerca de 0,5 \log_{10} UFC.mL⁻¹. Trabalhos que investigaram a ocorrência de BHT e BRA em ETEs com reatores anaeróbios (UASB) seguidos de FBP

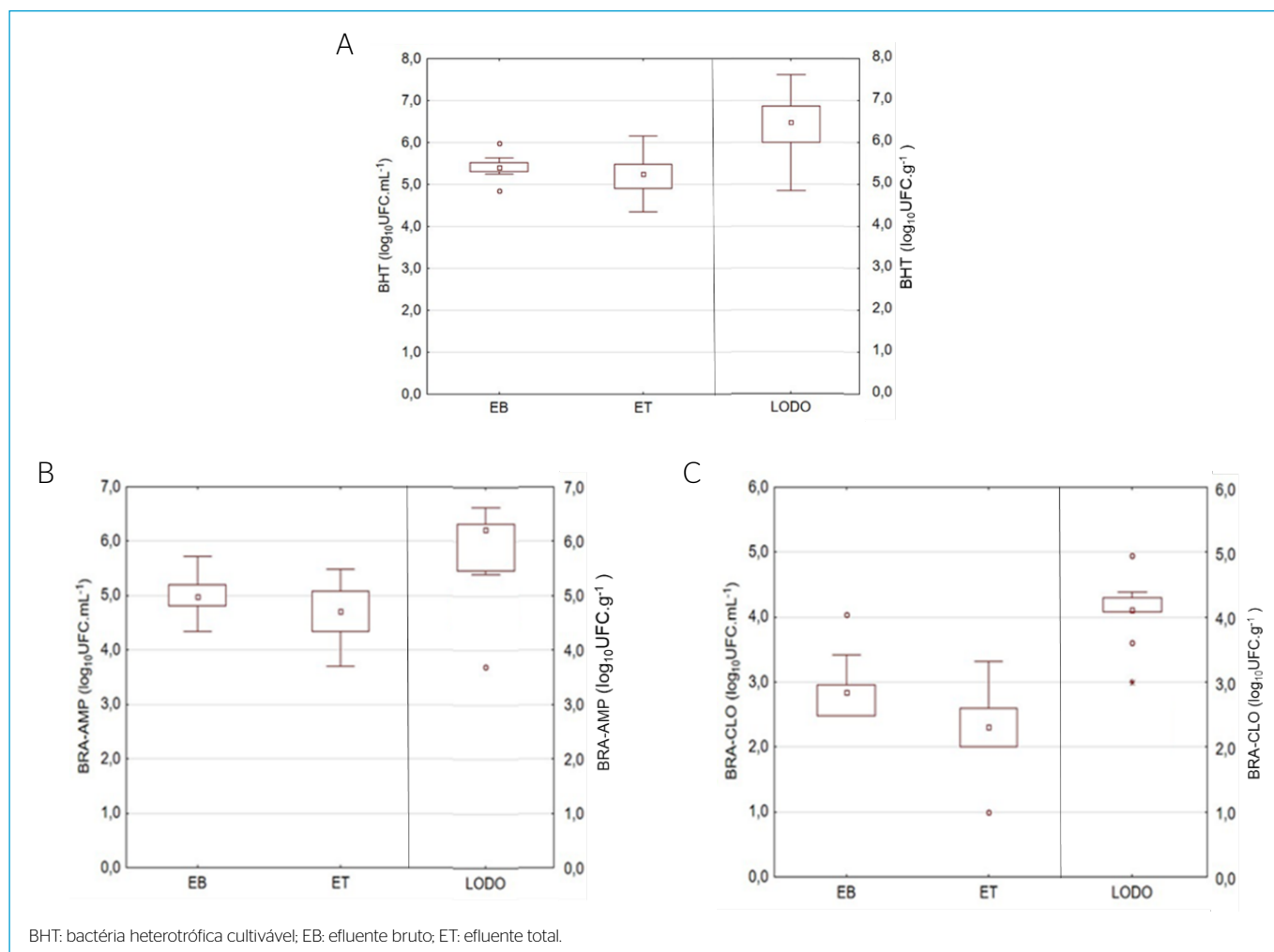


Figura 3 - Log da concentração (UFC.mL⁻¹ ou UFC.g⁻¹) de (A) bactérias heterotróficas cultiváveis e (B) bactérias resistentes a ampicilina e (C) ao cloranfenicol nas amostras de esgoto bruto e efluente tratado e lodo da estação de tratamento de esgoto B (UASB+FBP) (n=9)

