

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE ENGENHARIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANEAMENTO, MEIO AMBIENTE E RECURSOS
HÍDRICOS

LETÍCIA DA SILVA SANTOS

OCORRÊNCIA E REMOÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS
EM SISTEMAS SIMPLIFICADOS DE TRATAMENTO DE ESGOTO, EM BELO
HORIZONTE

Belo Horizonte

2021

Letícia da Silva Santos

**OCORRÊNCIA E REMOÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS
EM SISTEMAS SIMPLIFICADOS DE TRATAMENTO DE ESGOTO, EM BELO
HORIZONTE**

Versão Final

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos.

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Calábria de Araújo

Coorientadora Marcela França Dias

Belo Horizonte

2021

S237o Santos, Letícia da Silva.
Ocorrência e remoção de genes de resistência a antibióticos em sistemas simplificados de tratamento de esgoto, em Belo Horizonte - MG [recurso eletrônico] / Letícia da Silva Santos. – 2021.
1 recurso online (85 f. : il., color.) : pdf.

Orientadora: Juliana Calábria de Araújo.
Coorientadora: Marcela França Dias.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Engenharia.

Apêndices: f. 79-85.
Bibliografia: f. 1-78
Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Engenharia sanitária - Teses. 2. Saneamento - Teses.
3. Esgoto – Tratamento – Teses. 4. Radiação Ultravioleta – Teses.
I. Araújo, Juliana Calábria de. II. Dias, Marcela França. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Engenharia. IV. Título.

CDU: 628(043)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
[ESCOLA DE ENGENHARIA]
COLEGIADO DO CURSO DE GRADUAÇÃO / PÓS-GRADUAÇÃO EM [SANEAMENTO, MEIO AMBIENTE E RECURSOS HÍDRICOS]

FOLHA DE APROVAÇÃO

["Ocorrência e Remoção De Genes De Resistência a Antibióticos Em Sistemas Simplificados De Tratamento De Esgoto, Em Belo Horizonte - Mg. "]

[LETICIA DA SILVA SANTOS]

Dissertação de Mestrado] defendida e aprovada, no dia [26 de abril de 2021], pela Banca Examinadora designada pelo [Colegiado do Programa de Pós-Graduação **EM SANEAMENTO, MEIO AMBIENTE E RECURSOS HÍDRICOS**] da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes professores:

[Profa. Dra. Silvana de Queiroz Silva] - Membro Externo]

[UFOP]

[Prof. Dr. Marcos Von Sperling] - Membro Interno]

[UFMG]

[Profa. Dra. Juliana Calábria de Araujo - Orientadora]

[UFMG]

APROVADA PELO COLEGIADO DO PPG SMARH

Sonaly Cristina Rezende Borges de Lima - Coordenadora

Belo Horizonte, 26 de abril de 2021.



Documento assinado eletronicamente por **Marcos Von Sperling, Professor do Magistério Superior**, em 26/04/2021, às 16:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Silvana de Queiroz Silva, Usuário Externo**, em 30/04/2021, às 08:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Juliana Calabrisa de Araujo, Professora do Magistério Superior**, em 30/04/2021, às 11:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sonaly Cristina Rezende Borges de Lima, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 14/03/2022, às 14:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_documento=0, informando o código verificador **0692298** e o código CRC **277E21CE**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus que me guiou e amparou durante toda a minha vida.

Aos meus pais Rosilene e José e a minha irmã, Laissa, que me incentivaram em todas as minhas decisões. Nunca conseguiria descrever com palavras todo amor que tenho por eles. Agradeço também a todos os familiares que me dão imensurável suporte Rosana, Rosival, Arthur, Maria de Fátima, Rogério, Tia Rosilda, Rosenilton e Tia Rai.

Às minhas queridas amigas Isabela e Sheilane que foram minha família durante os últimos dois anos e me acolheram nos momentos mais difíceis. Foram fundamentais para que eu conseguisse concluir este trabalho.

À minha orientadora, Juliana Calábria de Araújo, pela orientação, paciência e por ter me permitido fazer parte desse trabalho. Agradeço muito por toda a confiança que teve em mim.

À minha coorientadora, Marcela França Dias, pela paciência e carinho ao sanar minhas dúvidas. Por ter me ensinado a utilizar o Rstudio, e por todo aprendizado que me foi passado.

Ao professor Sérgio Aquino que nos ensinou a trabalhar com o fotorreator e foi imprescindível para o desenvolvimento deste trabalho. Obrigada pela disponibilidade e paciência.

Às colegas do laboratório de Microbiologia. Déborah Freitas, Cíntia Leal e Elayne Machado que foram verdadeiras mentoras e me ajudaram desde o primeiro momento que comecei a estudar o tema da dissertação. Mostraram a prática do laboratório, ensinaram a técnica qPCR e me deram todo o suporte que possibilitou o bom andamento das minhas análises.

Aos amigos acolhedores que encontrei nas terras mineiras Fernanda, Luísa, Baruc, Luan, Daniel, Débora, Priscila, Júlio, Natan, Ana Clara e Tatiane. Amigos que alegraram meus dias e aliviaram a saudade de casa.

Ao professor César que me deu oportunidade de trabalhar em seu projeto em 2019, e me possibilitou ficar em Belo Horizonte para continuar o mestrado. Agradeço pelo grande aprendizado que tive nesse período.

À amiga Brendinha que nem hesitou em me acolher em sua casa no momento que mais precisei de apoio.

Ao programa de pós graduação SMARH por todo suporte que possibilitou a realização desse sonho. E ao excelente corpo docente que integra esse programa, compartilhando seus conhecimentos durante as disciplinas. Em especial aos professores Carlos, Marcos, Sonaly, Uende, Sílvia e Eduardo Coutinho.

À FUNASA por financiar a compra dos materiais necessários à execução das análises de laboratório.

Ao CNPq pela bolsa de estudos que me possibilitou estar em Belo Horizonte para desenvolver as atividades necessárias a pesquisa.

À COPASA por possibilitar as pesquisas no centro de pesquisa e treinamento em saneamento.

Aos trabalhadores brasileiros que financiam todas as pesquisas que possuem bolsa de estudos.

À secretaria do PPG-SMARH pelo auxílio a todos os alunos e professores que fazem parte do programa.

À UFMG, pelas instalações físicas e por unir todo o essencial para as atividades de pesquisa e ensino. Por prezar, diante desse período de incerteza da Pandemia, pela saúde da comunidade que faz parte dessa instituição.

RESUMO

A resistência antimicrobiana tem sido indicada pela Organização Mundial de Saúde como um problema global que ameaça os ganhos conquistados com o uso dos antibióticos desenvolvidos até a atualidade. O intenso contato entre as bactérias, a presença de antibióticos e a possibilidade da transferência horizontal de genes são as condições encontradas nas ETEs de tratamento biológico que podem propiciar o aumento da resistência antimicrobiana. Assim, as ETEs podem ser consideradas pontos importantes de disseminação de bactérias resistentes e de Genes de resistência a antibióticos (GRAs), e têm sido objeto de estudos para entender como esses elementos se espalham pelo ambiente, a fim de propor maneiras de mitigar sua disseminação. A remoção de GRAs em estações de tratamento de esgoto tem sido abordada em vários trabalhos, porém, pouco se sabe ainda sobre a dinâmica desses elementos em ETEs, e, portanto, há a necessidade de mais estudos. Dessa forma, o presente trabalho busca contribuir para o entendimento do papel das estações de tratamento de esgoto na disseminação dos GRAs, quantificando os genes *blaTEM* (confere resistência aos beta-lactâmicos), *sulI* (confere resistência aos sulfonamidas), *tetA* (confere resistência a tetraciclina), *intI1* (integron classe 1) e *RNAr 16S* (marcador genético das bactérias) em três sistemas simplificados de tratamento de esgoto. Os sistemas monitorados consistem em: (a) reator UASB seguido de filtro biológico percolador (FBP), (b) reator UASB seguido por duas lagoas de alta taxa em paralelo e (c) duas wetlands construídas de fluxo vertical. Também foi avaliado um tratamento terciário no sistema (a) com fotorreator de lâmpadas emersas UV, bem como a influência da dose de radiação aplicada na remoção de GRAs. Os resultados mostraram concentrações dos GRAs variando de $1E+06$ a $1E+08$ cópias/ml no esgoto bruto e de $3E+04$ a $3E+07$ cópias/ml no efluente tratado, considerando os três sistemas de tratamento. Em geral, as remoções de cada componente dos sistemas resultaram no máximo em cerca de 1 log, no entanto, o gene *blaTEM* foi o mais suscetível a remoção (3,5 logs no sistema UASB/LAT), e o *sulI* foi o mais persistente. Com relação ao fotorreator, não foi identificada uma tendência de aumento na remoção dos genes com o aumento da dose de UV aplicada. As análises das componentes principais e de *Spearman* mostraram que DQO e pH apresentaram maior influência sobre as concentrações dos GRAs quando comparado com os SST e SSV. De modo geral, observou-se que não houve aumento na concentração desses elementos após a passagem pelos sistemas de tratamento.

Palavras-chave: Tratamento de esgoto, reator UASB, wetlands, FBP, LAT, fotorreator UV.

ABSTRACT

Antimicrobial resistance has been indicated by the World Health Organization as a global problem that threatens the gains achieved with the use of antibiotics developed to date. The intense contact between bacteria, antibiotics and the possibility of horizontal gene transfer are conditions found in WWTPs that can provide increase in antimicrobial resistance. Thus, WWTPs are considered important points of bacteria's resistance dissemination and ARGs and have been the subject of studies to understand how these elements spread through the environment, in order to propose ways to mitigate their spread. The removal of ARGs in sewage treatment plants has been addressed in several studies, however, knowledge about the dynamics of these elements in WWTPs is still limited, and further studies are necessary. Thus, the present study seeks to contribute to the understanding of sewage treatment plants' roles in the dissemination of ARGs, quantifying the genes *blaTEM* (gives resistance to beta-lactams), *sulI* (gives resistance to sulfonamides), *tetA* (gives resistance tetracycline), *intI1* (integron class 1) and *RNAr 16S* (genetic marker of bacteria) in three simplified sewage treatment systems. The monitored systems consist of: (a) UASB reactor followed by a percolating biological filter (FBP), (b) UASB reactor followed by two high-rate algal ponds in parallel and (c) two vertical flow constructed wetlands. It was also evaluated a tertiary treatment in the system (a) with a photoreactor with emerged UV lamps, as well as the influence of the radiation dose in the removal of ARGs. The results showed concentrations of ARGs ranging from $1E + 06$ to $1E + 08$ in the raw sewage and from $3E + 04$ to $3E + 07$ in the treated effluent, considering the three treatment systems. Overall, removals of each component from the systems resulted in maximum about 1 log, however, the *blaTEM* gene was the most susceptible to removal (3.5 logs in UASB/LAT system), and *sulI* was the most persistent. Regarding the photoreactor, no trend towards an increase in the ARGs removal was identified with an increase in the applied UV dose. The principal components analysis and *Spearman* showed that the COD and pH had greater influence on the concentrations of ARGs than TSS and VSS. In general, it was observed there was no increase in the concentration of ARGs after wastewater passing through the treatment systems.

Keywords: Sewage treatment, UASB reactor, wetlands, FBP, LAT, UV photoreactor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 - Esquema da disseminação de concentrações residuais de antibióticos no ambiente.	22
Figura 4.1 - Representação esquemática dos sistemas de tratamento de esgoto avaliados e pontos de coleta (*)	39
Figura 4.2 - Filtro biológico percolador do sistema A.....	40
Figura 4.3 - Representação esquemática das calhas do fotoreator	41
Figura 4.4 - Representação esquemática das wetlands construídas.	42
Figura 4.5 - Emissão da fluorescência nos ciclos de amplificação.....	46
Figura 4.6 - Exemplo de curva padrão obtida através da qPCR.	47
Figura 4.7 - Exemplo de curva de <i>melting</i> gerada após reação de amplificação.....	48
Figura 5.1 - Concentrações (a) absolutas e (b) relativas dos genes afluentes aos sistemas B (UASB/LAT) e C (Wetlands Construídas)	51
Figura 5.2 - Concentrações (a) absolutas e (b) relativas dos genes afluentes aos sistemas A (UASB/FPB)	53
Figura 5.3 - Concentração dos genes (a) absolutas e (b) relativas afluentes e efluentes ao sistema UASB/FPB.	55
Figura 5.4 - Remoção em log dos genes nos componentes do sistema UASB/FPB.	56
Figura 5.5 - Análise dos componentes principais no (a) esgoto bruto (b) efluente do reator UASB e (c) efluente do FBP do sistema A.	59
Figura 5.6 - Concentrações (a) absolutas e (b) relativas dos genes no sistema UASB/LAT.....	61
Figura 5.7 – Remoção de GRAs no Sistema UASB-LAT.	61
Figura 5.8 - Análise dos componentes principais (a) Efluente ao reator UASB e (b) Efluente às LAT.....	65
Figura 5.9 - Concentrações absolutas (a) e relativas (b) dos genes afluentes e efluentes às wetlands.....	66
Figura 5.10 - Remoção em log dos genes quantificados pelo sistema wetland.	67

Figura 5.11 - Análise dos componentes principais nos pontos (a) Afluente e (b) Efluente às wetlands. Os parâmetros utilizados foram sólidos suspensos totais (SST), temperatura (T), Demanda química de oxigênio (DQO), oxigênio dissolvido (OD) e pH71

Figura 5.12 - Concentrações absolutas afluentes e efluentes ao fotorreator em três faixas de dose UV: A (3- 15 mJ/cm²), B (20-80 mJ/cm²) e C (100-160 mJ/cm²).....74

Figura 5.13 - Comparação das remoções dos genes nos três sistemas avaliados...77

Figura 5.14 - Comparação da remoção dos genes nos três sistemas, considerando os cinco genes quantificados.....79

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Mecanismos de resistência aos principais grupos de antimicrobianos..	20
Tabela 3.2 - Principais classes de antibióticos e usos clínicos.	21
Tabela 3.3 – Remoções de genes encontradas na literatura	26
Tabela 3.4 - Características de alguns dos genes de resistência avaliados em sistemas de tratamento de esgoto.....	27
Tabela 3.5 – Radiações aplicadas na desinfecção de esgoto em mj/área.....	34
Tabela 3.6 - Influência dos parâmetros físico-químicos na dinâmica dos GRAs.	37
Tabela 4.1 – Parâmetros do filtro biológico percolador do sistema A.....	40
Tabela 4.2 - Parâmetros físico-químicos obtidos nos sistemas de tratamento de esgoto.....	43
Tabela 4.3 - Cronograma de coleta e pontos de amostragem	43
Tabela 4.4 - Principais informações acerca dos primers a serem empregados na qPCR.	49
Tabela 5.1 - Concentrações absolutas de genes no esgoto bruto e tratado quantificadas via qPCR e reportadas na literatura e no presente estudo, para diferentes sistemas de tratamento.....	52
Tabela 5.2 – Concentrações afluentes e efluentes dos genes investigados reportadas na literatura, em sistemas de wetlands.....	67
Tabela 5.3 - Comparação entre os resultados obtidos por Freitas, 2020 e o presente trabalho.....	73
Tabela 5.4 - Remoção em log de genes por fotorreator com lâmpadas emersas UV encontrados na literatura e no presente trabalho.....	76
Tabela 5.5 - Remoção de genes no sistema UASB/FBP/UV.	79
Tabela A1 - Informações das curvas padrão utilizadas para cada elemento genético.....	93
Tabela A2 - Resultados das quantificações dos genes.	93

Tabela B1 - Estatística descritiva das quantificações absolutas dos genes, considerando todas as amostras quantificadas.....	96
Tabela B2 - Estatística descritiva das quantificações relativas ao <i>RNAr 16S</i> , considerando todas as amostras quantificadas.....	97
Tabela B3 - Resultado das quantificações afluentes e efluentes ao fotorreator nas três faixas de dose de radiação adotadas.....	98
Tabela B4 - Remoções em log de cada componente dos sistemas A (UASB/FBP), B(UASB/LAT) e C(Wetlands construídas).....	98
Tabela C1 - Valores de <i>p</i> resultantes dos testes de wilcoxon para comparação entre o esgoto afluente e efluente a cada componente dos sistemas A, B e C.....	99
Tabela C2 - Valores de <i>p</i> resultantes dos testes de hipótese de kruskal wallis e Dunn para comparação entre os três sistemas.....	99

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<i>blaTEM</i>	Gene de resistência a β-lactâmicos
BRAs	Bactérias resistentes a antibióticos
Ct	Ciclo de <i>Threshold</i>
d	Dia
DBO	Demanda bioquímica de oxigênio
DDD	Dose diária definida
DESA	Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
DQO	Demanda química de oxigênio
EGM	Elemento genético móvel
<i>ermB</i>	Gene de resistência a macrolídeos
ETE	Estação de tratamento de esgotos
FBP	Filtro biológico percolador
GRA	Gene de resistência a antibióticos
hab	Habitante
<i>intI1</i>	Gene da <i>integrase</i> de classe 1
LAC	Lodos ativados convencional
LARBN	Lodos ativados com remoção biológica de nitrogênio
Log	Logaritmo
ng	Nanograma
nM	Nanomolar
NMP	Número mais provável
OMS	Organização Mundial de Saúde
OD	Oxigênio dissolvido
pb	Par de base
PCA	<i>Principal component analysis</i> (Análise de componentes principais)
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
RA	Resistência antimicrobiana
RNAr 16S	Ácido ribonucleico ribossomal 16S
SST	Sólidos em suspensão totais
SSV	Sólidos suspensos voláteis
<i>sul1</i>	Gene de resistência a sulfonamidas
TDH	Tempo de detenção hidráulica
<i>tetA</i>	Gene de resistência a tetraciclinas
THG	Transferência horizontal de genes
UASB	<i>Upflow anaerobic sludge blanket</i> (reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo)
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UV	Radiação ultravioleta
LAT	Lagoas de alta taxa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	17
2.1	OBJETIVO GERAL	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3	REVISÃO DA LITERATURA	18
3.1	RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA.....	18
3.1.1	Elementos genéticos móveis.....	19
3.1.2	Mecanismos de resistência aos antibióticos.....	19
3.2	ANTIBIÓTICOS.....	20
3.3	RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA E SAÚDE PÚBLICA.....	23
3.4	ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DE ESGOTO E RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA.....	25
3.4.1	Wetlands construídas e GRAs	27
3.4.2	Tratamento anaeróbio de esgoto e GRAs	30
3.4.3	Desinfecção com radiação ultravioleta (UV).....	32
3.4.4	Remoção de GRAs em outros sistemas de tratamentos de esgoto.....	35
3.4.5	Fatores influenciadores da dinâmica dos GRAs em estações de tratamento de esgoto.....	36
3.5	MÉTODOS PARA ANÁLISE DE GRAs.....	38
4	MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1	DESCRIÇÃO DOS SISTEMAS DE TRATAMENTO DE ESGOTO.....	39
4.2	COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	43
4.3	QUANTIFICAÇÃO DOS GENES.....	45
4.3.1	Extração de DNA.....	45
4.3.2	Obtenção de plasmídeos para curva padrão.....	45
4.3.3	qPCR em tempo real.....	46
4.4	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	49
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1	OCORRÊNCIA DOS GENES NO AFLUENTE.....	50
5.2	SISTEMA A (UASB/FBP).....	54
5.2.1	Remoção dos genes.....	54
5.2.2	Influência dos Parâmetros físico-químicos na remoção de GRAs no sistema UASB/FBP.....	57
5.3	SISTEMA B (UASB-LAT).....	60
5.3.1	Remoção dos genes	60
5.3.2	Influência dos parâmetros físico-químicos na remoção de GRAs no sistema UASB/LAT.....	64
5.4	SISTEMA C (WETLANDS CONSTRUÍDAS).....	66
5.4.1	Remoção dos genes.....	66
5.4.2	Influência dos parâmetros físico-químicos na dinâmica dos GRAs nas wetlands.....	70
5.4.3	Análise comparativa entre sistemas em escala plena e em escala piloto.....	72
5.5	REMOÇÃO DE GRAs NO FOTORREATOR	74
5.6	ANÁLISE COMPARATIVA DA REMOÇÃO DOS GENES AVALIADOS NOS SISTEMAS A, B E C.....	77
6	CONCLUSÕES FINAIS	81
7	RECOMENDAÇÕES	82
	REFERÊNCIAS	83
	APÊNDICE A – RESULTADOS DOS ENSAIOS DE QPCR	93
	APÊNDICE B – ESTATÍSTICA DESCRITIVA DAS QUANTIFICAÇÕES DOS GENES RELATIVAS A TODO PERÍODO DE AMOSTRAGEM	96
	APÊNDICE C – RESULTADOS DOS TESTES DE HIPÓTESES	99

1 INTRODUÇÃO

O amplo uso de antibióticos em humanos e animais tem contribuído significativamente para o aumento da resistência antimicrobiana (RA) no mundo (BURGMANN *et al.*, 2017). Como consequência, há riscos diretos à saúde humana, pois a RA é frequentemente associada à ineficiência de tratamentos clínicos com antibióticos, redução da qualidade de vida, aumento da taxa de recorrência de infecções bacterianas e até mesmo aumento no risco de óbito (CASTRO *et al.*, 1999; SALTOGLUA *et al.*, 2018). Diante disso, a RA tem sido apontada pela Organização Mundial de Saúde como um problema global que ameaça os ganhos conquistados com o uso dos antibióticos (OMS, 2015) e por isso adotou um Plano de Ação Global de combate a ela. Dentre os objetivos principais desse plano, destaca-se a necessidade de ampliar o conhecimento atual por meio de vigilância e pesquisa. No Brasil, já foi estabelecido o plano de ação nacional de prevenção e controle da RA no âmbito da saúde única (PAN- BR). Esse documento possui 14 objetivos, e dentre eles, destaca-se a necessidade de aprimorar e ampliar o conhecimento sobre a RA por meio da realização de estudos científicos (BRASIL, 2018). Há, portanto, a necessidade de entender como a RA se espalha no meio ambiente com o objetivo de desenvolver novas ferramentas tecnológicas e políticas para combatê-la.