são raros, se não inexistentes na literatura. Portanto, não se tem dados para comparar com estes obtidos no presente estudo para a ETE-B. De acordo com dados da Tabela 1, a remoção do indicador de contaminação fecal (*E. coli*) foi de 1 unidade log para a ETE-B, diferente da remoção de BRA observada para essa ETE. Portanto, esses resultados sugerem a importância de se ampliar o monitoramento microbiológico dos efluentes tratados, porque a concentração do indicador de contaminação fecal pode não apresentar correlação com os outros parâmetros investigados, como foi o caso da ocorrência de BHT e BRA. Além disso, considerando-se a disseminação da resistência aos antibióticos, a pesquisa por BRA em efluentes tratados é muito importante devido ao papel potencialmente relevante na transferência de material genético no meio ambiente (TUROLLA *et al.*, 2018).

Para as amostras de lodo, foram observadas concentrações de BRAs de 10⁶ UFC.g⁻¹ para ampicilina e de 10⁴ UFC.g⁻¹ para o cloranfenicol. Esses valores estão abaixo da faixa de concentração reportada no trabalho de Brooks *et al.* (2007) para bactérias resistentes a ciprofloxacina, ampicilina, tetraciclina e cefalotina (10⁶ a 10¹¹ UFC.g⁻¹) presentes no lodo após digestão anaeróbia. Não obstante, esses resultados demonstram que o lodo pode ser fonte de disseminação de BRAs no ambiente caso seja usado na agricultura ou como condicionador de solo e caso não seja feito tratamento adicional para redução das concentrações de BRAs.

Quanto às porcentagens de BRAs em relação às BHTs nas amostras da ETE-B (Figura 4), foram verificados valores e comportamentos similares aos reportados para a ETE-A. Cerca de 94,0 e 91,6% das bactérias isoladas a partir do EB e ET, respectivamente, foram resistentes à ampicilina (Figura 4A); enquanto as porcentagens das bactérias resistentes ao cloranfenicol foram menores (51,6 e 50,0%, no EB e ET, respectivamente — Figura 4B). Portanto, apesar de as ETEs receberem esgotos de regiões diferentes da área metropolitana de Belo Horizonte, não foram verificadas diferenças que sugerissem padrões de consumo distintos para os antibióticos investigados.

Com relação às concentrações de BHTs e BRAs determinadas ao longo dos diferentes meses, compreendendo as estações seca e chuvosa, não foram observadas diferenças estatísticas significativas nas concentrações das bactérias resistentes à ampicilina e ao cloranfenicol nas amostras de EB, ET e lodo (Tabela 2). Portanto, não houve efeito da sazonalidade na ocorrência e remoção das BRA nas ETEs investigadas.

Tabela 2 - Concentrações de bactérias heterotróficas e resistentes aos antibióticos, ampicilina e cloranfenicol, ao longo do período amostrado.

ETE-A (sistema lodos ativados convencional)		Valor médio de log ₁₀ UFC.mL ⁻¹ ± desvio padrão	
Grupo	Amostra	Estação seca* n = 4	Estação chuvosa** n = 5
BHT	Esgoto bruto	5,3 ± 0,2	5,0 ± 0,4
	Esgoto tratado	4,1 ± 0,4	4,2 ± 0,7
	Lodo	6,3 ± 0,1	6,5 ± 0,6
BRA-Ampicilina	Esgoto bruto	5,1 ± 0,4	5,2 ± 0,2
	Esgoto tratado	3,7 ± 0,5	4,2 ± 0,4
	Lodo	5,4 ± 0,4	5,7 ± 0,5
BRA-Cloranfenicol	Esgoto bruto	3,5 ± 0,8	3,1 ± 0,2
	Esgoto tratado	2,6 ± 0,3	2,2 ± 0,7
	Lodo	3,9 ± 0,9	3,7 ± 0,6