As estações de tratamento de esgoto (ETEs) com tratamento biológico têm contribuído consideravelmente na mitigação do lançamento de matéria orgânica, nutrientes e de patógenos em corpos hídricos (VON SPERLING, 2011). Elas exercem função relevante para o meio ambiente, evitando a degradação dos corpos d'água, à medida em que tratam os esgotos que seriam lançados diretamente no ambiente. No entanto, as ETEs têm sido apontadas como importantes pontos de disseminação de genes resistentes a antibióticos devido às condições propícias para a ocorrência da transferência horizontal de genes entre os microrganismos, além da presença de antibióticos que podem causar pressão seletiva no meio (RIZZO *et al.*, 2013; MUNIR *et al.*, 2011). No esgoto existem grandes quantidades de bactérias patogênicas em contato, favorecendo a troca genética e podendo acarretar no aumento da RA. Nos últimos anos, vários trabalhos têm quantificado genes de resistência a antibióticos (GRAs) em estações de tratamento de esgoto, porém, pouco se sabe ainda sobre os mecanismos de remoção dos GRAs em ETEs, e, portanto, há a necessidade de mais estudos para entender a dinâmica desses elementos (TAO *et al.*, 2014; MANAIA *et al.*, 2016; YUAN *et al.*, 2016).

Dentre os antibióticos mais estudados têm-se as classes dos beta-lactâmicos, as tetraciclina e as sulfonamidas, algumas das mais consumidas no Brasil (CASTRO *et al.*, 2020), e dessa forma, podem contribuir com a resistência antimicrobiana de forma mais significativa.

Ademais, pontua-se que a legislação brasileira não exige desinfecção dos esgotos, o que pode implicar em maiores quantidades de bactérias patogênicas (incluindo as resistentes) sendo lançadas nos corpos aquáticos. A partir dessa perspectiva, é necessário que seja estudado o impacto da desinfecção na resistência antimicrobiana com vistas a embasar normas para o controle do lançamento desses organismos.

Dessa maneira, o presente trabalho propõe estudar o papel dos processos biológicos de tratamento de esgoto doméstico e da desinfecção por radiação UV sobre os GRAs, de forma a avaliar a sua contribuição na remoção desses elementos.

2 OBJETIVOS

2.1 *Objetivo geral*

Investigar a ocorrência e remoção de genes de resistência a antibióticos (GRAs) em três diferentes sistemas simplificados de tratamento de esgoto e em tratamento terciário com fotorreator, em Belo Horizonte-MG, bem como, avaliar a relação dos parâmetros físico-químicos com a concentração dos genes no esgoto.

2.2 *Objetivos específicos*

- Quantificar e avaliar a remoção dos genes *RNAr 16S*, *tetA*, *blaTEM*, *sul1* e *int11* em três sistemas simplificados de tratamento de esgoto: UASB seguido por filtro biológico percolador, UASB seguido por lagoas de alta taxa e wetlands construídas de fluxo vertical;
- Avaliar a remoção dos GRAs e dos genes *RNAr 16S* e *int11* através de tratamento terciário com fotorreator de lâmpadas emersas UV, assim como a influência da dose de radiação aplicada ao efluente;
- Avaliar a relação do pH, OD, SSV, SST, DQO e temperatura com a concentração dos genes no esgoto bruto e tratado.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Resistência antimicrobiana

As bactérias podem adquirir a capacidade de resistir à ação dos antibióticos através de mutações ou incorporações de genes de resistência ao seu material genético. Isso ocorre, principalmente, devido à transferência horizontal de genes (THG), ou seja, a troca de material genético por organismos sem relação parental (SOUCY *et al.*, 2015). Existem três mecanismos principais de ocorrência da THG: conjugação, transformação e transdução. Tal transferência é viabilizada muitas vezes por elementos genéticos móveis tais como plasmídeos, bacteriófagos, transposons e integrons.

A transformação consiste basicamente da captura do segmento de DNA (plasmidial ou cromossômico) do meio externo para a estrutura interna do microrganismo (THOMAS e NIELSEN, 2005). Muitas bactérias possuem a competência de realizar a transformação sob condições ambientais desfavoráveis, tais como falta de nutrientes e presença de antibióticos. Para que a transformação natural ocorra é necessária a liberação do DNA para o meio externo e que o mesmo possa resistir ao meio extracelular, além da presença de bactérias capazes de englobar esse gene e estabilizá-lo no genoma bacteriano (THOMAS e NIELSON, 2005). A transformação, ao contrário dos demais mecanismos, independe de elementos genéticos externos ao cromossomo (SORENSEN *et al.*, 2015).

Na conjugação o gene é transferido de uma célula à outra através de uma estrutura denominada *pilus*, sendo necessário haver contato para que ocorra a troca de material genético. É considerado o mecanismo mais importante para a THG devido a proteção do gene contra o ambiente externo e maior eficiência para a entrada na célula hospedeira, além disso, elementos genéticos móveis tais como transposons e integrons podem ser transferidos durante o processo (VON WINTERSDORF *et al.*, 2016).

Na transdução ocorre a transferência de material genético entre células bacterianas através de bacteriófagos, ou seja, vírus com capacidade de infectar as bactérias. Assim, durante o processo de infecção o bacteriófago pode contribuir para a THG disseminando genes de resistência (SALMOND e FINERAN, 2015).

3.1.1 Elementos genéticos móveis

Os elementos que auxiliam a THG incluem principalmente plasmídeos, integrons, bacteriófagos e transposons (MANAIA *et al.*, 2018). Os plasmídeos são segmentos de DNA circulares que carregam genes que expressam funções não essenciais, vantajosas para a bactéria, visando sua sobrevivência. Eles são classificados de acordo com o mecanismo adotado no processo de particionamento que ocorre nas divisões celulares (FROST *et al.*, 2005).

Os integrons são elementos que, embora incapazes de se movimentar por si só, capturam cassetes de genes (combinação de vários genes), e por isso podem fornecer resistência a vários tipos antimicrobianos. Sua estrutura é baseada em três elementos: O gene *intI*, um sítio de recombinação *attI* e um promotor responsável pela transcrição dos genes associados ao cassete (RIZZO *et al.*, 2013). O gene *intI* é responsável pela codificação de uma recombinase específica do sítio *attI*. Ademais, a classificação dos integrons é baseada na sua homologia, sendo a classe 1 é a mais estudada, e considerada marcadora de poluição antropogênica (GILLINGS, 2015). Também é a classe mais disseminada em amostras isoladas de *E. coli* provenientes de fontes clínicas de pacientes hospitalizados, fezes de humanos saudáveis e animais (GOLDSTEIN *et al.*, 2001; KANG *et al.*, 2005).

Os elementos transponíveis facilitam a transferência de genes por sua capacidade de auto replicação dentro do genoma (RIZZO *et al.*, 2013). São classificados de acordo com o mecanismo de ação que utilizam para a realização da transposição, e por vezes podem deixar uma cópia do DNA replicado na célula doadora (BESSEREAU, 2006). Esses elementos podem se ligar nas extremidades dos integrons e auxilia-los na inserção aos plasmídeos conjugativos (HAGBØ, 2017).

Como mencionado anteriormente, bacteriófagos são vírus que possuem a capacidade de infectar bactérias e utilizam os componentes da célula hospedeira para se replicar. Possuem basicamente dois ciclos de replicação: lisogênico e lítico. Em ambos os casos, o vírus pode transmitir o material genético de uma célula bacteriana para outra, podendo contribuir na disseminação de genes de resistência a antibióticos.

3.1.2 Mecanismos de resistência aos antibióticos

Os mecanismos que conferem resistência antimicrobiana são basicamente quatro: (i) alteração da permeabilidade da membrana; (ii) alteração do sítio de ação do antimicrobiano, impedindo

sua ligação ao sítio; (iii) bomba de efluxo, onde o antibiótico é retirado da célula bacteriana por proteínas presentes na membrana plasmática e (iv) inativação de antibiótico por enzimas que os modificam ou destroem, como as beta-lactamases, que hidrolisam vários antibióticos classificados como beta-lactâmicos (KAPOOR *et al.*, 2017). A Tabela 3.1 apresenta as principais classes de antibióticos relacionadas ao tipo e aos mecanismos de resistência que geralmente atuam sobre eles.

Tabela 3.1 - Mecanismos de resistência aos principais grupos de antimicrobianos

Classe do antibiótico	Tipo de resistência	Mecanismo de resistência
Beta-lactâmicos	Inativação de antibiótico; Modificação da enzima PBP*	Hidrólise pelas beta-lactamases
Tetraciclina	Bomba de efluxo; Alteração do sítio de ação; Inativação	Proteína de exportação Proteína que se liga aos ribossomos impedindo que a tetraciclina se ligue ao ribossomo
Cloranfenicol	Inativação; Alteração da permeabilidade	Inativação pela enzima cloranfenicol acetiltransferase
Aminoglicosídeo	Inativação Bomba de efluxo	Inativação por enzimas aminoglicosídeos acetiltransferases (AAC), aminoglicosídeos adeniltransferases (ANT), e aminoglicosídeos fosfotransferases (APH)
Quinolona	Alteração de sítio de ação; Bomba de efluxo Alteração da permeabilidade	Mutações no gene <i>gyr A</i> , induzindo mudanças no sítio de ligação importante para a interação DNA girase e quinolona.
Macrolídeos	Alteração de sítio de ação; Bomba de efluxo; Inativação	Metilação do sítio ativo Hidrólise ou modificação do antibiótico
Glicopeptídeos	Alteração de sítio ativo	Modificação do tipo de enzima ligase, por outra de menor afinidade com glicopeptídeos.
Sulfonamidas	Bomba de efluxo Alteração de sítio ativo	Mutação dos genes que codificam DHPS**

*PBP, proteínas de ligação à penicilina; **DHPS, enzima sintetase de desoxihipusina.

Fonte: Byarugaba, 2009; Kapoor *et al.*, 2017.

3.2 Antibióticos

Antibióticos são substâncias com propriedades bactericida, antifúngica ou antiparasitária que têm sido mundialmente utilizados para tratamentos clínicos e veterinários, dentre outros usos (KÜMMERER, 2009). Por não serem totalmente absorvidos pelo organismo humano, acabam por chegar em ambientes como o solo e corpos hídricos, causando pressão seletiva sobre

bactérias resistentes e favorecendo a disseminação de genes de resistência (MANAIA *et al.*, 2018).

Os antibióticos podem ser naturais, sintéticos ou semissintéticos (quando há modificação de composto natural), e também são classificados de acordo com o mecanismo de ação ou estrutura química (KÜMMERER, 2009). Esses compostos possuem como mecanismos de ação a supressão da síntese da parede celular, inibição da síntese de ácido nucléico, quebra da estrutura ou função da membrana celular, supressão da síntese de proteínas e bloqueio das principais vias metabólicas (ETEBU e ARIKEKPAR, 2016). Abaixo são apresentados alguns dos principais grupos de antibióticos e seus respectivos usos clínicos (Tabela 3.2).

Tabela 3.2 - Principais classes de antibióticos e usos clínicos.

Classe	Grupo	Exemplo	Uso clínico
Beta-lactâmicos	Penicilina	benzilpenicilinas; aminopenicilinas; penicilinas de amplo espectro	Pneumonias, Otites, sinusites Faringites, epiglotites, Infecções cutâneas, Meningites bacterianas.
	Cefalosporinas	Cefalosporinas de primeira geração	Infecções de pele, partes moles, faringite estreptocócica, algumas infecções do trato urinário.
	Carbapenens	Imipenem, meropenem e ertapenem	Infecção abdominal; infecções do sistema nervoso central; pneumonia;
Tetraciclina	-	Doxiciclina	Infecções causadas por <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>H. ducreyi</i> , <i>Treponema pallidum</i> , traqueobronquites e sinusites.
Macrolídeos	-	Eritromicina, Claritromicina, Azitromicina	Pneumonia, pneumonia por <i>S. pneumoniae</i> , infecções superficiais de pele, profilaxia de febre reumática.
Sulfonamidas	-	Sulfadiazina, Cotrimoxazol	toxoplasmose, malária por <i>P. falciparum</i> , infecções do trato urinário, uretrites e prostatites agudas ou crônicas
Quinolonas	-	ciprofloxacina	Trato genito-urinário, Trato gastrointestinal, Trato respiratório, Osteomielites, Partes moles, Ação contra micobactérias.

FONTE: ANVISA, 2007.

Segundo a agência Nacional de Saúde (ANVISA), para efetivação da ação antimicrobiana, o antibiótico deve (i) atingir concentração ideal no local da infecção; (ii) ser capaz de atravessar, de forma passiva ou ativa, a parede celular, (iii) apresentar afinidade pelo sítio de ligação no interior da bactéria e (iv) permanecer tempo suficiente para exercer seu efeito inibitório. No entanto, seu uso em doses abaixo das concentrações de efetivação da ação pode contribuir para a resistência das bactérias.

A OMS (2018) apontou que o Brasil é o maior consumidor de antibióticos da América e um dos maiores do mundo, com cerca de 22.75 DDD/1000 habitantes/dia. Salienta-se que DDD é a dose definida diária, criada para uniformizar os dados em estudos desse tipo.

Um dos problemas do grande consumo de antibióticos atualmente é o seu espalhamento pelo ambiente (Figura 3.1) que pode favorecer a THG ao provocar pressão seletiva (KÜMMERER, 2003), por isso, alguns estudos têm tentado correlacionar a concentração desses compostos com os GRAs em estações de tratamento de esgoto (HUANG *et al.*, 2017).

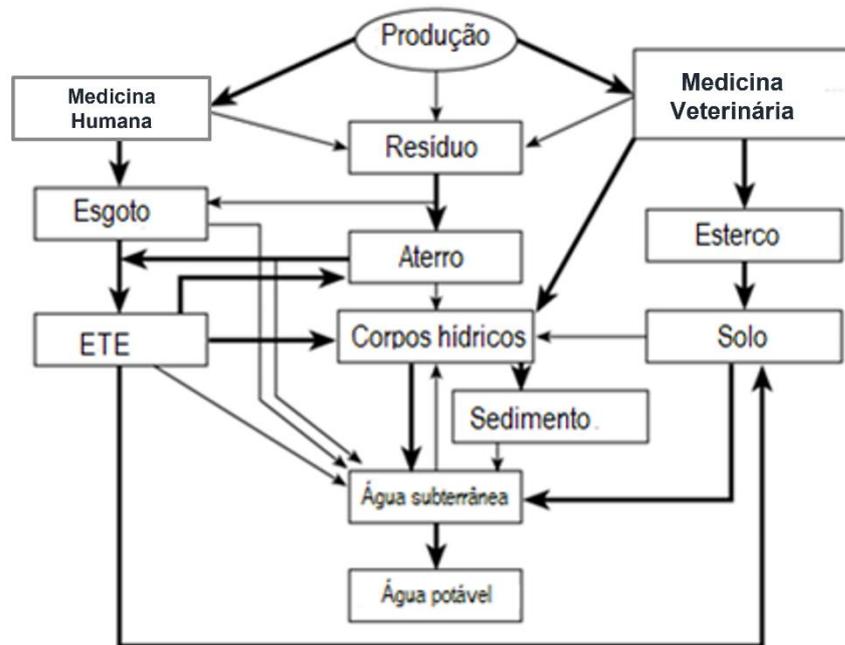


Figura 3.1 - Esquema da disseminação de concentrações residuais de antibióticos no ambiente.

Fonte: Kümmerer, 2003.

A eliminação desses compostos pode se dar por via biótica (microrganismos) ou abiótica (sorção, hidrólise, fotólise, oxidação e redução), e propriedades físico-químicas, tais como coeficiente de partição, coeficiente de distribuição, constantes de dissociação e constante da lei de Henry podem ser determinantes na persistência dos antibióticos no ambiente (KÜMMERER, 2009). Sulfonamidas, por exemplo, adsorvem fracamente a sedimento ou lodo e são suscetíveis a radiação UV ou luz natural, enquanto as tetraciclinas são eliminadas da fração líquida muitas vezes através da adsorção (LAI *et al.*, 2011; DENG e ZHANG, 2019).

A degradação dos antibióticos pela via biótica inclui, segundo Reis *et al.* (2020), biodegradação, biotransformação e mineralização. Em sua revisão estes autores mostraram que os microrganismos atuam de forma importante na degradação de alguns desses compostos. Alguns organismos já demonstraram a capacidade de utilizar a sulfonamida como fonte de carbono em sistemas de lodos ativados e lodo de digestão anaeróbia (MÜLLER *et al.*, 2013; WHANG *et al.*, 2016), no entanto, outros estudos reportam dificuldades na degradação de sulfonamidas pela via biótica (BARAN *et al.*, 2011). A tetraciclina também se mostrou menos propensa à biodegradação (HUANG *et al.*, 2015). Tais dados apontam para o fato de que alguns antibióticos podem não ser degradados em estações de tratamento que utilizam basicamente processos biológicos.

3.3 Resistência antimicrobiana e saúde pública.

A resistência antimicrobiana é apontada como causa de ineficiência em tratamentos clínicos utilizando antibióticos, redução da qualidade de vida e aumento da taxa de recorrência de infecções bacterianas (CASTRO *et al.*, 1999; SALTOGLUA *et al.*, 2018). A dosagem e o tempo de uso deste medicamento estão entre os principais fatores que contribuem para o uso inadequado, favorecendo o aumento da resistência (LAUTENBACH *et al.*, 2016). Um estudo realizado em um hospital universitário brasileiro avaliando o uso de vancomicina apontou que em apenas 39% dos casos o uso foi apropriado (CASTRO *et al.*, 1999).

Infecções que inicialmente são tratadas com antibióticos tradicionais, podem não ser combatidas com esses medicamentos, se fazendo necessária a utilização de antibióticos mais agressivos ao corpo humano. Um exemplo é a colistina, utilizada para combater infecções nosocomiais causadas por *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* resistentes à aminoglicosídeos, cefalosporinas, quinolonas, penicilinas, monobactamas e imipenem (LEVIN *et al.*, 1999). Esse fármaco pode provocar como efeitos colaterais, bloqueio neuromuscular, nefrotoxicidade e neurotoxicidade. Outros autores relataram que o antibiótico linezolidina utilizado para infecções com agentes resistentes, pode provocar reações adversas como trombocitopenia e anemia (BISHOP *et al.*, 2006).

Os impactos da RA para a saúde humana são diversos. Um estudo indicou risco de 3,15 vezes maior de doença invasiva ou morte no período de 90 dias pós infecção por *Salmonella Typhimurium* resistente à quinolona em comparação com cepas suscetíveis (HELMS *et al.*,

2004). Pacientes com cepas de *Campylobacter* resistentes à quinolona também obtiveram maior risco (cerca de 6 vezes) de evento adverso em comparação com pacientes infectados com cepas suscetíveis (HELMS *et al.*, 2005).

Enterococcus resistente à vancomicina (VRE) são apontados como fator de risco para desenvolvimento de infecções sanguíneas (OLIVER *et al.*, 2008); *E. coli* resistentes produtoras de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) são frequentemente associadas a infecções urinárias (YOUSEF *et al.*, 2016); *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina (MRSA) têm sido apontados como responsáveis por aumento nas taxas de internação e amputações em pacientes com diabetes, além de prolongar o tempo necessário para a cicatrização de úlceras e aumentar a recorrência de falhas em tratamentos de infecções (SALTOGLUA *et al.*, 2018).

Outro impacto da resistência antimicrobiana está relacionado ao tempo necessário para receber o tratamento correto, organismos resistentes, em mediana, demoram mais tempo que cepas suscetíveis para receber um antibiótico eficaz contra a infecção (72 horas, em comparação com 11,5 horas após o envio da amostra para cultura) (LAUTENBACH *et al.*, 2016). Lodise *et al.* (2003) mostraram que o atraso na administração do tratamento correto para bacteremia por *S. aureus* aumenta o risco de mortalidade para o infectado. Outros trabalhos vêm confirmando maior risco de morte quando ocorre atraso na administração de medicamentos (HELMS *et al.*, 2004). A administração de antibióticos eficientes no tratamento de infecções com *K. pneumoniae* produtora de ESBL já foram associados a menor taxa de mortalidade (PATERSON *et al.*, 2003).

Há também o impacto nos custos do setor da saúde, uma vez que pacientes com cepas resistentes possuem maior probabilidade de ter infecções hospitalares e ter sua hospitalização prolongada (LAUTENBACH *et al.*, 2016). Reed *et al.* (2005) reportaram que pacientes infectados com cepas suscetíveis de *S. aureus* possuem gastos de 13.978 dólares no início da internação, em contraste com pacientes infectados com MRSA, que gastam cerca de 21.251 dólares.

A longo prazo, a resistência antimicrobiana pode tornar os antibióticos ineficazes para tratamento de infecções já erradicadas, como a tuberculose, causando uma crise nos sistemas de saúde (RIZZO *et al.*, 2013).

Uma pesquisa realizada entre janeiro de 2005 e setembro de 2008 em alguns hospitais brasileiros revelou aumento de 4,4% a 12,2% na resistência à vancomicina (VRE) entre 2005 e

2008 (GALES *et al.*, 2009). O estudo revelou também que, no Hospital das Clínicas de São Paulo, cerca de 15% das cepas analisadas manifestaram infecção da corrente sanguínea por MRSA (GALES *et al.*, 2009). Outro estudo realizado por dois anos em 12 hospitais brasileiros de 4 estados diferentes relatou que os principais problemas de resistência bacteriana foram *P. aeruginosa* e *Acinetobacter spp.* resistentes ao imipenem; *K. pneumoniae* e *E. coli* produtoras de ESBL; *Enterobacter spp.* resistentes à cefalosporinas de terceira geração, e *S.aureus* resistente à oxacilina (SADER *et al.*, 2001).

O quadro abaixo (Quadro 3.1) resume os problemas-chave da resistência bacteriana no contexto da saúde humana, segundo Maragakis *et al.* (2008):

Quadro 3.1 - Resumo dos impactos causados pela RA na saúde humana.

Resistência antimicrobiana X saúde humana
<ul style="list-style-type: none"> • Atraso na administração do tratamento apropriado, contribuindo para resultados diversos em pacientes infectados com organismos resistentes • Impactos econômicos associados com a resistência antimicrobiana para a sociedade, os hospitais, o paciente e as agências do governo • Infecções causadas por agentes resistentes podem requerer tratamento com antibióticos mais agressivos ao corpo humano. • Associação entre <i>Staphylococcus aureus</i>, enterococos e bacilos gram-negativos resistentes a antibióticos e aumento de mortalidade, tempo de hospitalização e custos com cuidados de saúde • Associação entre a resistência antimicrobiana e o agravamento de infecções • Estratégias para prevenir a disseminação de organismos resistentes a antibióticos através do uso apropriado e medidas de controle de infecção são essenciais para a segurança do paciente

Fonte: Adaptado de Maragakis *et al.* (2008)

3.4 Estações de Tratamento de esgoto e resistência antimicrobiana

Como já enfatizado, uma parcela dos antibióticos utilizados por humanos e na pecuária acaba indo para as estações de tratamento de esgoto (ETEs), podendo causar pressões seletivas e aumento da resistência antimicrobiana (PAZDA *et al.*, 2019). Além da presença de antibióticos, no esgoto há grande quantidade de bactérias em intenso contato, elementos genéticos móveis nas células bacterianas e substâncias como metais pesados e recalcitrantes que também podem provocar pressão seletiva (MANAIA *et al.*, 2016). Os produtos sólidos e líquidos das estações de tratamento que são descarregados em corpos d'água podem contribuir para o aumento de GRAs no ambiente (CHEN e ZHANG, 2013). Desse modo, as ETEs têm sido consideradas *hotspots* de disseminação de resistência antimicrobiana já que propiciam a troca de material

genético entre bactérias (MANAIA *et al.*, 2018). Organismos resistentes a inúmeros antibióticos têm sido encontrados em corpos hídricos, sedimentos e efluentes de ETEs (PAZDA *et al.*, 2019; GARCIA-ARMISEN *et al.*, 2013). Destaca-se, que a RA não está somente associada às atividades humanas, porém, essas atividades têm contribuído para sua disseminação (ALLEN *et al.*, 2010; AMARASIRI *et al.*, 2020).

As estações de tratamento de esgoto convencionais são projetadas principalmente para remoção de sólidos grosseiros, sólidos suspensos e matéria orgânica; por vezes removem também nutrientes que podem causar eutrofização no corpo receptor (nitrogênio e fósforo) (VON SPERLING, 2011). Algumas ainda contam com tratamento terciário (como radiação UV ou cloração) voltado para remoção de patógenos. Apesar das ETEs não serem projetadas para a remoção de genes de resistência, pois são poluentes emergentes, estudos têm demonstrado que algumas estações de tratamento conseguem remover níveis significativos de GRAs (JÄGER *et al.*, 2018; LE *et al.*, 2018). Outros estudos, no entanto, apontam que as ETEs não possuem estrutura para remover esses poluentes (YUAN *et al.*, 2016); e há ainda aqueles que apontam para o aumento nos níveis de genes de resistência após a passagem do esgoto pelo sistema de tratamento (NÖLVAK *et al.*, 2013) (Tabela 3.3). Nesse sentido, o tipo de tratamento, os parâmetros de operação, os parâmetros físico-químicos e até mesmo a sazonalidade podem ser influenciadores da dinâmica dos GRAs nas ETEs (MANAIA *et al.*, 2018; MUNIR *et al.*, 2011).

Tabela 3.3 – Remoções de genes encontradas na literatura

Tipo de tratamento	Escala	Genes	Resultados	Referência
Tratamento convencional com lodos ativados	Escala Plena	16S rRNA, 23S rRNA, <i>ecfX</i> , <i>ecfX</i> , <i>blaTEM</i> , <i>sul1</i> e <i>int11</i>	Reduções de 1 a 2 unidades logs	JÄGER et al., 2018
Tratamento convencional com lodos ativados	Escala de Bancada	16S rRNA, tet(O), tet(M), <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>ermB</i> , <i>int11</i> , <i>blaKPC</i> , 341 <i>blaNDM</i> , <i>blaSHV</i> , <i>blaCTX-M</i> , <i>cfr</i> , <i>dfrA</i> , <i>vanA</i> , <i>qnrA</i> , e <i>qnrB</i>	Reduções entre 4 e 4,2 logs	LE et al., 2018
Tratamento convencional com lodos ativados, Reator sequencial aeróbio em batelada, Biorreator de membranas, reator UASB, filtro biológico	Escala de Bancada	<i>vanA</i> , <i>aacC1</i> , <i>ereA</i> , <i>ampC</i> , <i>tetA</i> e <i>sul1</i>	Lodos ativados reduziu entre 2,36 a 4,24 logs; Reator aeróbio entre 1,66 e 3,56; Filtro Biológico entre 0,58 a 1,18; membranas e reator UASB não mostraram significativa redução	YUAN et al., 2016

Tipo de tratamento	Escala	Genes	Resultados	Referência
Wetlands construídas de fluxo horizontal	Mesocosmos	tetA, tetB, tetM, ermB, sul1, ampC, e qnrS	Redução na concentração absoluta dos genes ermB e qnrS em até 2 unidades log ao final da operação, e aumento nas concentrações de 16S rRNA, tetA, tetB, tetM, sul1 e ampC	NÔLVAK et al., 2013

Vários são os genes de resistência avaliados em estações de tratamento de esgoto (ASHBOLT *et al.*, 2018). A Tabela 3.4 apresenta alguns dos genes mais quantificados em ETEs, reportados na literatura.

Tabela 3.4 - Características de alguns dos genes de resistência avaliados em sistemas de tratamento de esgoto.

Gene	Características gerais	Localização	Antibiótico	patógeno associado
<i>int11</i>	Elemento genético que carrega cassetes de genes.	Cromossomo, Plasmídeo.	–	Associado a GRAs de diversos antibióticos, principalmente em <i>Escherichia coli</i> multirresistente
<i>bla</i>	Codifica β -lactamases que hidrolisam os anéis beta-lactâmicos dos antibióticos.	Cromossomo, Plasmídeo	β -lactâmicos de amplo espectro	Gram-negativas, em especial Enterobacteriaceae
<i>tet</i>	Mecanismo de bombas de efluxo dependentes de prótons ou via proteção ribossômica.	Cromossomo, Plasmídeo, Integron,	Tetraciclina	<i>Aeromonas</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Edwardsiella</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Vibrio</i> spp., <i>Listeria monocytogenes</i> , e <i>E. coli</i>
<i>sul</i>	Codifica a enzima hidopteroato sintase, alvo dos antibióticos sulfonamidas.	Cromossomo Plasmídeo Integron	Sulfonamidas	<i>Acinetobacter</i> , Enterobacteriaceae, <i>Bacillus</i>

Fonte: Adaptado de ASHBOLT *et al.*, 2018 e WRIGHT, 2010.

3.4.1 Wetlands construídas e GRAs

As wetlands construídas têm se mostrado um eficiente sistema para remoção de matéria orgânica, sólidos suspensos, e por vezes nitrogênio e fósforo (VON SPERLING e SEZERINO,

2018). Além disso, é uma solução de fácil implantação e manutenção, pois simula um ambiente natural, onde o esgoto pode ser tratado (KADLEC e WALLACE, 2009).

Esse tipo de sistema possui várias configurações diferentes, mas basicamente são divididos em (i) wetlands de fluxo subsuperficial, onde o nível da água é mantido abaixo do substrato com direção de fluxo horizontal ou vertical; e (ii) wetlands de fluxo superficial, em que o nível da água permanece acima do substrato. Nesses sistemas, são plantadas espécies flutuantes, submersas ou emergentes (KADLEC e WALLACE, 2009). As wetlands verticais denominadas “sistema francês” são compostas por dois estágios, sendo que o primeiro recebe esgoto bruto, e o segundo recebe efluente do primeiro (VON SPERLING e SEZERINO, 2018). Liu *et al.* (2013) apontaram que os mecanismos de adsorção pelo substrato e biodegradação pela planta são importantes para a remoção de GRAs em wetlands.

Existem poucos estudos avaliando GRAs em wetlands, principalmente em wetlands de fluxo vertical, e não se tem conhecimento de algum realizado no Brasil. Sabe-se que o clima é um fator determinante para o desempenho desse tipo de sistema pois pode afetar as plantas e os microrganismos no biofilme (CHEN e ZHANG, 2013).

Fatores como o tipo de planta, a carga hidráulica, o substrato, a configuração da wetland (horizontal ou vertical) e a direção do fluxo são relevantes para a dinâmica dos GRAs nesse tipo de sistema. VACCA *et al.* (2005) utilizaram seis wetlands construídas (quatro verticais e duas horizontais) para mostrar que a diversidade microbiana é afetada pelo tipo de substrato, planta e parâmetros hidráulicos. Para isso eles utilizaram quatro wetlands preenchidas com areia e duas com argila expandida, três plantadas com *Phragmites australis* e três não plantadas. Os autores concluíram que a rizosfera da planta utilizada possuía população bacteriana maior que o solo, devido ao estímulo à formação de comunidades pela planta. Além disso, verificaram que propriedades como a salinidade e o pH são bastante afetados pelo substrato, portanto é razoável que esses fatores influenciem na dinâmica bacteriana.

Duas wetlands construídas de escoamento vertical, com áreas de 1m² cada, foram avaliadas no trabalho de Liu *et al.* (2013), uma delas preenchida com zeólito e a outra com pedra vulcânica. Três genes *tet* e o marcador *RNAr 16S* foram quantificados nos dois sistemas. O zeólito obteve melhor desempenho na remoção dos genes, com menos de 1 log de remoção das concentrações absolutas, tendo como principal justificativa a maior porosidade com relação a pedra vulcânica.

No entanto, Huang *et al.* (2017) avaliaram a diferença na remoção de GRAs em duas colunas preenchidos com partículas de tijolo ou conchas de ostra e não perceberam diferença significativa na remoção absoluta de genes de resistência a tetraciclina e *intII*. Além disso, encontraram remoção de 33% a 99% pelos tratamentos.

Diferentes cargas hidráulicas também foram avaliadas por Chen *et al.* (2016) em várias wetlands horizontais em escalas de mesocosmos: 10cm/d, 20cm/d e 30cm/d. Eles encontraram diferenças significativas na remoção de GRAs, além disso, a carga hidráulica de 10cm/d foi responsável pelo melhor desempenho.

Chen *et al.* (2016 b) avaliaram o desempenho de 12 wetlands (horizontais e verticais) com substratos diferentes (zeólito, pedra médica e cerâmica) obtendo remoções de até 97,9%, para o *qnrB*, 97,5% para *ermB*, 83,4% para *intII* e 80,1% para o *sulI*. No entanto alguns genes aumentaram suas concentrações após a passagem pelos tratamentos (*tetO* e *tetX*). Mais uma vez, o zeólito pareceu ser a melhor alternativa para a remoção de GRAs nesse tipo de sistema. Além disso, as wetlands horizontais obtiveram melhor desempenho na remoção de GRAs que as wetlands verticais. Chen *et al.* (2014) avaliaram um sistema de seis wetlands em séries numa pequena província no sul da China. As wetlands diferiam tanto no tipo de fluxo, quanto no substrato e espécies plantadas, e as remoções absolutas dos 11 GRAs estudados (*intII*, *intI2*, *sulI*, *sul2*, *sul3*, *tetM*, *tetO*, *tetX*, *tetB/P*, *ermB*, *ermC*) variaram entre 43,1% (*ermC*) e 99,8% (*tetM*).

Outro sistema de wetlands também mostrou bom desempenho na remoção de GRAs. Formado por 5 subsistemas em série (4 wetlands de fluxo superficial e uma wetland horizontal) em escala plena e com diferentes áreas e espécies plantadas, conseguiu reduzir as concentrações absolutas em cerca de 1,3-2,1 unidades log de genes tet; 1,5 log dos genes sul e 1,7 log de *intII* (CHEN e ZHANG, 2013).

A direção do fluxo parece ser também um fator que altera a dinâmica bacteriana dentro da wetland, afetando por sua vez, a remoção de GRAs. Huang *et al.*, 2017 constataram que as eficiências médias de remoção de GRAs dos tratamentos de fluxo ascendente em escala de mesocosmos foram mais altas do que aquelas dos tratamentos de fluxo descendente. O autor justificou tal fato afirmando que o fluxo descendente impede o crescimento de alguns microrganismos devido a menor quantidade de oxigênio dissolvido (HUANG *et al.*, 2017).

Alguns trabalhos tem demonstrado a variação na remoção de GRAs ao longo do tempo em wetlands construídas, principalmente com pouco tempo de operação. Nölvak *et al.* (2013) avaliaram um sistema com três wetlands horizontais paralelas em escala piloto posteriores a uma fossa séptica e seis wetlands verticais, ao longo de 150 dias de operação. Encontraram redução na concentração absoluta dos genes *ermB* e *qnrS* em até 2 unidades log ao final da operação, porém, também observaram aumento nas concentrações de *16S rRNA*, *tetA*, *tetB*, *tetM*, *sulI* e *ampC*. No entanto, destaca-se que ao longo dos 150 dias houve variação desse resultado, havendo diminuição de todos os genes (3 a 5 unidades log) com exceção do *tetM* no 64º dia de operação.

Em wetlands a concentração de antibióticos também é um parâmetro que pode influenciar a remoção de GRAs. Song *et al.* (2018) encontraram correlação significativa entre a concentração de antibióticos do grupo da tetraciclina e o número de cópias dos genes *tet* no efluente da wetland em escala laboratorial. Além disso, a abundância de GRAs no substrato da wetland frequentemente é maior que no efluente, indicando adsorção desses compostos no substrato (SONG *et al.*, 2018; LIU *et al.*, 2013).