ETE - B (reatores UASB + FBP)		Valor médio de log ₁₀ UFC.mL ⁻¹ ± desvio padrão	
Grupo	Amostra	Estação seca* n = 4	Estação chuvosa** n = 5
BHT	Esgoto bruto	5,3 ± 0,3	5,5 ± 0,3
	Esgoto tratado	5,0 ± 0,5	5,3 ± 0,7
	Lodo	6,3 ± 0,5	6,5 ± 1,0
BRA-Ampicilina	Esgoto bruto	5,1 ± 0,4	4,9 ± 0,4
	Esgoto tratado	4,7 ± 0,7	4,7 ± 0,6
	Lodo	5,9 ± 0,5	5,7 ± 1,2
BRA-Cloranfenicol	Esgoto bruto	2,7 ± 0,2	3,1 ± 0,6
	Esgoto tratado	1,9 ± 0,6	2,4 ± 0,9
	Lodo	3,5 ± 0,6	4,1 ± 0,3

*Amostras coletadas em agosto-outubro/2017 e abril/2018 (valor médio de precipitação nesse período = 368 mm); **Amostras coletadas de dezembro/2017 a março/2018 (valor médio de precipitação nesse período = 1159 mm); ETE: estação de tratamento de esgoto; BHT: bactérias heterotróficas cultiváveis; BRA: bactérias resistentes a antibióticos.

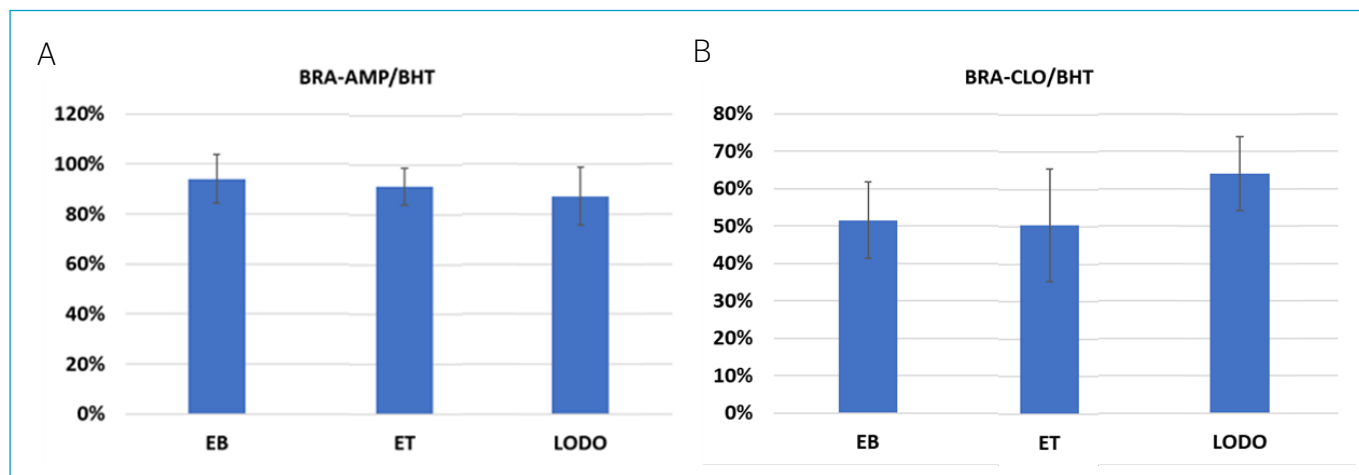


Figura 4 - Porcentagem de bactérias resistentes à (A) ampicilina e ao (B) cloranfenicol em relação ao total de bactérias heterotróficas cultiváveis nas amostras da estação de tratamento de esgoto B.

Identificação das bactérias resistentes a antibióticos isoladas

Nas Tabelas 3 e 4 são apresentadas as bactérias identificadas e que foram resistentes à ampicilina e ao cloranfenicol, respectivamente. Das 33 cepas isoladas resistentes à ampicilina e das 21 resistentes ao cloranfenicol sequenciadas, cerca de 19 (58%) e 16 (76%), respectivamente, foram identificadas como sendo membros da família Enterobacteriaceae (Tabelas 3 e 4). Membros da família Enterobacteriaceae são bacilos Gram-negativos que normalmente se localizam no intestino e podem causar infecções nas vias urinárias e na circulação sanguínea, bem como pneumonias associadas ao

cuidado médico (ABREU *et al.*, 2010). *E. coli* é causa frequente de infecções urinárias; *Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp. são causas importantes de pneumonias; *Salmonella* spp. pode causar gastroenterites e, subsequentemente, em alguns pacientes, infecção invasiva (PATERSON, 2006).

No presente estudo, os gêneros *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Escherichia* foram frequentemente detectados dentre as cepas resistentes tanto à ampicilina quanto ao cloranfenicol. Não obstante, membros das famílias Enterococaceae (*Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis*), Bacillaceae (*Bacillus cereus* e *Bacillus wiedmannii*), Aeromonadaceae (*Aeromonas hydrophila*), Clostridiaceae (*Clostridium perfringens*) e

Tabela 3 - Identificação das bactérias resistentes a ampicilina*.

Colônia	Banco de dados GenBank	Blast			Origem das amostras	período
		Identificação	%	N. acesso		
01	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	88	KJ569371.1	EB - A	CHUVOSO
02	<i>Klebsiella</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99	NR_117683.1	EB - A	CHUVOSO
03	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacteriaceae bacterium</i>	97	EU348748.1	EB - A	CHUVOSO
09	<i>Kluyvera</i>	<i>Kluyvera georgiana</i>	97	NRO24883.1	EB - A	SECA
14	<i>Raoultella</i>	<i>Raoultella terrigena</i>	97	NR_114503.1	EB - A	SECA
18	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas montellii</i>	99	NR_114224.1	EB - A	SECA
20	<i>Lactobacillales</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	86	NR_113904.1	EB - A	SECA
24	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	98	NR_113344.1	EB - A	CHUVOSO
25	<i>Alcaligenes</i>	<i>Alcaligenes faecalis</i>	96	MG674701.1	EB - A	CHUVOSO
05	<i>Comamonas</i>	<i>Comamonas terrigena</i>	97	NR_113597.1	ET - A	CHUVOSO
04	<i>Chryseobacterium</i>	<i>Chryseobacterium hispalense</i>	97	NR_116277.1	ET - A	CHUVOSO
19	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Erwinia persicina</i>	94	NR_114078.1	ET - A	SECA
21	<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia fergusonii</i>	97	NR_074902.1	ET - A	SECA
26	<i>Aeromonas</i>	<i>Aeromonas caviae</i>	99	NR_104824.1	ET - A	CHUVOSO
36	<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Chryseobacterium hispalense</i>	97	NR_116277.1	ET - A	CHUVOSO
35	<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia fergusonii</i>	100	NR_074902.1	ET - A	CHUVOSO
46	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacter tabaci</i>	97	NR_146667.2	ET - A	SECA
52	<i>Klebsiella</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	97	NR_113597.1	ET - A	CHUVOSO
37	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Escherichia marmotae</i>	96	NR_136472.1	Lodo - A	CHUVOSO
17	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	98	NR_074540.1	Lodo - A	SECA
23	<i>Klebsiella</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	97	NR_119278.1	Lodo - A	SECA
27	<i>Aeromonas</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	100	NR_074841.1	Lodo - A	CHUVOSO
38	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Klebsiella michiganensis</i>	95	NR_118335.1	Lodo - A	CHUVOSO
39	<i>Providencia</i>	<i>Providencia vermicola</i>	97	NR_042415.1	Lodo - A	CHUVOSO
40	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	96	NR_102794.2	EB - B	CHUVOSO
31	<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia fergusonii</i>	96	NR_074902.1	EB - B	CHUVOSO
32	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	99	NR_117752.1	EB - B	CHUVOSO
13	<i>Lactobacillales</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	82	KP128055.1	ET - B	SECA
33	<i>Brevundimonas</i>	<i>Brevundimonas diminuta</i>	99	NR_113602.1	ET - B	CHUVOSO
34	<i>Acidovorax</i>	<i>Acidovorax temperans</i>	97	NR_028715.1	ET - B	CHUVOSO
42	<i>Citrobacter</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	98	NR_028894.1	ET - B	CHUVOSO
15	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus wiedmannii</i>	100	NR_152692.1	Lodo - B	SECA
45	<i>Klebsiella</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	96	NR_037084.1	Lodo - B	CHUVOSO