Ávila *et al.* (2021) mostraram, com duas wetlands construídas de fluxo vertical em escala plena, que diferentes condições de saturação (uma não saturada e outra parcialmente saturada) não promoveram diferença significativa na remoção de GRAs. Porém, a unidade não saturada obteve menor concentração de *intI1* e *sulI* no biofilme. Além disso, não houve remoção significativa dos genes *intI1*, *sulI* e *blaTEM* em nenhuma delas.

Embora os estudos supracitados indiquem que as wetlands possam remover GRAs, ainda não há consenso na literatura. Além disso, os fatores que gerenciam a dinâmica das GRAs nesse tipo de sistema ainda não são bem entendidos, tendo em vista que alguns trabalhos encontram diferenças, por exemplo, na remoção em wetlands com diferentes substratos e outros não encontram esse resultado.

3.4.2 Tratamento anaeróbio de esgoto e GRAs

Tratamentos anaeróbios de esgoto sanitário são tecnologias bastante empregadas atualmente, exemplificados pelos reatores UASB e as lagoas anaeróbias. Nesses sistemas, ocorre a digestão anaeróbia da matéria orgânica pelos processos de hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese.

O reator UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactor*) consiste num sistema de tratamento biológico de esgoto bastante utilizado pela sua simplicidade de construção, operação e satisfatória eficiência de remoção de demanda bioquímica de oxigênio, dentre outras vantagens (CHERNICHARO, 2007). O efluente líquido entra no reator e sofre uma série de processos biológicos anaeróbios que auxiliam no consumo da matéria orgânica. No reator UASB o tempo em que os sólidos permanecem no reator é muito superior ao tempo de detenção hidráulica, o que promove maior crescimento bacteriano e consumo de matéria orgânica (CHERNICHARO, 2007).

O gás produzido pela digestão é conduzido pela parte superior do reator e é composto principalmente por metano, podendo ser purificado e reaproveitado para geração de energia, por exemplo. Como subproduto do reator UASB, também existem o lodo (que em parte, retorna para o reator) e o efluente líquido tratado. Geralmente é necessário um pós tratamento, pois a remoção de nutrientes não é suficiente (BRESSANI-RIBEIRO, 2018).

Condições anaeróbias tais como as presentes no reator UASB parecem não provocar uma redução eficaz de genes de resistência a antibióticos (YUAN *et al.*, 2016; TAO *et al.*, 2014). Em comparação com sistemas de lodos ativados, filtro biológico, reatores sequenciais em batelada e reator biológico de membrana, o reator UASB obteve o menor desempenho na remoção dos genes *sull*, *tetA* e *ampC* (YUAN *et al.*, 2016). Christgen *et al.* (2015) avaliaram os GRAs em dois sistemas de sequência anaeróbio/aeróbio (UASB e reator híbrido anaeróbio seguidos por reator de mistura completa) e em um sistema aeróbio (reator de mistura completa). Concluíram que houve maiores remoções de genes de resistência a tetraciclina, aminoglicosídeo e beta-lactâmicos nos sistemas anaeróbio-aeróbio e aeróbio, em relação aos reatores anaeróbios.

Um sistema de tratamento em escala de bancada formado por reator UASB, tanque óxico-anóxico, clarificador secundário e tanque de floculação foi avaliado por Hou *et al.* (2019). Após quantificar dez genes de resistência antes e após o reator UASB, percebeu-se que a média total da concentração absoluta aumentou. No entanto, também perceberam que a média total da concentração relativa não obteve mudança significativa, e com isso justificaram o aumento de GRAs pelo aumento na proliferação de bactérias resistentes.

Alguns autores têm se concentrado na quantificação de GRAs e avaliação da comunidade microbiana do lodo do reator UASB. Yi *et al.* (2017) quantificaram genes resistentes ao

cloridrato de oxitetraciclina no lodo de um reator UASB precedido de tratamento com hidrólise. Concluíram que o número de GRAs aumentou em cerca de 2 unidades log do afluente (resíduos de produção do antibiótico) para o lodo do UASB.

Reatores UASB muitas vezes são seguidos por tratamento aeróbio com o objetivo de aumentar a eficiência de remoção de matéria orgânica e nutrientes. A combinação desses dois tipos de processos tem mostrado resultados diversos na literatura. Uma planta de tratamento de produção de cefalosporina mostrou redução dos GRAs *tetG*, *tetX*, *tetW*, *intI1* e *sul1* pós reator UASB de 0,83 a 1 log, mas houve aumento na concentração de todos os GRAs, com exceção do *tetW*, após tratamento aeróbio (0,06-1,64 logs de remoção) (DU *et al.*, 2014). Em outra planta de tratamento anaeróbio/aeróbio, tratando efluente de produção de vitamina C foi relatado aumento nas concentrações dos genes *sul1*, *intI1* e *tet* ($10^{2.37}$ cópias/ml no afluente, $10^{2.97}$ cópias/ml no efluente do UASB e $10^{4.38}$ cópias/ml no efluente aeróbio) (DU *et al.*, 2014). No entanto, Du *et al.* (2014), também mostraram que outros tratamentos anaeróbios/aeróbios alcançaram remoção positiva de GRAs.

Tratamentos sequenciais anaeróbio/aeróbios mostraram desempenho satisfatório para remoção de GRAs em esgotos provenientes de atividades pecuárias, com eficiência média de remoção entre 33,3% e 97,56% para os genes *tetA*, *tetW*, *sul1*, *sul2* e *blaTEM* (TAO *et al.*, 2014). No entanto, foi observado que os sistemas anaeróbios sozinhos podem contribuir para a permanência dos GRAs.

Não há muitos trabalhos na literatura avaliando a remoção de GRAs em reatores UASB, e como ele geralmente é utilizado junto a um pós tratamento, muitos deles avaliam todo o sistema, não se debruçando sobre esse reator. Outros estudos se apoiam na comparação de sistemas, mas também não enfatizam nesse tipo de tratamento. Dessa forma, é imprescindível avaliar os GRAs no reator UASB para entender como o tratamento anaeróbio atua em sua remoção ou disseminação.

3.4.3 Desinfecção com radiação ultravioleta (UV)

A desinfecção através da radiação UV é uma alternativa para a mitigação do lançamento de vírus e bactérias do esgoto no ambiente. Esse processo tem sido bastante adotado nas ETEs, e atua principalmente afetando os ácidos nucleicos e formando dímeros (RIZZO *et al.*, 2013). A luz ultravioleta penetra na estrutura da célula sensível ao UV, onde é absorvida principalmente

pelas bases pirimidina e purina que compreendem os ácidos nucleicos (MICKINNEY e PRUDEN, 2012). Esse tipo de desinfecção possui algumas vantagens frente a utilização de ozônio e cloro, por exemplo, não forma subprodutos perigosos e não é corrosivo para a estrutura da ETE (ZHENG *et al.*, 2017).

Vários estudos têm reportado que o tratamento com UV remove bactérias de forma eficiente (ZHENG *et al.*, 2017; GUO *et al.*, 2015), no entanto, quando se trata de genes de resistência a antibióticos os resultados diferem bastante. Jäger *et al.* (2018) mostraram que não houve alteração significativa nas concentrações dos genes *intI1*, *ermB*, *sul1* e *blaTEM*, pré e pós tratamento com UV, apesar de ter sido capaz de induzir lesões no DNA. Resultados semelhantes foram demonstrados por Lee *et al.* (2017) que indicaram não haver alteração significativa de *tetA* em doses de UV até 200mj/cm². Sullivan *et al.* (2017) verificaram que o aumento da dose de UV de 69,8mJ/cm² para 279 mJ/cm² em isolados bacterianos de *Chryseobacterium* contendo o gene *tetW* foi responsável apenas por um acréscimo na remoção de cerca de 0,05 log. Em seus experimentos, Zheng *et al.* (2017) reportaram que a radiação UV pode causar a liberação de GRAs intracelulares, aumentando a concentração de GRAs livres.

Os danos provocados pela radiação UV muitas vezes provocam um mecanismo de resposta celular que contribui para restauração do DNA, mas também podem conduzir à mutagênese e a propagação de elementos genéticos móveis (AERTSEN e MICHIELS, 2006). Desse modo, os microrganismos podem se reativar após um tempo de cessação da radiação, e, neste caso, é possível que o tratamento com UV selecione os microrganismos capazes de se autorecuperar lançando-os na natureza. Alguns organismos, no entanto, não possuem essa capacidade de maneira expressiva, por exemplo os *Enterococcus* (SOUSA *et al.*, 2017). Sousa *et al.* (2017) perceberam que os genes *RNAr 16S* e *blaTEM* atingiram níveis próximos aos valores de pré-tratamento após três dias.

A suscetibilidade dos genes de resistência a esse tipo de desinfecção pode estar diretamente relacionada com a maneira que o mesmo se encontra no efluente, livre ou em bactérias. Além disso, o tipo de bactéria em que o gene se encontra também pode ser um fator determinante. Ao comparar organismos gram-positivos com gram-negativos, McKinney e Pruden (2012) concluíram que os primeiros foram menos afetados pelo UV e atribuiu esse fenômeno ao (i) menor tamanho dos genomas, que reduziu os alvos da radiação UV para a formação de dímeros de pirimidina e (ii) maiores cadeias de peptideoglicano, que de alguma forma podem proteger

dos danos causados pela radiação UV. McKinney e Pruden (2012) também reportaram que apenas doses maiores que 400mj/cm² causaram diferença significativa entre a inativação de GRAs intracelulares e extracelulares, onde as segundas obtiveram maiores remoções.

Em geral, doses maiores de UV são capazes de remover GRAs com mais eficiência (ZHUANG *et al.*, 2015; ZHENG *et al.*, 2017). Zheng *et al.* (2017) encontraram remoções de 52% e 73% para os genes *tetA*, *tetM*, *tetO*, *tetQ* e *tetW* em fluências de 40 mJ/cm², e de 79,7% a 92% para a fluência de 160 mJ/cm². Já para os genes *sul1* e *sul2* a eficiência foi respectivamente 78,1% e 71,1% em 160mJ/cm².

Guo *et al.* (2015) verificaram que a frequência de transferência conjugativa é significativamente afetada em doses de UV acima de 8 mJ/cm². Os autores atribuíram esse fenômeno, principalmente ao decréscimo no número de cepas doadoras e receptoras. Concluíram que existe um limite inferior para a concentração bacteriana, ao qual concentrações acima desse valor, favorecem a transferência conjugativa. A Tabela 3.5 apresenta os valores de fluência de desinfecção UV testados na literatura. Ressalta-se que alguns pesquisadores apontam para necessidade de maiores doses de UV para a redução de GRAs (RIZZO *et al.*, 2013; MAO *et al.*, 2015).

A literatura também reporta a utilização de outros tipos de desinfecção em conjunto com o UV (RIZZO *et al.*, 2019; HOU *et al.*, 2019). Os processos oxidativos avançados e o ozônio tem aumentado o desempenho na desinfecção de efluentes quando combinados com a radiação UV. HOU *et al.* (2019) mostraram que os genes *ermB* e *tetQ* reduziram para níveis não detectáveis após processo Fenton/UV, enquanto que a desinfecção UV e a ozonização sozinhos mantiveram apenas um potencial limitado para eliminar *RNAr 16S* e GRAs (redução de 0,8-1,6 log).

Tabela 3.5 – Radiações aplicadas na desinfecção de esgoto em mj/área.

Sistema	Radiação aplicada (mj/cm ²)	Genes	Referência
clarificador primário, Tanque Anaeróbio/anóxico/óxico e clarificador secundário	0,10,20,40,80,160	<i>tetA</i> , <i>tetM</i> , <i>tetO</i> , <i>tetQ</i> , <i>tetW</i> , <i>sul1</i> e <i>sul2</i>	ZHENG <i>et al.</i> , 2017
Cultivo em isolados bacterianos	69,8; 140 e 279.	<i>tetW</i>	SULIVAN <i>et al.</i> , 2017
Dois sistemas: Lagoas aeradas e lodos ativados.	250	<i>int11</i> , <i>blaCTX-M</i> , <i>blaTEM</i> , <i>ermB</i> , <i>qnrS</i> , <i>sul1</i> , <i>tet(O)</i> , <i>mecA</i> , <i>vanA</i> .	McCONNELL <i>et al.</i> , 2018

Sistema	Radiação aplicada (mj/cm ²)	Genes	Referência
Efluente de estação de tratamento, após clarificador secundário	0 a 1000	<i>ampC</i> , <i>tetA</i> , <i>mecA</i> e <i>van.</i> ,	McKINNEY e PRUDEN, 2012
Três sistemas: lodos ativados, Filtros modificados com zona aeróbia e anaeróbia e reatores anaeróbios	135	<i>blaCTX</i> , <i>blaOXA</i> , <i>blaTEM</i> , <i>blaNDM-1</i> , <i>int11</i> , <i>int2</i> , <i>int3</i> e <i>RNAr 16S</i> .	LAMBA e AHMMAD, 2017

Embora estudos indiquem que a radiação UV possa remover GRAs, ainda não há consenso na literatura sobre a dose mais eficiente para a remoção desses contaminantes. Além disso, ainda há a possibilidade de reativação das bactérias após um tempo de cessação da radiação UV.

3.4.4 Remoção de GRAs em outros sistemas de tratamentos de esgoto.

Sistemas de tratamento de esgoto como reatores de membranas e lodos ativados têm sido avaliados quanto à remoção de BRAs e GRAs. Em geral, os biorreatores de membrana (MBR) possuem um bom desempenho devido à natureza física desse tipo de tratamento. Le *et al.* (2018) avaliaram a remoção de GRAs em dois sistemas paralelos: lodos ativados convencional (LAC) e biorreator de membranas com microfiltração. Os dois sistemas eram precedidos de um tanque de sedimentação primária seguido por um reator *Ludzack-Ettinger* modificado (MLE). O trabalho mostrou remoção das concentrações de diversos GRAs em ambos os sistemas (até 4 logs para LAC e 4,2 logs para MBR). A unidade de microfiltração apresentou melhor desempenho em relação a de lodos ativados na remoção de GRAs (*blaCTX-M*, *blaSHV*, *ermB*, *sul1*, *sul2*, *tet(M)*, *tet(O)* e *int11*). Também já foram observadas remoções de 1-2 logs de GRAs em outros sistemas de lodos ativados (JÄGER *et al.*, 2018).

Em consonância, o MBR (biorreatores de membrana) também se mostrou mais eficaz na remoção de GRAs em comparação com estações convencionais de tratamento biológico de esgoto no estudo de Munir *et al.* (2011). No entanto, Breazeal *et al.* (2013) indicaram que a utilização de filtração por membrana não resultou em um bom desempenho na remoção de GRAs, ao contrário do que foi observado para as BRAs. Salienta-se, no entanto, que a porosidade é uma característica de suma importância no desempenho da membrana, assim como a forma em que o gene de resistência está no esgoto (intracelular ou extracelular) (LE *et al.*, 2018).

Além dos processos acima citados, o tratamento terciário também tem sido objeto de avaliação quanto a remoção de GRAs. Processos oxidativos avançados e a cloração tem sido bastante abordados na literatura (JÄGER *et al.*, 2018; DI-CESARE *et al.*, 2016; PEI *et al.*, 2019). No entanto, a desinfecção com cloração não tem se mostrado eficaz (YUAN *et al.*, 2015). Su *et al.* (2014) constataram que a cloração reduziu significativamente o número de bactérias, mas a taxa de detecção de genes de resistência mediados por plasmídeo aumentou nos efluentes de unidades de tratamento biológico. Sousa *et al.* (2017) indicaram que o processo de cloração pode aumentar o risco de selecionar *E. coli* resistentes à tetraciclina. No entanto, Di-cesare *et al.* (2016) observaram que o aumento nas doses de cloro (8 mg Cl₂/L para 16 mg Cl₂/L) provoca o aumento na eficiência de remoção dos genes *tet* de 85 para 99%.

Processos oxidativos avançados com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e dióxido de titânio (TiO₂) tem se mostrado promissores na remoção de GRAs quando combinados ao tratamento com UV, obtendo remoções de 2 a 5,8 logs desses contaminantes (PEI *et al.*, 2019). Apesar da existência de muitos estudos na linha de avaliação de remoção de GRAs em estações de tratamento e tratamento terciário de esgoto, ainda são necessários mais esforços para entender os

mecanismos que atuam por trás dos processos de remoção e destino dos GRAs em ETEs.

3.4.5 Fatores influenciadores da dinâmica dos GRAs em estações de tratamento de esgoto.

Até o momento há pouca definição acerca da influência de fatores físico-químicos na remoção de genes de resistência a antibióticos, no entanto tais fatores interferem na composição da comunidade microbiana do esgoto, podendo também afetar a dinâmica das GRAs. Manaia *et al.* (2018) listaram alguns fatores que podem interferir no destino dos GRAs em estações de tratamento de águas residuárias (Tabela 3.6).

Tabela 3.6 - Influência dos parâmetros físico-químicos na dinâmica dos GRAs.Fonte: Adaptado de Manaia *et al.* (2018).

Parâmetros	Influência
Temperatura, pH, condutividade elétrica e Oxigênio dissolvido (OD)	Podem afetar a composição da comunidade microbiana pois impõem condições de estresse capazes de induzir a sobrevivência ou crescimento.
Demanda bioquímica de oxigênio, Demanda química de Oxigênio, Nitrogênio total, carbono, fósforo e sólidos suspensos totais.	A remoção de carga orgânica (biodegradável e não biodegradável) indica a eficiência do tratamento A carga orgânica e outros nutrientes afetam o crescimento/sobrevivência das bactérias SST afeta a carga bacteriana e a capacidade de agregação das células.
Tempo de detenção hidráulica, tempo de detenção do lodo, vazão e fator de diluição esperado no corpo receptor	Tempos de detenção são importantes para uma estimativa de oportunidades para a seleção de bactérias e/ou recombinação genética (THG) A vazão avalia o impacto da descarga do esgoto no corpo receptor sobre a disseminação de GRAs e BRAs.
Antibióticos, metais e outros contaminantes	Potencial impacto na comunidade microbiana do esgoto e do lodo a partir da pressão seletiva Impactos da descarga do esgoto no corpo receptor sobre a contaminação com micropoluentes.

Novo *et al.* (2013) avaliaram a influência de alguns parâmetros (Temperatura, DQO, DBO e vazão) na resistência antimicrobiana em estações de tratamento de esgoto e concluíram que a temperatura máxima, a vazão e a DQO afetaram significativamente a estrutura da comunidade bacteriana das águas residuárias tratadas e brutas. Além disso, foi encontrada correlação significativa entre a variação das cargas de bactérias resistentes a antibióticos no efluente tratado e sua temperatura máxima.

Du *et al.* (2014) avaliaram a correlação entre a redução de GRAs e a remoção de DQO, nitrogênio e fósforo total em uma estação de tratamento de esgoto. Eles reportaram que a DQO exibiu correlação significativa com a concentração dos genes *tetW* ($R = 0,636$, $p < 0,05$), *intII* ($R = 0,829$, $p < 0,01$) e *sull* ($R = 0,832$, $p < 0,01$), e justificaram tais correlações através da alteração da comunidade microbiana pelas concentrações de DQO do meio.

Parâmetros operacionais também podem auxiliar no estudo da dinâmica dos GRAs. Por exemplo, o tempo de detenção hidráulica impacta no período em que as bactérias estão em contato. Além disso, em caso de tratamentos com recirculação da biomassa pode haver maior promoção de contato, aumentando os GRAs e as BRAs (RIZZO *et al.*, 2013).