*em negrito estão destacados os membros da família Enterobacteriaceae; EB: esgoto bruto; ET: efluente tratado.

Alcaligenaceae (*Alcaligenes faecalis*) também foram identificados como sendo resistentes à ampicilina e/ou ao cloranfenicol. Já *Salmonella enterica* foi detectada dentre as cepas resistentes ao cloranfenicol (Tabela 4).

Além das bactérias potencialmente patogênicas mencionadas anteriormente, espécies ambientais (*Stenotrophomonas rhizophila*, *Chryseobacterium hispalense*, *Comamonas terrigena*) também foram detectadas como resistentes aos antibióticos testados.

Muitas das espécies detectadas no presente estudo e que apresentaram resistência à ampicilina e ao cloranfenicol já foram reportadas previamente em amostras de EB e/ou ET de estações de tratamento de águas residuárias (NNADOZIE; KUMARI; BUX, 2017). Além disso, bactérias multirresistentes, como *Klebsiella pneumoniae* (produtora da enzima carbapenemase), *Aeromonas* spp. (produtora de KPC2) e várias espécies da família Enterobacteriaceae, incluindo *Kluyvera* spp., foram identificadas em esgoto hospitalar no Brasil e em diferentes pontos da ETE que recebia esse efluente para tratamento (PICÃO *et al.*, 2013).

Vale a pena mencionar que algumas das espécies identificadas neste estudo, como *K. pneumoniae*, *E. coli* e *Enterococcus faecalis*, são patógenos resistentes detectados previamente em hospitais brasileiros. A resistência aos carbapenêmicos dentre os membros da família Enterobacteriaceae é um problema grave de saúde pública e isolados resistentes aos carbapenêmicos, identificados como *K. Pneumoniae*, foram reportados em ambientes clínicos em diferentes estados brasileiros (ROSSI, 2011).

CONCLUSÕES

Houve diferença na remoção de BHTs e de bactérias resistentes aos antibióticos ampicilina e cloranfenicol nas ETEs estudadas. A ETE-A (sistema de lodos ativados) foi mais eficiente na remoção de BRAs (cerca de 1 log de remoção), quando comparada à ETE-B (reator UASB seguido de FBP).

Não houve efeito da sazonalidade na ocorrência e remoção das BHTs e BRAs nas ETEs investigadas.

A maioria das BRAs isoladas era da família Enterobacteriaceae, sendo que algumas espécies (*Klebsiella pneumoniae*, *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium*, *Salmonella* spp.) são bactérias potencialmente patogênicas.

Apesar do tratamento de esgoto empregado, BRAs foram detectadas no efluente final tratado, indicando que as ETEs são fontes de disseminação de BRAs no ambiente.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio e financiamento fornecido pela CAPES, CNPq, FAPEMIG, Programa de Pós-Graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos (SMARH) da UFMG e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Estações Sustentáveis de Tratamento de Esgoto- INCT ETEs Sustentáveis.

Tabela 4 - Identificação das bactérias resistentes ao cloranfenicol*.

Colônia	Banco de dados GenBank	Blast			Origem das amostras	Período
		Identificação	%	N. acesso		
2	<i>Citrobacter</i>	<i>Citrobacter werkmanii</i>	98	NR_0248621	EB - A	SECO
4	<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia fergusonii</i>	97	NR_0749021	EB - A	SECO
5	<i>Enterococcus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	98	NR_1157651	EB - A	SECO
22	<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella enterica subsp. enterica</i>	99	NR_0747991	EB - A	SECO
23	<i>Klebsiella</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99	NR_1176831	EB - A	CHUVOSO
24	<i>Cloacibacterium</i>	<i>Cloacibacterium rupense</i>	94	KY3930251	EB - A	CHUVOSO
25	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus wiedmannii</i>	99	NR_1526921	EB - A	CHUVOSO
13	<i>Clostridium</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	98	NR_1216972	ET - A	SECO
19	Enterobacteriaceae	<i>Vibrio alginolyticus</i>	96	KU6630941	ET - A	SECO
21	Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter</i> sp.	86	LK0543971	ET - A	SECO
7	<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia coli</i>	98	KM8709111	Lodo - A	SECO
8	Enterobacteriaceae	<i>Citrobacter freundii</i>	98	NR_0288941	Lodo - A	SECO
10	<i>Citrobacter</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	98	NR_0288941	Lodo - A	SECO
16	<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia fergusonii</i>	98	NR_0749021	Lodo - A	SECO
27	<i>Acidovorax</i>	<i>Acidovorax temperans</i>	99	NR_0287151	Lodo - A	CHUVOSO
28	<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia fergusonii</i>	98	NR_0749021	Lodo - A	CHUVOSO
14	<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia fergusonii</i>	99	NR_0749021	EB - B	SECO
15	<i>Alcaligenes</i>	<i>Alcaligenes faecalis</i>	97	NR_1136061	EB - B	SECO
34	<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia fergusonii</i>	98	NR_0749021	EB - B	CHUVOSO
36	<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia fergusonii</i>	99	NR_0749021	ET - B	CHUVOSO
31	Enterobacteriaceae	<i>Klebsiella variicola</i>	96	KX0368631	Lodo - B	CHUVOSO

*em negrito estão destacados os membros da família Enterobacteriaceae; EB: esgoto bruto; ET: efluente tratado.