3.5 Métodos para análise de GRAs

Para análise de genes de resistência a antibióticos em esgoto geralmente são utilizados métodos de cultura e/ou métodos independentes do cultivo de bactérias. Os primeiros permitem uma gama de observações, tais como, a caracterização fenotípica de isolados bacterianos, que pode indicar se um isolado é resistente a um tipo de medicamento (MANAIA *et al.*, 2018). No entanto, cerca de 1% de bactérias ambientais são passíveis de serem cultivadas e isso limita o uso dessa técnica (PAZDA *et al.*, 2019).

Dentre os métodos independentes de cultura, encontram-se a análise metagenômica, o PCR convencional e o quantitativo. Eles se iniciam com a extração de material genético de uma amostra para posterior avaliação qualitativa ou quantitativa.

A abordagem metagenômica é constituída do sequenciamento dos diversos genomas contidos em uma comunidade complexa. Dentre suas principais desvantagens se encontra o alto custo para o sequenciamento e demanda computacional das análises. A metagenômica não é direcionada apenas aos elementos que se quer identificar, compreendendo uma abordagem mais ampla, que pode inclusive, identificar novos genes de resistência (MANAIA *et al.*, 2016). Na PCR convencional, busca-se avaliar a presença ou ausência de um gene numa amostra. Basicamente o gene alvo é amplificado através de ciclos de variação de temperatura e ao final das reações de amplificação, a técnica do gel em eletroforese é utilizada na amostra para verificar se o gene foi amplificado ou não.

Na qPCR, utilizada neste trabalho, a reação de amplificação é repetida ciclicamente através de uma série de alterações de temperatura, o que possibilita a produção de milhares de cópias da região (gene) de interesse. Até aqui, o procedimento é bastante similar à PCR convencional. No entanto, na qPCR em tempo real acompanha-se a amplificação do fragmento à medida que ela ocorre, com o auxílio de fluorescência emitida por um reagente adicionado no processo, que permite quantificar o número de cópias do gene que está presente na amostra. Assim, a emissão de fluorescência é proporcional à quantidade de amplicons produzidos (MANAIA *et al.*, 2018). Salienta-se que a utilização dessa abordagem está vinculada a existência de iniciadores (ou *primers*) para os genes que se deseja avaliar, não sendo possível, portanto, sua aplicação em genes desconhecidos.

A técnica qPCR possui também como vantagens sua acessibilidade e seus resultados precisos. Ela se inicia com a extração do material genético da amostra e limpeza de constituintes que possam interferir nas reações de amplificação. Vale destacar que o material genético extraído é referente ao DNA total da amostra, sem distinção entre células vivas ou mortas (DO *et al.*, 2017).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Descrição dos sistemas de tratamento de esgoto.

Foram avaliados três sistemas simplificados de tratamento de esgoto inseridos no Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento UFMG/COPASA (CePTS): (a) Reator UASB seguido de filtro biológico percolador (FBP) e pós tratamento com fotorreator de lâmpadas emersas UV (b) reator UASB seguido de duas lagoas de alta taxa em paralelo (LAT) e (c) wetlands construídas de fluxo vertical (Figura 4.1).

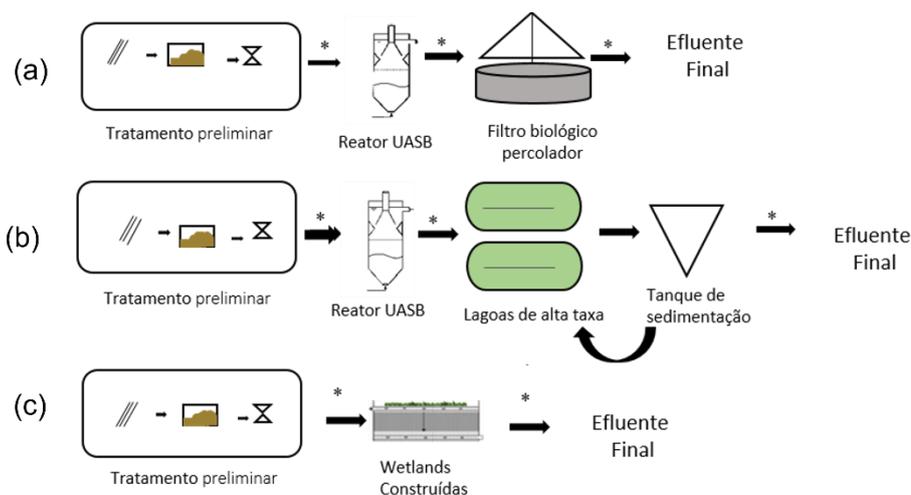


Figura 4.1 - Representação esquemática dos sistemas de tratamento de esgoto avaliados e pontos de coleta (*)

O sistema A é composto por um reator UASB, seguido de filtro biológico percolador de fibra de vidro preenchido com espuma de poliuretano. Os filtros biológicos percoladores são bastante utilizados na remoção de carbono residual e nitrogênio (BRESSANI-RIBEIRO, 2018).

O reator UASB do sistema A possui volume de 14,5m³, tempo de detenção hidráulica (TDH) de 7,5h, idade do lodo maior que 30 dias e recebe uma vazão equivalente à produção de 300 habitantes. O filtro biológico percolador (FBP) possui um volume total de 1m³ e seu material

de preenchimento possui área superficial de $6600 \text{ m}^2/\text{m}^3$ (BRESSANI-RIBEIRO, 2018). O biofiltro é subdividido em quatro compartimentos com aberturas laterais para suprimento de oxigênio (Figura 4.2). No entanto, apenas o último compartimento (3m a 3,9 m de profundidade) permaneceu aberto no período de amostragem para simular as condições de filtros tradicionais. A Tabela 4.1 apresenta algumas características do filtro biológico percolador.

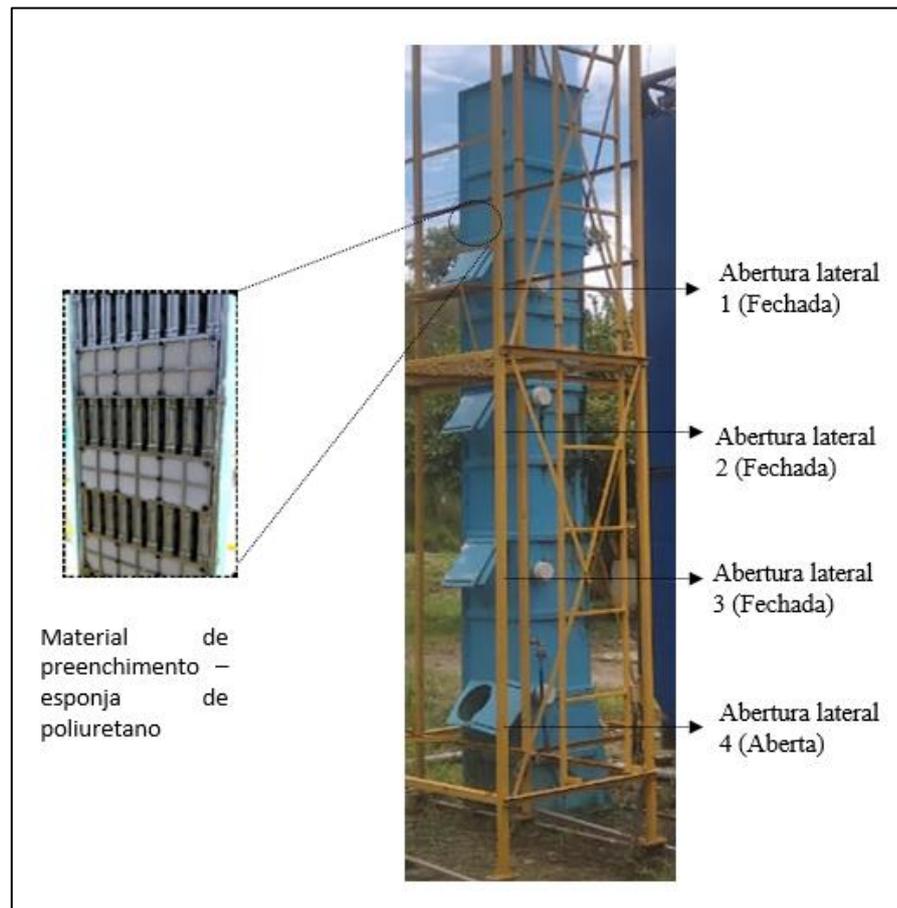


Figura 4.2 - Filtro biológico percolador do sistema A

Fonte: Adaptado de Bressani-Ribeiro (2020).

Tabela 4.1 – Parâmetros do filtro biológico percolador do sistema A.

Parâmetro	Valor	Unidade
Altura útil	3,91	m
Área superficial	0,25	m^2
Volume	1	m^3
Taxa carga hidráulica superficial	10	$\text{m}^3\text{m}^{-2}\text{d}^{-1}$
Razão de preenchimento*	40	%

Volume total da esponja	0,39	m ³
-------------------------	------	----------------

Fonte: Bressani-Ribeiro, 2018.

*Razão entre volume da esponja e volume do reator

O fotorreator do Sistema A possui 4 calhas (Figura 4.3) e foi confeccionado em alumínio. É equipado com quatro lâmpadas emersas *Phillips* de mercúrio de baixa pressão modelo G15T8 de 254nm, sendo duas lâmpadas de 30W e outras duas de 4W. Cada calha possui aproximadamente 12 cm de largura e 86,5 cm de comprimento. Para possibilitar a medição da intensidade da luz foram instalados quatro visores de quartzo com 15 mm de diâmetro e 2,7 mm espessura, na parte central de cada uma das quatro calhas. Os tempos de contato, bem como maiores informações acerca da coleta são fornecidos no item 4.2. O equipamento recebia o efluente parcial do filtro biológico percolador, que ficava armazenado em um reservatório de polietileno de 500 L, num período de cerca de 8 horas anteriores ao acionamento do fotorreator.

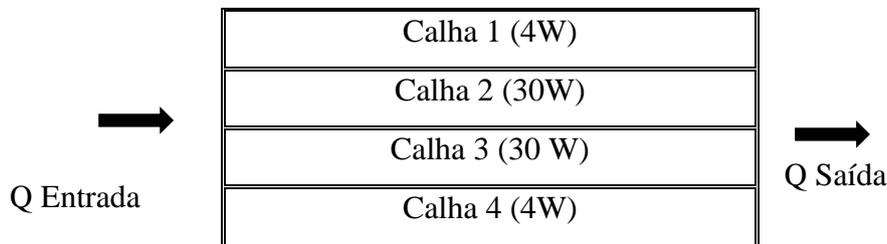


Figura 4.3 - Representação esquemática das calhas do fotorreator

O sistema B é composto por um reator UASB seguido por duas lagoas de alta taxa operando em paralelo e um tanque de sedimentação. O reator UASB é alimentado com o esgoto efluente do sistema preliminar e uma parcela da biomassa de microalgas das LAT. Um volume de 10 L da biomassa microalgal é bombeado para uma coluna de acrílico a 4 m acima do reator UASB e a partir daí é recirculada com o auxílio de uma bomba (BCR 2000 –Schneider®), numa taxa de 0,5L/h no fundo do reator.

O reator UASB do sistema B é constituído de fibra de vidro e possui volume de 343 L, vazão de entrada de 49 L/h, TDH de 7h e tempo de retenção do lodo de 35 dias. As LAT possuem volume de 205 L cada, área superficial de 0,41m², vazão de entrada de 25,5 L/d e tempo de detenção hidráulica de 8 dias. O tanque de sedimentação é constituído de PVC e possui volume de 30L para separar a biomassa algal do efluente tratado.

O sistema C é constituído por duas wetlands construídas de fluxo vertical com fundo saturado (sistema Francês), tratando uma vazão média de 13m³/d de esgoto efluente ao tratamento

preliminar. Cada wetland possui uma área superficial de 29,1m² (3,1m de largura e 9,4 m de comprimento) resultando em uma área total de 58,2 m².

Durante o período de amostragem, as wetlands passaram por duas configurações de operação pois outras pesquisas estavam sendo realizadas no sistema. Nos primeiros quatro meses, os fundos das duas unidades estavam interligados, assim o esgoto bruto entrava em uma das unidades pela superfície, percolando toda ela e em seguida passava pelo fundo da segunda unidade. Nos últimos dois meses, a operação se dava de forma intercalada entre as wetlands, onde uma delas recebia efluente bruto por uma semana, enquanto a outra passava esse período em descanso, e na semana seguinte invertia-se o esquema, assim as unidades ficavam 7 dias em alimentação e 7 dias em repouso.

A alimentação das wetlands se dava pela superfície (Figura 4.4), de forma intermitente, com pulsos horários de 0,53m³. A taxa média da carga hidráulica superficial total do sistema era de 0,45 m³m⁻²d⁻¹ e para cada unidade era de 0,23 m³m⁻²d⁻¹. Ambas as wetlands foram plantadas com grama Tifton 85 (*Cynodon dactylon Pers.*) e preenchidas com 15 cm de cascalho # 3 (19-50 mm) na parte inferior, 15 cm de cascalho# 1 (4,8-25 mm) na camada do meio e 40 cm de cascalho # 0 (2,4–12,5 mm) na camada superior.

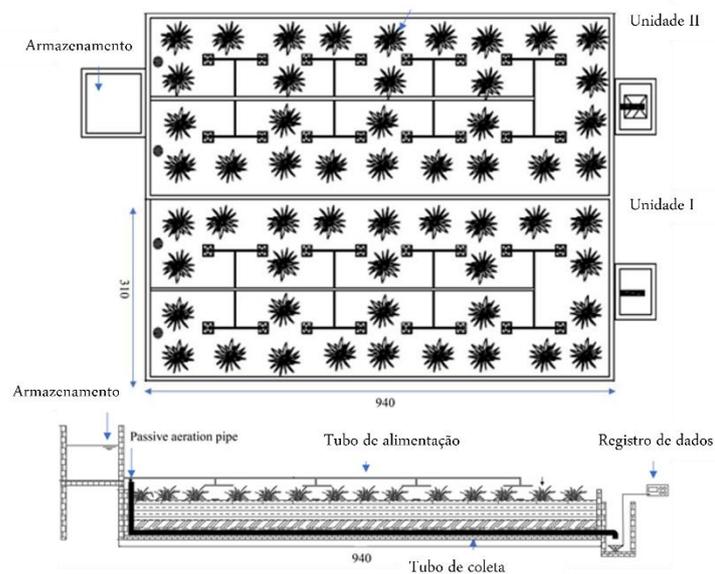


Figura 4.4 - Representação esquemática das wetlands construídas.

Fonte: Trein et al. (2019)

A Tabela 4.2 sumariza os parâmetros físico-químicos obtidos no monitoramento de Trein *et al.* (2019), Bressani-Ribeiro (2020) e Vassalle *et al.* (2020) dos três sistemas. Salienta-se que esses resultados foram obtidos em dias coincidentes com as análises das GRAs. Ademais, o sistema A foi amostrado num período diferente dos demais.

Tabela 4.2 - Parâmetros físico-químicos obtidos nos sistemas de tratamento de esgoto.

Parâmetro ^a	Sistema A (n=9)			Sistema B (n = 6)			Sistema C (n=6)	
	Esgoto bruto	UASB	FBP	Esgoto bruto	UASB	LAT	Esgoto bruto	Wetlands construídas
DQO (mg/L)	264	155	57	594	147	106	594	144,5
SST ^b (mg/L)	165	58	18,5	418	455	189,1	418	182
SSV ^b (mg/L)	164	48	16,5	213	166	121	213	24
pH	7,1	7,1	7,7	7,7	7,6	7,6	7,7	7,3
OD (mg/L)	*	0,44	2,51	0,23	0,39	7,7	0,23	2,1
T (°C)	24,4	24,8	24,3	25,4	24,7	24,5	25,4	25,1

^aResultados em mediana

^b Para SSV e SST, n=4.

*Parâmetro não medido

4.2 Coleta e processamento das amostras

A Tabela 4.3 apresenta o período e os pontos de amostragem para cada sistema de tratamento. Para os sistemas B e C, cada amostra foi coletada de maneira semicomposta, ou seja, foram coletados aproximadamente 250ml a cada 10 minutos para compor uma amostra de 1L. Dessa maneira, a coleta era feita no tempo total de 30 minutos. Nesses sistemas, as coletas foram feitas uma vez por mês, durante um período de seis meses, totalizando seis amostras.

Tabela 4.3 - Cronograma de coleta e pontos de amostragem

Sistema de Tratamento	Pontos de coleta	Data	Nº de dados em cada ponto de coleta (n)
A – UASB/FBP	Esgoto bruto, efluente do reator UASB e efluente do filtro biológico percolador.	Ago/2020 (4 coletas); Set/2020 (2 coletas); Nov/2020 (2 coletas) e Fev/2021 (1 coleta).	9
A – Fotorreator com luz UV	Afluente e efluente ao fotorreator.	Nov/2020 e fev/2021.	13
B – UASB/LAT	Esgoto bruto, efluente ao reator UASB e efluente das lagoas de alta taxa	Ago/2019; Set/2019; Out/2019; Nov/2019; Dez/2019 e Jan/2020	6

Sistema de Tratamento	Pontos de coleta	Data	Nº de dados em cada ponto de coleta (n)
C- wetlands construídas.	Esgoto bruto e efluente das wetlands.	Ago/2019; Set/2019; Out/2019; Nov/2019; Dez/2019 e Jan/2020	6

No sistema A, a coleta foi realizada duas vezes por mês (ou mais), a partir de agosto de 2020, como pode ser observado na Tabela 4.3. Ao final, foram 9 campanhas de coleta neste sistema. As amostragens no sistema A não foram feitas de maneira composta, e desse modo o recipiente de 1L era preenchido de uma vez.

Para as coletas no fotorreator, foi utilizado um radiômetro modelo *Multi-Sense MS-100 (Ultra violet products)* para as leituras da radiação UV após passagem pela lente de quartzo. As doses de UV eram alteradas através das modificações na vazão de entrada do fotorreator, que conseqüentemente modifica o tempo de contato da radiação com o efluente (Equação 4.1). Para obtenção da dose de energia UV aplicada foi utilizada a Equação 4.2. A cada mudança na vazão do sistema, eram feitas leituras da radiação UV após as lentes de quartzo e medição da altura da lâmina do esgoto dentro do fotorreator.

$$Vazão = \frac{Volume}{Tempo} \quad \text{Equação 4.1}$$

$$Dose (mj/cm^2) = R (mw/cm^2) \times T(s) \quad \text{Equação 4.2}$$

Onde R é a média aritmética da radiação lida pelo radiômetro (mw/cm²) nas quatro calhas e T é tempo de contato em segundos.

As amostragens do fotorreator foram feitas em duas campanhas (novembro/2020 e fevereiro/2021) e as doses de radiação UV foram agrupadas em faixas para comportar as variações nas leituras do radiômetro. Dessa forma, foram obtidas três faixas: A (3- 15 mJ/cm²), B (20-80 mJ/cm²) e C (100-160 mJ/cm²).

As amostras de todos os sistemas foram coletadas em frascos de polietileno e armazenadas sob refrigeração para preservação durante o transporte ao laboratório de Microbiologia de Água e Esgoto, do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental (DESA - UFMG). Em menos de 24h as amostras foram filtradas em membranas com poros de 0,22µm até a colmatação, e os

volumes filtrados foram registrados. Após isso, as membranas foram transferidas para microtubos de 2,0 ml e preservadas a -20 °C até a extração do material genético. Exclusivamente para as amostras do fotorreator, as filtrações foram feitas no dia seguinte a coleta.