REFERÊNCIAS

- ABREU, E.T.; PRETTO, J.A.; OLIVEIRA CALEARE, Â.; TAVARES, C.R.G.; NAKAMURA, C.V. (2010) Avaliação da resistência a antibióticos de bactérias isoladas de efluente hospitalar. *Acta Scientiarum Technology*, v. 32, n. 1, p. 1-5. <https://doi.org/10.4025/actascitechnol.v32i1.7453>
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). (2017) *Plano Nacional para a prevenção e o controle de Resistência Microbiana nos Serviços de Saúde*. Brasília: ANVISA. 84 p.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.; LIPMAN, D. (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, v. 215, n. 3, p. 403-410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). (1998) *Standard Methods for the Examination Water and Wastewater*. 20^a ed. Washington, D.C.: American Public Health Association.
- AQUINO, S.F.D.; BRANDT, E.M.F.; CHERNICHARO, C.A.D.L. (2013) Remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto: revisão da literatura. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 18, n. 3, p. 187-204. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-41522013000300002>
- BAQUERO, F.; MARTÍNEZ, J. L.; CANTÓN, R. (2008) Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 19, n. 3, p. 260-265. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.05.006>
- BOUKI, C.; VENIERI, D.; DIAMADOPOULOS, E. (2013) Detection and fate of antibiotic resistant bacteria in wastewater treatment plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 91, p. 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.01.016>
- BROOKS, J.P.; MAXWELL, S.L.; RENSING, C.; GERBA, C.P.; PEPPER, I.L. (2007) Occurrence of antibiotic-resistant bacterial ad endotoxin associated with the land application of biosolids. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 53, n. 5, p. 616-622. <https://doi.org/10.1139/W07-021>
- CAIRNS, J.; RUOKOLAINEN, L.; HULTMAN, J.; TAMMINEN, M.; VIRTA, M.; HILTUNEN, T. (2018) Ecology determines how low antibiotic concentration impacts community composition and horizontal transfer of resistance genes. *Communications Biology*, v. 1, p. 35. <https://doi.org/10.1038/s42003-018-0041-7>
- FLORIPES, T.C.; AQUINO, S.F.; QUARESMA, A.D.V.; AFONSO, R.; CHERNICHARO, C.A.; SOUZA, C.L. (2018) Occurrence of drugs and endocrine disrupters in raw and treatment sewage in the city of Belo Horizonte/MG, Brazil. *Engenharia Sanitaria e Ambiental*, v. 23, n. 6, p. 1199-1211. <http://dx.doi.org/10.1590/s1413-41522018177703>
- GAO, P.; MUNIR, M.; XAGORARAKI, I. (2012) Correlation of tetracycline and sulfonamide antibiotics with corresponding resistance genes and resistant bacteria in a conventional municipal wastewater treatment plant. *Science of the Total Environment*, v. 421-422, p. 173-183. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.01.061>
- HUANG, J.J.; HU, H.Y.; LU, S.Q.; LI, Y.; TANG, F.; LU, Y.; WEI, B. (2012) Monitoring and evaluation of antibiotic-resistant bacteria at a municipal wastewater treatment plant in China. *Environment International*, v. 42, p. 31-36. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2011.03.001>
- LAHT, M.; KARKMAN, A.; VOOLAID, V.; RITZ, C.; TENSION, T.; VIRTA, M.; KISAND, V. (2014) Abundances of Tetracycline, Sulphonamide and Beta-Lactam Antibiotic Resistance Genes in Conventional Wastewater Treatment Plants (WWTPs) with Different Waste Load. *PLoS One*, v. 9, n. 8, p. e103705. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103705>
- LE, T.H.; NG, C.; TRAN, N.H.; CHEN, H.; GIN, K.Y.H. (2018) Removal of antibiotic residues, antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes in municipal wastewater by membrane bioreactor systems. *Water Research*, v. 145, p. 498-508. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.08.060>
- LOPES, T.R.; COSTA JR., I.L.; PERIOTTO, F.; PLETSCH, A.L. (2016) Antibiotic resistance in *E. coli* isolated in effluent from a wastewater treatment plant and sediments in receiver body. *International Journal of River Basin Management*, v. 14, n. 4, p. 441-445. <https://doi.org/10.1080/15715124.2016.1201094>
- MAC CONELL, E.F.A.; ALMEIDA, P.G.S.; ZERBINI, A.M.; BRANDT, E.M.F.; ARAÚJO, J.C.; CHERNICHARO, C.A.L. (2013) Diversity and dynamics of ammonia-oxidizing bacterial communities in a sponge-based trickling filter treating effluent from a UASB reactor. *Water Science and Technology*, v. 68, n. 3, p. 650-657. <https://doi.org/10.2166/wst.2013.288>
- MASSOL-DEYA, A.A.; ODELSON, D.A.; HICKEY, R.F.; TIEDJE, J.M. (1995) Bacterial community fingerprinting of amplified 16S and 16-23S ribosomal DNA gene sequences and restriction endonuclease analysis (ARDRA). In: AKKERMANS, A.D.L.; ELSAS, J.D.V.; BRUIJN, F.J. *Molecular microbial ecology manual*. Springer: Dordrecht. p. 289-296.
- MUNIR, M.; WONG, K.; XAGORARAKI, I. (2011) Release of antibiotic resistant bacteria and genes in the effluent and biosolids of five wastewater utilities in Michigan. *Water Research*, v. 45, n. 2, p. 681-693. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.08.033>
- NNADOZIE, C.; KUMARI, S.; BUX, F. (2017) Status of pathogens, antibiotic resistance genes and antibiotic residues in wastewater treatment systems. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, v. 16, n. 3, p. 491-515. <https://doi.org/10.1007/s11157-017-9438-x>
- NOVO, A.; ANDRÉ, S.; VIANA, P.; NUNES, O.C.; MANAIA, C.M. (2013) Antibiotic resistance, antimicrobial residues and bacterial community composition in urban wastewater. *Water Research*, v. 47, n. 5, p. 1875-1887. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.01.010>
- NOVO, A.; MANAIA, C.M. (2010) Factors influencing antibiotic resistance burden in municipal waste water treatment plants. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 87, n. 3, p. 1157-1166. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2583-6>

- OLIVEIRA, D.E. (2011) *Caracterização, pesquisa dos genes de virulência e β -lactamases em Aeromonas hydrophila provenientes de esgoto e lodo tratados*. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo.
- PATERSON, D.L. (2006) Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. *The American Journal of Medicine*, v. 119, n. 6 (supl. 1), p. S20-28. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2006.03.013>
- PICÃO, R.C.; CARDOSO, J.P.; CAMPANA, E.H.; NICOLETTI, A.G.; PETROLINI, F.V.; ASSIS, D.M.; JULIANO, L.; GALES, A.C. (2013) The route of antimicrobial resistance from the hospital effluent to the environment: focus on the occurrence of KPC-producing *Aeromonas* spp. and Enterobacteriaceae in sewage. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 76, n. 1, p. 80-85. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.02.001>
- PRADO, T. (2007) *Avaliação da eficiência de um sistema de tratamento de efluente hospitalar por processo anaeróbio na remoção de coliformes, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae resistentes a antibióticos e Vírus da Hepatite A*. Dissertação (Mestrado) – FIOCRUZ/ENSP, Rio de Janeiro.
- REINTHALER, F.F.; POSCH, J.; FEIERL, G.; WÜST, G.; HAAS, D.; RUCKENBAUER, G.; MASCHER, F.; MARTH, E. (2003) Antibiotic resistance of *E.coli* in sewage and sludge. *Water Research*, v. 37, n. 8, p. 1685-1690. [https://doi.org/10.1016/s0043-1354\(02\)00569-9](https://doi.org/10.1016/s0043-1354(02)00569-9)
- RIZZO, L.; MANAIA, C.; MERLIN, C.; SCHWARTZ, T.; DAGOT, C.; PLOY, M.C.; MICHAEL, I.; FATTA-KASSINOS, D. (2013) Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: a review. *Science of the Total Environment*, v. 447, p. 345-360. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.01.032>
- ROSSI, F. (2011) The Challenges of Antimicrobial Resistance in Brazil. *Clinical Infectious Diseases*, v. 52, n. 9, p. 1138-1143. <https://doi.org/10.1093/cid/cir120>
- SIMMONS, S.L.; SIEVERT, S.M.; FRANKEL, R.B.; BAZYLINSKI, D.A.; EDWARDS, K.J. (2004) Spatiotemporal distribution of marine magnetotactic bacteria in a seasonally stratified coastal salt pond. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 70, n. 10, p. 6230-6239. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.10.6230-6239.2004>
- TAKEUCHI, S.; HASHIZUME, N.; KINOSHITA, T.; KAIDOH, T.; TAMURA, Y. (1997) Detection of *Clostridium septicum* hemolysin gene by polymerase chain reaction. *Journal of Veterinary Medical Science*, v. 59, n. 9, p. 853-855. <https://doi.org/10.1292/jvms.59.853>
- TUROLLA, A.; CATTANEO, M.; MARAZZI, F.; MEZZANOTTE, V.; ANTONELLI, M. (2018) Antibiotic resistant bacteria in urban sewage: Role of full-scale wastewater treatment plants on environmental spreading. *Chemosphere*, v. 191, p. 761-769. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.10.099>
- YUAN, Q.B.; GUO, M.T.; YANG, J. (2014) Monitoring and assessing the impact of wastewater treatment on release of both antibiotic-resistant bacteria and their typical genes in a Chinese municipal wastewater treatment plant. *Environmental Science: Processes & Impacts*, v. 16, n. 8, p. 1930-1937. <https://doi.org/10.1039/c4em00208c>
- YUAN, Q.B.; GUO, M.T.; YANG, J. (2015) Fate of antibiotic resistant bacteria and genes during wastewater chlorination: implication for antibiotic resistance control. *PLoS One*, v. 10, n. 3, e0119403. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119403>
- ZHANG, S.; HAN, B.; GU, J.; WANG, C.; WANG, P.; MA, Y.; CAO, J.; HE, Z. (2015) Fate of antibiotic resistant cultivable heterotrophic bacteria and antibiotic resistance genes in wastewater treatment processes. *Chemosphere*, v. 135, p. 138-145. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.04.001>