4.3 Quantificação dos genes.

Para a quantificação dos genes via qPCR, primeiramente é necessário executar a extração do DNA das amostras coletadas e concentradas.

4.3.1 Extração de DNA

O processo de extração de ácidos nucleicos e sua qualidade são cruciais para as análises subsequentes. A extração do DNA foi feita com o kit *FastDNA® Spin Kit for Soil* (MPBiomedicals®), conforme orientações do fabricante. Após esse procedimento, foi feita a quantificação e avaliação do DNA extraído através do espectrofotômetro *Nanodrop 1000* (Thermo Scientific®), analisando se a relação das absorbâncias nos comprimentos de onda 260 e 280 estava entre 1,8 e 2, valores indicados pelo fabricante. Para a subsequente qPCR, foi feita uma padronização do DNA extraído na concentração de 5 ng/μl.

4.3.2 Obtenção de plasmídeos para curva padrão

A curva padrão foi feita com a utilização de plasmídeos, resultantes de clonagem em vetor *pGEM®-T Easy Vector* em *E. coli* JM109, e extraídos com a utilização do kit *GenElute™ HP Five-Minute Plasmid Miniprep Kit*. As linhagens clonadas e o material genético foram obtidos durante estudo anterior (FREITAS, 2020) e já se encontravam disponíveis em laboratório. A quantificação do DNA extraído foi feita via *Nanodrop 1000* (Thermo Scientific®).

Para obtenção da concentração dos plasmídeos em cópias/μl no primeiro ponto da curva padrão foi utilizada a Equação 4.3. Foi considerado o plasmídeo recombinante como a soma do plasmídeo com o inserto. Considerou-se também, para o plasmídeo, que 1 mol de par de base possui 649g, já para o inserto a massa do par de base varia de acordo com o gene. No numerador da equação a concentração do plasmídeo recombinante se refere a concentração lida pelo *Nanodrope*, que multiplicada pelo número de Avogadro resulta no número de cópias por massa de DNA. Já o denominador se refere a massa total do plasmídeo recombinante (plasmídeo + inserto).

$$\text{Número de cópias. } \mu\text{L}^{-1} = \frac{\text{Concentração do plasmídeo recombinante (g/}\mu\text{L)} \times 6,022 \times 10^{23}(\text{cópias})}{\text{Tamanho do plasmídeo recombinante em pb} \times 649 \text{ (g/pb)}}$$

Foi feita uma curva padrão com seis pontos para cada gene quantificado, com diluições seriadas de 10X em água ultrapura. Seu ajuste aos dados foi considerado satisfatório quando $R^2 > 0,99$ e a eficiência obtida estava no intervalo de 90 a 100%. O aplicativo *ThermoFischer Connect* foi utilizado para inserir a curva padrão nos resultados de amplificação das amostras para obtenção das concentrações absolutas dos genes.

4.3.3 qPCR em tempo real

O PCR quantitativo em tempo real é baseado na intensidade de fluorescência emitida por um fluoróforo que se liga ao DNA. Na medida em que o gene é amplificado, a intensidade da fluorescência emitida aumenta exponencialmente (Figura 4.5), até a reação alcançar um platô, que ocorre devido ao consumo dos reagentes ou acúmulo de inibidores. A Figura 4.5 exemplifica o gráfico gerado durante a amplificação.

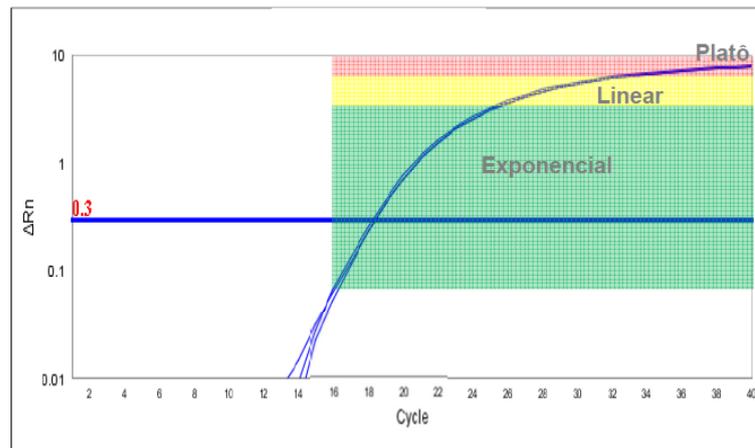


Figura 4.5 - Emissão da fluorescência nos ciclos de amplificação.

Fonte: Thermo Fisher scientific

A concentração do gene em cópias/ μL é calculada com base no ciclo em que a reação inicia a fase exponencial, chamado de Ciclo de *Threshold* (Ct). Com os valores de Ct, o número de cópias/ μL em cada reação da qPCR foi obtido através da curva padrão e da equação 4.4, onde y representa o valor de Ct; *a* é a inclinação da reta da curva padrão (*slope*), *b* representa o Ct na origem (Y-intercept) e *x* representa o número de cópias do gene em log. A Figura 4.6 exemplifica uma curva padrão obtida na qPCR. Destaca-se a importância de parâmetros como a eficiência, que mede o quão próximo de uma curva exponencial foi a amplificação real, e

garante resultados mais precisos de cópias/ μl , quanto mais próxima estiver de 100%. A eficiência está relacionada com o *slope* (Equação 4.5), e quando esta resulta em 100%, o *slope* vale -3.32. Além da eficiência, a curva padrão ainda possui o coeficiente R^2 , que revela o ajuste dos dados à reta, sendo considerados valores acima de 0,99.

$$y = ax + b$$

Equação 4.4

$$E = 10^{\left(\frac{-1}{a}\right)} - 1$$

Equação 4.5

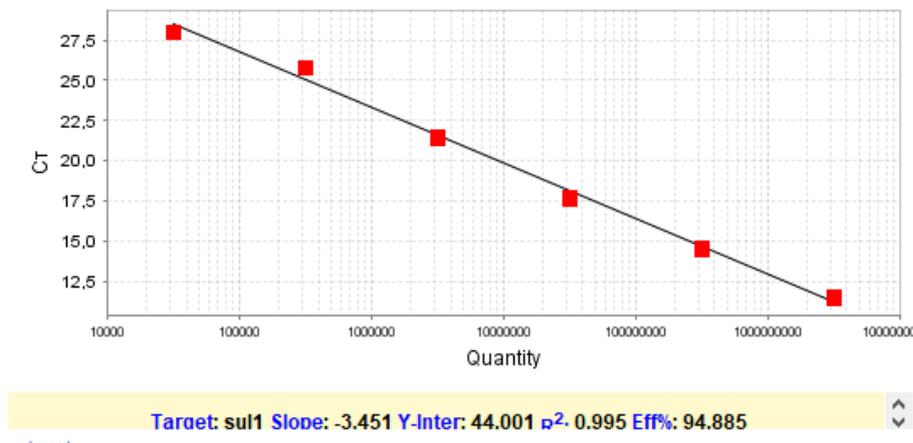


Figura 4.6 - Exemplo de curva padrão obtida através da qPCR.

As curvas de *melting* geradas para cada reação de amplificação também foram analisadas com o objetivo de avaliar se as reações foram afetadas por impurezas presentes nas amostras. Quando isso ocorre, gráficos de *melting* que geralmente possuem apenas um pico podem apresentar dois ou mais picos, superestimando os dados. A Figura 4.7 apresenta um exemplo de curva de *melting* gerada após as reações de amplificação.

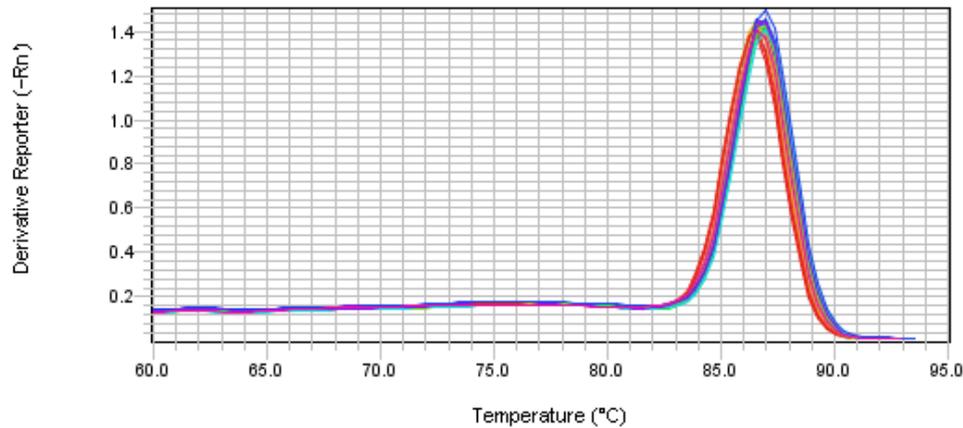


Figura 4.7 - Exemplo de curva de *melting* gerada após reação de amplificação.

Os resultados em cópias/ml foram obtidos considerando os volumes filtrados de cada amostra na etapa de processamento, além das diluições feitas para a realização da amplificação. Esses resultados e as curvas padrão geradas no presente estudo podem ser observados nas Tabelas A1 e A2 do APÊNDICE A, respectivamente. A remoção de cada elemento genético foi calculada através da equação 4.6, onde C_0 e C são respectivamente as concentrações absolutas dos genes em cópias/ml nos pontos afluente e efluente ao componente do sistema de tratamento.

$$\text{Remoção} = \log_{10}(C_0/C)$$

Equação 4.6

Para a reação em cadeia de polimerase foi utilizado o mix *PowerUp SYBR Green Master Mix* e o equipamento *Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (ThermoFisher®)*. Foram empregados *primers* referentes aos genes que conferem resistência a tetraciclina (*tetA*), β -lactâmico (*bla_{TEM}*), sulfonamida (*sulI*), além dos genes *intI1* e *RNAr 16S*, cujas informações são apresentadas na Tabela 4.4, junto com as condições da qPCR. Os GRAs selecionados são resistentes a alguns dos antibióticos mais consumidos no Brasil (CASTRO *et al.*, 2020).

Para cada reação foram utilizados 2 μ l de DNA na concentração padronizada de 5 ng/ μ l, 10 μ l de *PowerUp SYBR Green Master Mix*, além dos *primers* em volume variável de acordo com as concentrações apresentadas da Tabela 4.4. Também em volume variável foi acrescentada água ultrapura para completar 20 μ l por reação. Todas as amostras foram feitas em triplicata e em cada placa foi inserido controle negativo, com ausência do DNA.

Tabela 4.4 - Principais informações acerca dos primers a serem empregados na qPCR.

Gene	objetivo/antibiótico	Primers e sequências	Amplicon (pb)	Condições	Concentrações de primers	Referência
RNAr 16S	Bactérias totais	1055-F ATGGCTGTCGTCAGCT 1392-R ACGGGCGGTGTGTAC	337	95°C por 10 min (1 ciclo); 95°C por 15 s, 53°C por 1 min e 72°C por 1 min (40 ciclos)	400 nM	FERRIS <i>et al.</i> , 1996
intI1	Gene integrase I, marcador de poluição antrópica.	intI1-F CCTCCCGCACGATGAT C intI1-R TCCACGCATCGTCAGG C	280	95°C por 10 min (1 ciclo); 95°C por 15 s, 55°C por 30 s e 72°C por 30 s (40 ciclos)	400 nM	GOLDSTEIN <i>et al.</i> , 2001
sul1	Gene de resistência a sulfonamidas.	sul1-F CGCACCGGAAACATCG CTGCAC sul1-R TGAAGTTCGCCGCAA GGCTCG	163	95°C por 5 min (1 ciclo); 95°C 15 s, 60°C por 1 min; 95°C 30s (40 ciclos)	400 nM	MAO <i>et al.</i> , 2015
tetA	Gene de resistência a tetraciclina	tetA-F GCTACATCCTGCTTGC CTTC tetA-R CATAGATCGCCGTGAA GAGG	210	94°C por 5 min (1 ciclo); 94°C por 30 s, 55°C por 1 min e 72°C por 30 s (40 ciclos)	300 nM	MAO <i>et al.</i> , 2015
blaTEM	Gene de resistência a beta-lactâmicos	blaTEM-F GCACGAGTGGGTTACA TCGA blaTEM-R GGTCTCCGATCGTTG TCAG	311	95°C por 10 min (1 ciclo); 95°C 15 s, 60°C por 1 min e 95°C 30s (40 ciclos)	400 nM	CARLSO N <i>et al.</i> , 1999

4.4 Análises estatísticas

Testes de hipótese não paramétricos foram utilizados para comparação entre as concentrações de genes, considerando uma distribuição não normal devido a quantidade de dados. O teste U de *Wilcoxon-Mann-Whitney* foi utilizado para comparação entre as concentrações afluentes e efluentes a cada componente dos sistemas de tratamento de esgoto. Já para avaliação comparativa entre os três sistemas, foi utilizado o teste de *Kruskall Wallis*. Para avaliar o desempenho do fotorreator nas diferentes faixas de doses de radiação UV, as amostras foram consideradas não pareadas devido ao agrupamento dos dados, e por isso utilizou-se o teste de *Mann-Whitney*. Todos os testes foram desenvolvidos no software *Rstudio*, utilizando o nível de significância de 5%.

A influência dos parâmetros físico-químicos na concentração de GRAs foi determinada através de correlações de *Spearman*, para nível de significância de 5%, e análise de componentes principais (PCA). Tais análises foram feitas nos pontos afluentes e efluentes dos componentes dos sistemas B e C, utilizando pH, oxigênio dissolvido (OD), temperatura (°C), demanda química de oxigênio (DQO), sólidos suspensos totais (SST) e sólidos suspensos voláteis (SSV).

Os dados de parâmetros físico-químicos utilizados foram obtidos e fornecidos por outros pesquisadores e suas medianas estão apresentados na Tabela 4.2 (TREIN *et al.*, 2019; VASSALLE *et al.*, 2020; RIBEIRO-BRESSANI, 2020).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração dos genes *blaTEM*, *tetA*, *sulI*, *intI1* e *RNAr 16S* afluentes e efluentes a cada componente dos três sistemas avaliados (A - UASB/FBP, B – UASB/LAT e C - wetlands construídas) são apresentadas nessa seção. Em primeiro lugar, serão apresentados resultados de ocorrência dos genes no esgoto afluente, e após isso, a remoção de GRAs em cada sistema será avaliada de forma separada. Por fim, será feita a análise do desempenho do fotoreator na remoção de GRAs e uma comparação entre os três sistemas. Os resultados dos testes estatísticos de Wilcoxon podem ser observados na Tabela C1 do apêndice C.

5.1 Ocorrência dos genes no afluente.

A Figura 5.1a apresenta as concentrações absolutas dos genes quantificados. São apresentados os resultados das amostras afluentes aos sistemas B (UASB/LAT) e C (wetlands construídas). Destaca-se que os três sistemas analisados dividem o mesmo esgoto bruto, no entanto, apenas os sistemas B e C foram amostrados no mesmo período, e dessa forma as amostras de esgoto bruto para os dois sistemas são as mesmas.

Como esperado, o marcador *RNAr 16S* foi o mais abundante, com mediana de $1,09E+09$ cópias/ml (Tabela B1 do APÊNDICE B, Figura 5.1a), já que esse gene está presente em todas as células bacterianas, e por vezes, em mais de uma cópia (PEI *et al.*, 2010). O integron classe 1 foi o segundo elemento mais abundante no esgoto bruto (mediana de $3,03E+08$ cópias/ml) em consonância com outro estudo (DU *et al.*, 2014). Esse gene, como já destacado anteriormente, é indicador da presença de GRAs, e é considerado marcador de poluição antropogênica (GILLINGS, 2015). Seguem em ordem decrescente, o *blaTEM* e o *sul1*, com concentrações medianas de $5,13E+07$ e $2,7E+07$ cópias/ml, respectivamente (Tabela B1, Figura 5.1a). Percebe-se que os valores encontrados no presente estudo não se distanciam daqueles reportados na literatura (Tabela 5.1).

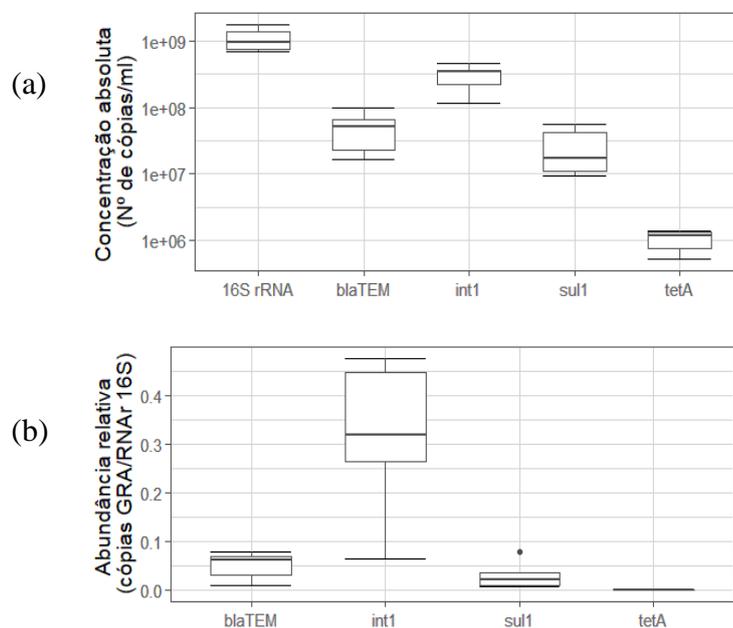


Figura 5.1 - Concentrações (a) absolutas e (b) relativas dos genes afluentes aos sistemas B (UASB/LAT) e C (Wetlands Construídas)

As concentrações de *blaTEM* e *sul1* podem estar relacionadas com a quantidade de seus respectivos antibióticos presentes no esgoto (beta-lactâmicos e sulfonamidas), causando pressão seletiva para a transferência desses genes. Esse fato também explicaria as menores concentrações de *tetA*. Castro *et al.* (2020) reportaram que os antibióticos da classe dos beta-lactâmicos (como amoxicilina e cefaloxina) são os mais consumidos no Brasil, e que as tetraciclina são a quarta classe mais utilizada. Salienta-se que concentração dos antibióticos

não foi medida no presente estudo para confirmar tal hipótese. Ademais, alguns estudos não tem encontrado correlação entre a quantidade de antibióticos e GRAs.

Tabela 5.1 - Concentrações absolutas de genes no esgoto bruto e tratado quantificadas via qPCR e reportadas na literatura e no presente estudo, para diferentes sistemas de tratamento.

Gene	Esgoto bruto (cópias/ml)	Esgoto tratado (cópias/ml)	Tecnologia de tratamento	Referência
<i>RNAr 16S</i>	10 ⁹	10 ⁸ -10 ⁹	WCH	CHEN <i>et al.</i> , 2016
	10 ⁶ -10 ⁹	10 ⁶ -10 ⁹	A/O	TAO <i>et al.</i> , 2014
	10 ⁹	10 ⁸	LAC	FREITAS, 2020
	10 ⁹	10 ⁹	UASB/LAT	Presente estudo
	10 ⁹	10 ⁹	wetlands construídas	Presente estudo
	10 ⁹	10 ⁸	UASB/FBP	Presente estudo
<i>intII</i>	10 ⁷	10 ⁵	AAO-MBR	DU <i>et al.</i> , 2014
	10 ⁵	10 ⁶	UASB/O	DU <i>et al.</i> , 2014
	10 ⁸	10 ⁵	WHC (sistema)	CHEN <i>et al.</i> , 2014
	10 ⁷	10 ⁶	LAC	FREITAS, 2020
	10 ⁸	10 ⁷	UASB/LAT	Presente estudo
	10 ⁸	10 ⁷	wetlands construídas	Presente estudo
<i>sulI</i>	10 ⁵	10 ⁶	UASB/O	DU <i>et al.</i> , 2014
	10 ⁵ -10 ⁷	10 ³ -10 ⁵	LAC, DO, CBR, MBR	MUNIR <i>et al.</i> , 2011
	10 ⁸	10 ⁸	WCH	CHEN <i>et al.</i> , 2016
	10 ⁸	10 ⁸	LAC	FREITAS, 2020
	10 ⁷	10 ⁷	UASB/LAT	Presente estudo
	10 ⁷	10 ⁷	wetlands construídas	Presente estudo
<i>tetA</i>	10 ⁵ -10 ⁷	10 ³ -10 ⁶	A/O	TAO <i>et al.</i> , 2014
	10 ⁶	10 ⁵	LAC	FREITAS, 2020
	10 ⁶	10 ⁵	UASB/LAT	Presente estudo
	10 ⁶	10 ⁶	wetlands construídas	Presente estudo
	10 ⁶	10 ⁵	UASB/FBP	Presente estudo
	<i>blaTEM</i>	10 ⁵ - 10 ⁷	10 ³ - 10 ⁵	A/O
10 ⁵		10 ³	LARBN/UV	NARCISO-DA-ROCHA <i>et al.</i> , 2018; FREITAS, 2020
10 ⁷		10 ⁶	LAC	
10 ⁷		10 ⁴	UASB/LAT	Presente estudo
10 ⁷		10 ⁶	wetlands construídas	Presente estudo
10 ⁷		10 ⁵	UASB/FBP	Presente estudo

WCH: wetlands construídas de fluxo horizontal; A/O: Processo anaeróbio/aeróbio; AAO/MBR: Anaeróbio/Anóxico/Aeróbio seguido por biorreator de membrana; UASB/O: Reator UASB seguido por tratamento aeróbio; LAC: Lodo ativado convencional; DO: Duto de oxidação; CBR: contactores biológicos rotatórios; LARBN/UV: Lodos Ativados com remoção de nitrogênio/Ultravioleta, UASB/LAT: reator UASB seguido por lagoas de alta taxa e UASB/FBP: reator UASB seguido por filtro biológico percolador.

Observando as concentrações relativas ao gene *RNAr 16S* (Figura 5.1b) é notável que o gene *tetA* tem a menor abundância relativa quando comparado com os outros GRAs avaliados. Já o *intII*, com concentração relativa próxima de 0,5, foi o elemento analisado com maior concentração em relação ao gene *RNAr 16S* no esgoto, sugerindo maior presença de bactérias que abrigam esse gene ou a presença de mais de uma cópia desse gene no genoma bacteriano. Segundo Martinez *et al.* (2012), o *intII* pode estar localizado no cromossomo bacteriano. Esses autores encontraram o *intII* em quatro regiões cromossômicas distintas em isolados clínicos de

P. aeruginosa utilizando metodologias de sequenciamento, PCR e eletroforese em campo pulsado. Integrons de classe 1 também tem sido bastante disseminado através de plasmídeos e transposons (MARTINEZ *et al.*, 2012; GILLINS *et al.*, 2015).

As concentrações absolutas do sistema A (UASB/FPB) são apresentadas Figura 5.2a. Percebe-se similaridade entre a abundância dos genes observadas nos sistemas B e C com o sistema A, sendo o mais abundante o *RNAr 16S*, com mediana de $1,44E+09$ (Tabela B1, Figura 5.2a), seguido pelos genes *intI1* ($3,0E+08$), *sulI* ($1,6E+08$), *blaTEM* ($4,93E+07$) e *tetA* ($2,6E+06$). Nota-se que o *sulI* dessa vez, foi mais abundante que o gene *blaTEM*, que havia sido ligeiramente mais abundante no período de agosto/2019 a janeiro/2020, quando ocorreram as coletas dos sistemas B e C.

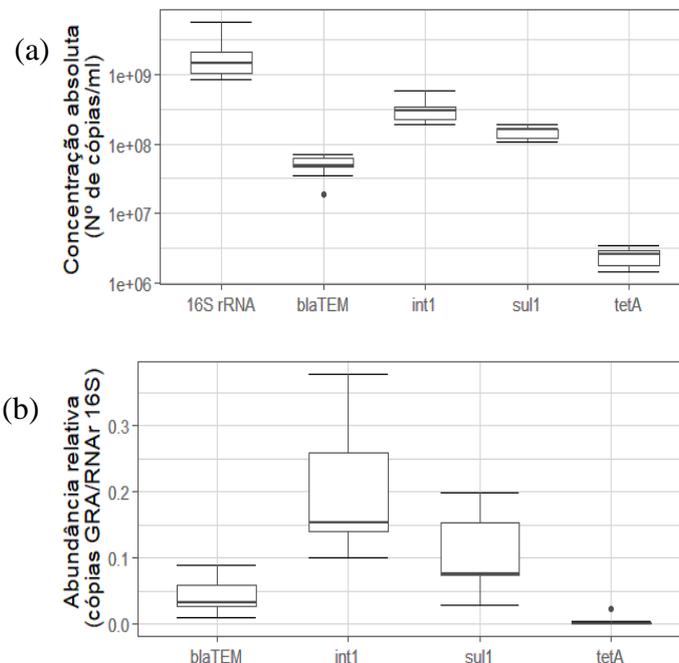


Figura 5.2 - Concentrações (a) absolutas e (b) relativas dos genes afluentes aos sistemas A (UASB/FPB)

A Figura 5.2b mostra as abundâncias relativas dos genes quantificados afluentes ao sistema A. Pode-se perceber os pequenos valores de GRAs existentes no afluente em comparação com o gene *RNAr 16S*, como observado por outros autores (HUANG *et al.*, 2017; CHEN *et al.*, 2016). Os genes *intI1* e *sulI* são os mais abundantes em relação ao marcador genético das bactérias, com relações respectivas de 0,15 e 0,08 (Tabela B2, APÊNDICE B), seguidos pelo *blaTEM* com 0,03 e *tetA* com 0,001.

5.2 Sistema A (UASB/FBP).

5.2.1 Remoção dos genes.

A Figura 5.3a apresenta os resultados da quantificação dos genes no sistema A (UASB/FBP). É notável que todos os genes avaliados tiveram concentrações decrescentes do afluente para o efluente final do sistema. O gene *blaTEM* foi o que obteve maior remoção considerando todo o sistema, passando de $4,93E+07$ cópias/ml no afluente para $5,56E+06$ cópias/ml após o reator UASB e $2,53E+05$ cópias/ml no efluente final.

Houve remoção significativa de todos os genes quantificados após reator UASB ($p < 0,05$). O marcador *RNAr 16S* foi removido em cerca de 0,8 logs; o *blaTEM* em 0,9 log, seguido pelo *intI1* com remoção de 0,64 log; *sulI*, 0,52 log e *tetA*, 0,29 log (Figura 5.4). A literatura reporta valores semelhantes de remoção do *RNAr 16S*, *intI1* e *blaTEM*, sendo, respectivamente 0,9; 1,01 e 0,5 após reator UASB (DU *et al.*, 2014; YANG *et al.*, 2019). Salienta-se que houve desempenho semelhante nos três sistemas avaliados para o gene *blaTEM*, como será visto nas seções seguintes.

Os genes *tetA* e *sul1*, obtiveram as menores remoções (0,29 e 0,5 log, Figura 5.4). Du *et al.* (2014) encontraram remoção de 0,83 log para o *sul1* em reator UASB de um sistema de tratamento de produção de cefalosporinas. Tao *et al.* (2014) mostraram que em uma das 6 fazendas de criação de suínos por eles avaliadas, o sistema de tratamento conseguiu remover apenas aproximadamente 0,3 logs do gene *tetA* após tratamento anaeróbio.

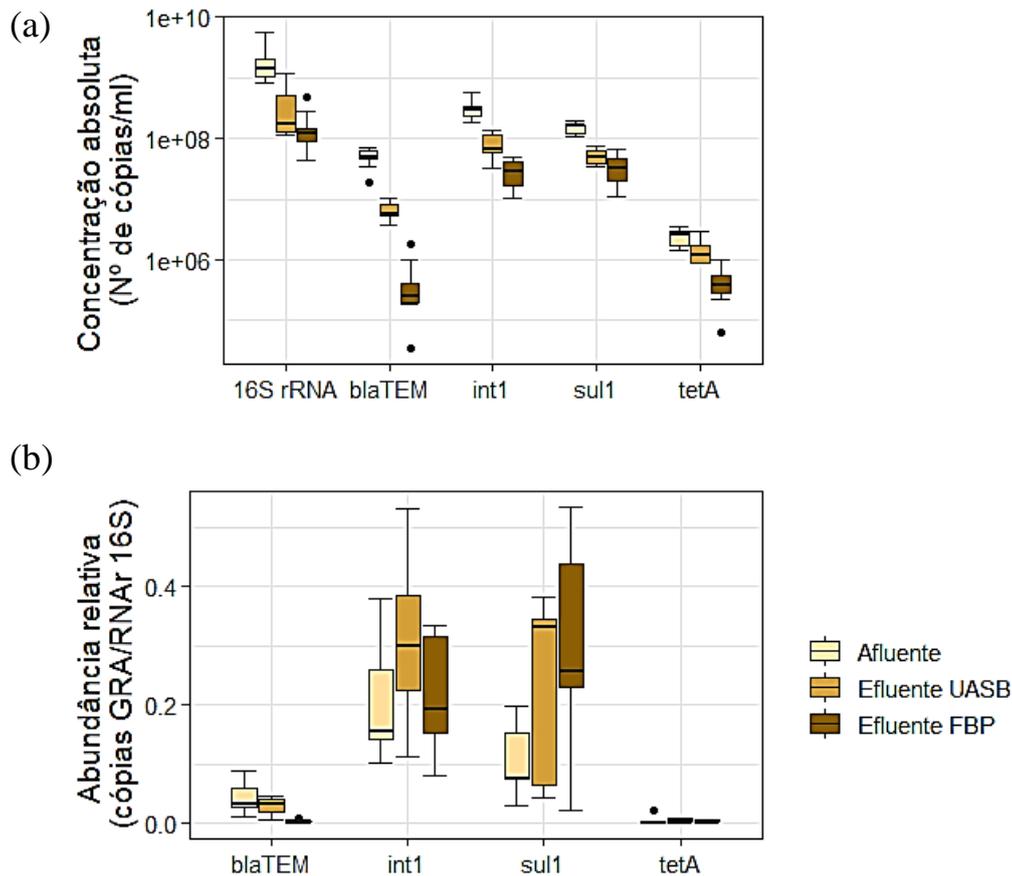


Figura 5.3 - Concentração dos genes (a) absolutas e (b) relativas afluentes e efluentes ao sistema UASB/FBP.

Salienta-se que houve diminuição significativa na concentração dos genes *sul1* e *tetA* (o que não ocorreu no reator UASB do sistema B). Esse fato pode indicar que as condições operacionais dos sistemas foram fatores relevantes na remoção dos GRAs, visto que os dois sistemas recebem o mesmo esgoto bruto. O fato de uma parcela do efluente das lagoas ser recirculado para o reator UASB do sistema B, pode ter contribuído para essas diferenças. Além disso, o período de coleta não foi o mesmo para os dois sistemas, e como mostrado na Tabela 4.2, as características do efluentes variaram de forma significativa nos dois períodos. Sendo assim, além das condições operacionais serem distintas, também houve diferença nas características do afluente.

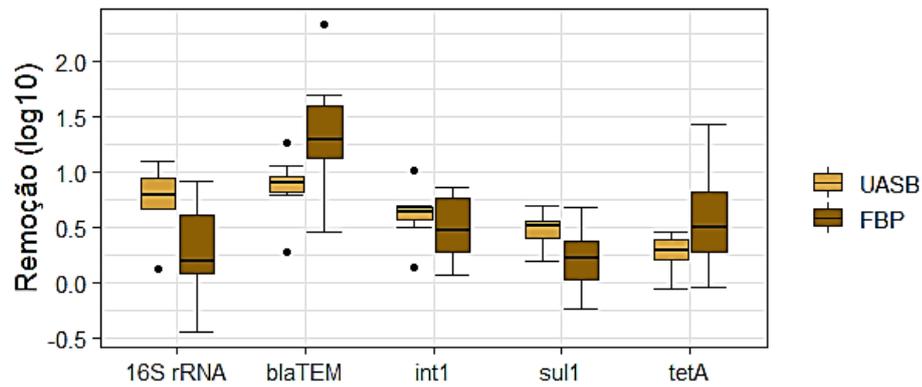


Figura 5.4 - Remoção em log dos genes nos componentes do sistema UASB/FBP.

Após passar pelo reator UASB, o esgoto seguia para um filtro biológico percolador. Esse componente do sistema removeu em mediana, 0,20 logs de *RNAr 16S*; 1,3 log do gene *blaTEM*, 0,47 log de *intI1*, 0,22 log de *sul1* e 0,5 log de *tetA* (Figura 5.4). Apenas a remoção dos genes *blaTEM*, *intI1* e *tetA* pelo FBP foi considerada significativa ($p < 0,05$). Chen e Zhang (2013) avaliaram o desempenho de um filtro biológico aerado precedido por duto de oxidação tratando esgoto doméstico. Eles encontraram remoção dos genes *RNAr 16S*, *intI1* e *sul1*, de respectivamente 2; 2,3 e 2,8 logs, valores maiores do que os encontrados no presente trabalho. Su *et al.* (2018) reportaram remoção de 0,47 log de *RNAr 16S*, 0,45 de *sul1* e 0,51 de *tetA* em um filtro de areia de uma estação de tratamento de tratamento de água. Filtros de areia são comumente utilizados em processos de tratamento de água para consumo humano e geralmente removem patógenos e sólidos suspensos por mecanismos físicos e biológicos (HASAN *et al.*, 2020). Sabe-se que vários fatores podem influenciar a dinâmica dos genes em filtros biológicos, por exemplo a relação volume/área superficial do material de preenchimento (MOLIN e TOLKER-NIELSEN, 2003).

Nota-se que o gene *RNAr 16S* não obteve remoção significativa após FBP (Figura 5.3a), do mesmo modo que ocorreu nas lagoas de alta taxa do sistema B, após outro reator UASB. No entanto, sabe-se que o sistema UASB seguido por biofiltro com espuma de poliuretano tem boa remoção de bactérias. Tandukar e Harada (2007) reportaram remoção de *E. coli* de 4 logs considerando todo o sistema, e 3 logs considerando apenas o biofiltro. Portanto, esse é um resultado não esperado, que pode ter ocorrido devido a mudança de uma comunidade anaeróbia para aeróbia mascarando a remoção dos *RNAr 16S* à medida que outros microrganismos

proliferam dentro do sistema. Salienta-se que mesmo sem remoção aparente do gene *RNAr 16S*, alguns genes foram removidos do sistema de forma significativa.

De forma geral, observou-se que o reator UASB contribuiu na remoção de todos os genes, já o FBP apenas removeu de forma significativa os genes *blaTEM*, *intII* e *tetA*. Contribuindo para o fato de que mudanças do sistema anaeróbio para o aeróbio modificam a comunidade microbiana e a dinâmica das GRAs, e podem aumentar a remoção de alguns genes nos sistemas de tratamento. Além disso, foi observado que cada gene se comporta de maneira diferente ao longo do processo de tratamento.

Analisando as concentrações relativas ao *RNAr 16S* (Figura 5.3b) é possível observar aumento significativo dos genes *intII* e *sulI* após reator UASB ($p < 0,05$). No entanto, já foi ressaltado que todos os genes, incluindo o *RNAr 16S* foram removidos de forma significativa por esse componente do sistema. Desse modo, pode ter ocorrido aumento dos genes *intII* e *sulI* associados a comunidade bacteriana total, após o reator UASB, apontando para um efeito seletivo do reator para os genes *sulI* e *intII*. A redução do *RNAr 16S* pode se dever ao bom funcionamento do reator UASB que promoveu a formação de grânulos para sedimentação. Os genes de resistência a tetraciclina e beta-lactâmicos não apresentaram diferença significativa em relação ao *RNAr 16S* antes e após reator UASB ($p > 0,05$). No entanto, houve diferença significativa na concentração absoluta desses GRAs, o que pode indicar persistência na resistência a esses antibióticos.

Já no filtro biológico percolador foi possível observar redução significativa nas concentrações dos genes *blaTEM* e *tetA* relativas ao *RNAr 16S* ($p < 0,05$, Figura 5.4). No entanto, como não houve redução significativa de *RNAr 16S* isso apenas aponta para as maiores remoções desses genes mesmo sem redução da comunidade bacteriana total.

5.2.2 Influência dos Parâmetros físico-químicos na remoção de GRAs no sistema UASB/FBP.

As Análises de correlação de *Spearman* e dos componentes principais (PCA) foram feitas utilizando apenas dados de DQO, pH e temperatura. Os dados de sólidos suspensos totais e voláteis não foram suficientes para as análises. Do mesmo modo que nos outros sistemas, aqui cada ponto de coleta foi analisado de forma separada.

No esgoto bruto foi possível encontrar correlação significativa entre o pH e os genes *RNAr 16S* ($r=-0,68$), *intII* ($r=-0,66$) e *blaTEM* ($r=-0,71$). O pH mais uma vez se mostrou um fator importante na concentração dos genes. A literatura apresenta uma faixa de pH que favorece o crescimento dos microrganismos no esgoto (4-9,5) (METCALF e EDDY, 1991), sendo assim, valores abaixo de 4 e acima de 9,5 não favorece a atividade da comunidade microbiana em geral. No entanto, destaca-se que o *blaTEM* se correlacionou positivamente com o pH no período dos sistemas B e C (agosto/2019 a janeiro/2020). Talvez exista uma faixa intermediária de pH onde bactérias que carregam o gene *blaTEM* estejam em menor número, no entanto essa hipótese precisaria ser testada. Lopes *et al.* (2018) reportaram que o *blaTEM* foi persistente em tratamentos alcalinos com pH acima de 12.

Salienta-se que no período de amostragem dos sistemas B e C as correlações encontradas foram muito diferentes, pois o pH não obteve correlação significativa com o *RNAr 16S* e com o *intII*. Além disso, a DQO foi correlacionada com o *blaTEM* naquele período. Esse fato sinaliza a complexidade de estudar a influência desses parâmetros numa matriz tão complexa como esgoto bruto “real”. A análise acaba por ser dificultada pelas diferentes características e interações que podem estar presente no efluente. Vários trabalhos que avaliam a influência de parâmetros ambientais na concentração ou remoção de genes no esgoto têm encontrado resultados diferentes, e chegar a uma conclusão sobre isso tem sido um verdadeiro desafio.

A análise dos componentes principais mostrou que os genes *blaTEM*, *RNAr 16S* e *intII* são correlacionados negativamente com o pH como as análises de *Spearman* mostraram (Figura 5.5a). Além disso, a DQO se mostrou influente sobre a concentração do *sull* e do *tetA*. No entanto, não mostrou relação com a comunidade bacteriana total (*RNAr 16S*), indicando que as bactérias que os carregam estiveram em baixa proporção na comunidade bacteriana. É possível também que o DNA esteja adsorvido em partículas orgânicas e até mesmo sedimentos no esgoto. (PIETRAMELLARA *et al.*, 2008).

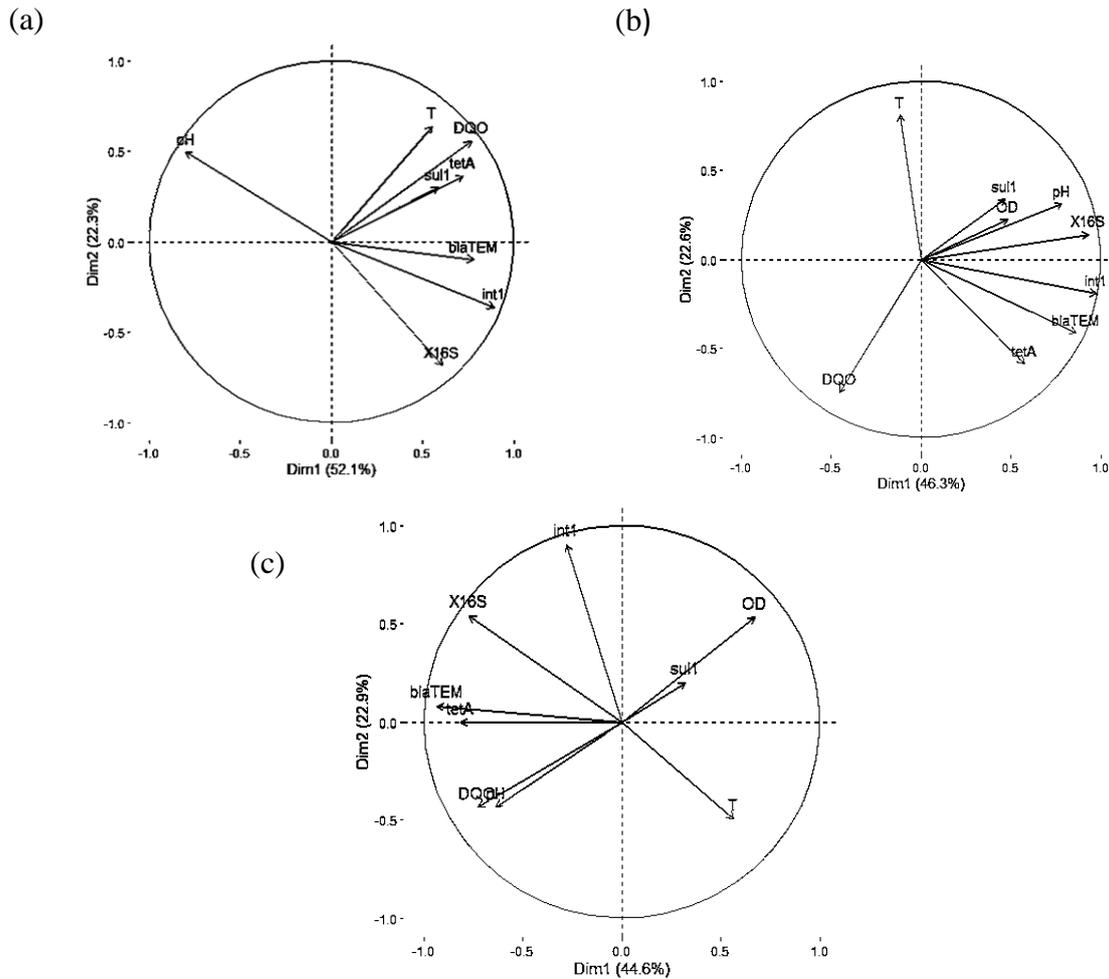


Figura 5.5 - Análise dos componentes principais no (a) esgoto bruto (b) efluente do reator UASB e (c) efluente do FBP do sistema A.

A análise de correlação de *Spearman* após o reator UASB mostrou correlação positiva e significativa ($p < 0,05$) entre o gene *intI1* e os genes *RNAr 16S* ($r = 0,85$), *blaTEM* ($r = 0,87$) e *tetA* ($r = 0,82$), e entre o *blaTEM* e o *RNAr 16S* ($r = 0,82$), indicando que esses GRAs (*tetA* e *blaTEM*) podem ter sido carregados nos cassetes de *intI1*, nos plasmídeos ou cromossomos bacterianos. O gene *tetA* é facilmente transmitido entre as bactérias por transposons e pequenos plasmídeos (JIANG *et al.*, 2013). Isso também pode ser observado na análise dos componentes principais (Figura 5.5b). Com relação aos parâmetros físico-químicos, o *pH* também mostrou influência nas concentrações dos genes no efluente do reator UASB, com correlação positiva e significativa com *RNAr 16S* (0,67) e *sul1* (0,67).

Salienta-se que apesar das diferenças encontradas nas correlações efluentes dos dois reatores UASB, os genes, *blaTEM* e *intI1* foram correlacionados significativamente nos dois sistemas.

As correlações de *Spearman* efluentes ao FBP mostraram correlação significativa ($p < 0,05$) entre o *tetA* e *blaTEM* ($r = 0,68$) e entre os genes *intI1* e *RNAr 16S* ($r = 0,65$). Destaca-se que nos três sistemas houve correlação significativa entre *tetA* e *blaTEM* após tratamento aeróbio. Tal correlação pode ser justificada através de bactérias que podem carregar ambos os genes ao mesmo tempo (ADEFISOYE e OKOH, 2016). A análise dos componentes principais (Figura 5.5c) não mostrou outros padrões de associação entre as variáveis, além dos revelados pelas correlações.

5.3 Sistema B (UASB-LAT).

5.3.1 Remoção dos genes

As concentrações absolutas afluente e efluente a cada componente do sistema UASB/LAT estão apresentadas na Figura 5.6a. Observa-se um aparente aumento na concentração dos genes *sull* e *tetA* após o reator UASB, no entanto, não foi considerado significativo ($p > 0,05$). YUAN *et al.* (2016) encontraram aumento de 0,4 e 3 log nas concentrações dos genes *tetA* e *sull*, respectivamente, após reator UASB, valores ainda maiores do que os encontrados no presente estudo (0,25 log para *sull* e 0,04 para *tetA*, Figura 5.7). Du *et al.* (2014), no entanto, encontraram redução de cerca de 0,83 log para o gene *sull* após reator UASB.

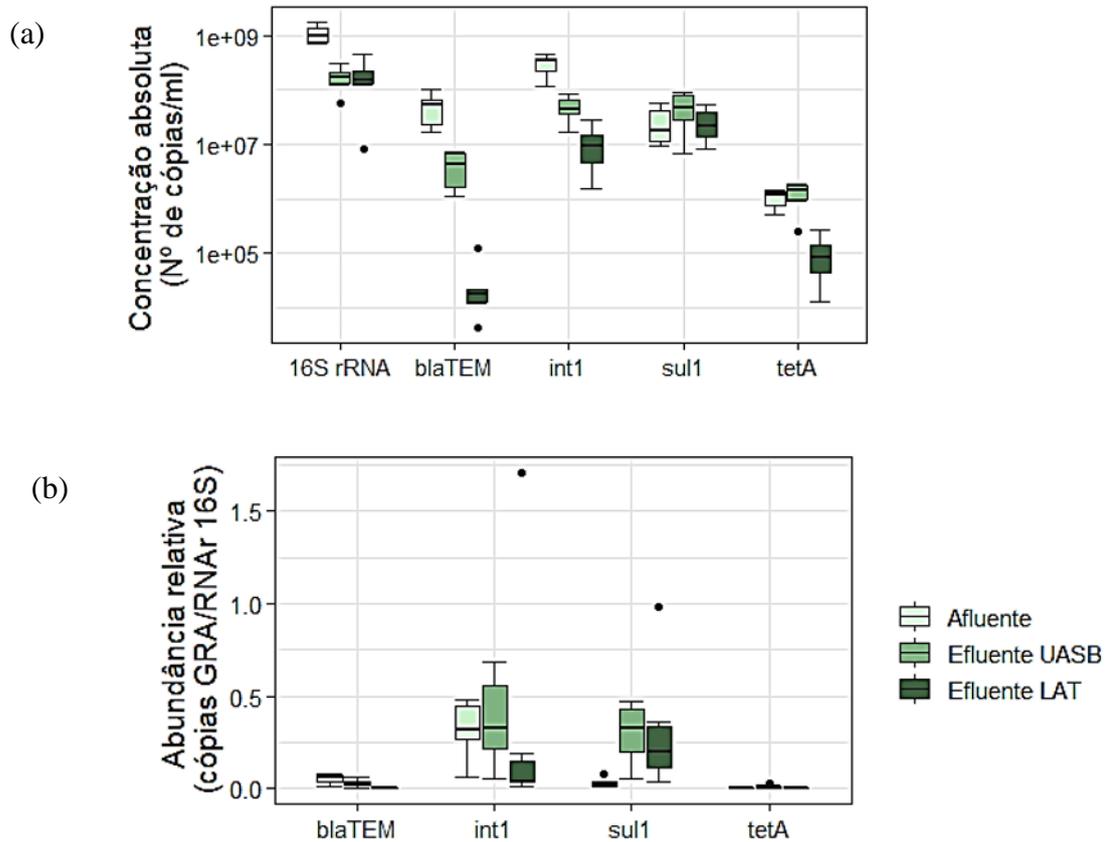


Figura 5.6 - Concentrações (a) absolutas e (b) relativas dos genes no sistema UASB/LAT.

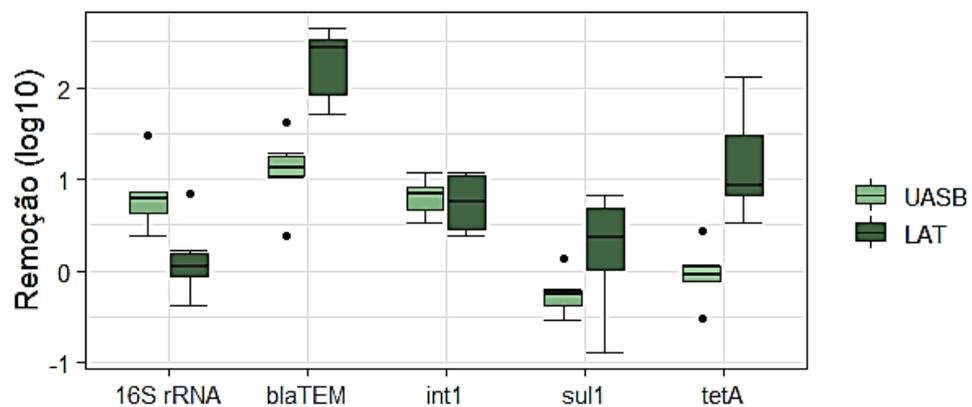


Figura 5.7 – Remoção de GRAs no Sistema UASB-LAT.

Houve diminuição significativa nas concentrações dos genes *RNAr 16S*, *int1I* e *blaTEM* ($p < 0,05$) de respectivamente, 0,8, 0,84 e 1,12 log (Figura 5.7). A literatura reporta valores semelhantes de remoção desses genes após reator UASB, sendo 0,9 log para o *RNAr 16S*, cerca de 1,01 log para o *int1I* e aproximadamente 0,5 log para o *blaTEM* (DU *et al.*, 2014; YANG *et al.*, 2019). Ademais, os genes *sul1* e *tetA* não foram removidos de forma significativa. Tao *et*

al. (2014) mostraram aumento do gene *tetA* (aproximadamente 0,3 a 1 log) após tratamento anaeróbio em quatro de seis sistemas de tratamento de esgotos provenientes de criação de suínos.

O gene *RNAr 16S* obteve remoção significativa no reator UASB provavelmente porquê as bactérias se unem formando aglomerados e sedimentam dentro do reator, e dessa maneira deixam o sistema na forma de lodo (CHERNICHARO, 2007). Com relação ao gene *blaTEM*, observou-se que este apresentou maior remoção no reator UASB em comparação com os demais, indicando que ele pode ter se associado aos aglomerados bacterianos para ser removido do sistema.

Para avaliar a relação dos genes com as bactérias, foram analisadas as concentrações relativas ao *RNAr 16S* (Figura 5.6b). Apenas o *sull* obteve diferença significativa nas concentrações relativas afluentes e efluentes, com aumento após reator UASB. Esse fato pode indicar o aumento do gene *sull* entre as bactérias presentes no esgoto após passagem pelo sistema. O *sull* também pode ser carregado por elementos tais como integron e transposon (CHOWDHURY *et al.*, 2019). As concentrações relativas dos demais genes não apresentaram diferenças significativas, indicando prevalência de resistência aos antibióticos tetraciclina e beta-lactâmicos após passagem pelo UASB, mesmo com decréscimo na concentração absoluta do gene *RNAr 16S* e desses GRAs, o que aponta para a permanência de bactérias resistentes a esses antibióticos no esgoto.

Após o reator UASB, o esgoto passava por duas lagoas de alta taxa operando em paralelo e um tanque de sedimentação. Esse sistema continuou a remover de forma significativa ($p < 0,05$) os genes *blaTEM* e *intI1* (Figura 5.6 a). É necessário notar que a junção dos componentes UASB e lagoas de alta taxa conseguiu remover cerca de 3,5 logs do gene *blaTEM* (Figura 5.7). Além disso, as LAT também conseguiram aumentar a eficiência de remoção do gene *tetA* (remoção de 0,93 log, Figura 5.7), que até o reator UASB não era significativa. Estudos têm apontado que a combinação dos tratamentos aeróbios e anaeróbios pode aumentar a eficiência de remoção de alguns GRAs (CHRISTGEN *et al.*, 2015; TAO *et al.*, 2014, CHEN e ZHANG, 2013). Pontua-se, no entanto, que apesar de remover alguns genes, a concentração efluente ao sistema ainda é significativa.

Após passar pelo reator UASB, a comunidade microbiana pode ter se modificado dentro das lagoas, já que é um sistema aeróbio que sofre maiores influências ambientais tais como a radiação solar, o pH, o oxigênio, a precipitação e a temperatura do ar. Esse fato pode ter contribuído para alterações na remoção dos genes de resistência. Além disso, a degradação de antibióticos pode ter ocorrido por outras vias, por exemplo, a foto-oxidação, que pode ter intensificado a remoção de antibióticos das classes da tetraciclina (GOMÉZ-PACHECO *et al.*, 2012). Engemann *et al.* (2006) também mostraram que a luz pode favorecer a diminuição de genes resistentes a tetraciclina. Além disso, as algas presentes nas lagoas também contribuem para remoção de contaminantes farmacêuticos através da bioadsorção, bioacumulação e biodegradação (XIONG *et al.*, 2018).

As concentrações dos genes *sull* e *RNAr 16S* não foram alteradas significativamente pelas lagoas de alta taxa, de acordo com o teste U de Wilcoxon. As lagoas de alta taxa, no entanto, tendem a remover bactérias de forma eficaz, em cerca de 2,13 log NMP/100ml de *E. coli* (YOUNG *et al.*, 2016) e por isso esse resultado não era esperado. No entanto, a mudança de uma comunidade anaeróbia para aeróbia pode aumentar a abundância de outras espécies bacterianas, como a bactérias oxidadoras de amônia, que são mais difíceis de carregar GRAs (Yi *et al.*, 2017). Salienta-se que a concentração do *RNAr 16S* também não foi significativamente alterada no FBP do sistema A (UASB-FBP).

Até aqui percebeu-se que o reator UASB removeu de forma significativa os genes *blaTEM*, *intI1* e *RNAr 16S*. E em relação ao *RNAr 16S*, apenas *sull* obteve concentrações significativamente diferentes do afluente para o efluente. Já as LAT removeram de forma significativa apenas o *blaTEM*, *intI1* e *tetA*, indicando mudança na comunidade microbiana de um sistema anaeróbio para um sistema aeróbio, e por consequência, mudança na dinâmica dos GRAs.

Ainda avaliando a remoção de genes pelas lagoas de alta taxa, as abundâncias relativas ao *RNAr 16S* mostraram que apenas o *blaTEM* e o *tetA* foram removidos significativamente ($p < 0,05$) pelas lagoas de alta taxa (Figura 5.6b). No entanto, como observado anteriormente, não houve remoção significativa do gene *RNAr 16S*, indicando apenas que esses dois genes obtiveram remoção muito maior que o marcador genético das bactérias totais.

5.3.2 Influência dos parâmetros físico-químicos na remoção de GRAs no sistema UASB/LAT.

Com o objetivo de avaliar a influência dos parâmetros físico-químicos obtidos no monitoramento de Vassalle *et al.* (2019) nas concentrações de GRAs, foram feitas análises de correlação de *Spearman* e análises dos componentes principais nos pontos efluentes a cada componente do sistema.

No efluente do reator UASB houve correlação positiva e significativa entre o *blaTEM* e o *intII* ($r = 0,94$, $p < 0,05$), apontando para a possibilidade de que esses elementos podem ter passado a carregar genes que codificam *beta-lactamases* após passar pelo reator UASB. Integrons de classe 1 que carregam *blaTEM* já foram reportados na literatura (RIBEIRO *et al.*, 2011). O *tetA*, que no afluente obteve correlação positiva com o *intII* (ver seção anterior 5.2.2), após o reator UASB passou a ter correlação negativa e significativa com o *RNAr 16S* ($r = -0,89$). Essa correlação pode indicar a pequena proporção de bactérias que carregam *tetA* em comparação com a comunidade bacteriana total.

A análise dos componentes principais do efluente ao reator UASB (Figura 5.8a) confirmou que o *intII* se correlacionou com o *blaTEM*, como mostrado na análise de *Spearman*. O gene *sull* teve maior relação com as concentrações de DQO, e *RNAr 16S*. Guo *et al.* (2017) encontraram, em um reator sequencial em batelada, correlação positiva entre a DQO e abundância de genes *sull*, isso porquê ela afeta o crescimento das bactérias e limita a transferência desse gene. Percebe-se então, que a relação dos genes com os elementos genéticos *RNAr 16S* e *intII*, bem como com os parâmetros físico-químicos são modificados a cada vez que se passa por um componente do sistema. Dessa forma, os sistemas de tratamento de esgoto fornecem ambientes que favorecem a troca de material genético, e a medida em que as características físico-químicas do efluente vão se modificando, a dinâmica dos genes também se modifica.

Ao avaliar o efluente das lagoas, a análise de *Spearman* mostrou correlação significativa entre o *tetA* e o *blaTEM* ($r=0,54$, $p<0,05$), e entre o *sulI* e o pH ($r=0,6$, $p<0,5$). No efluente das wetlands também foi observada correlação entre *tetA* e *blaTEM*, e já foi mencionado anteriormente que bactérias podem carregar os dois genes concomitantemente (ADEFISOYE e OKOH, 2016). Através da análise dos componentes principais (Figura 5.8b) percebe-se que as concentrações dos GRAs avaliados (*tetA*, *blaTEM* e *sulI*) se relacionaram positivamente com o *intI1*. Além disso, os parâmetros físico-químicos parecem não obter efeito significativo na concentração dos GRAs (com exceção do pH), bem como o *RNAr 16S*.

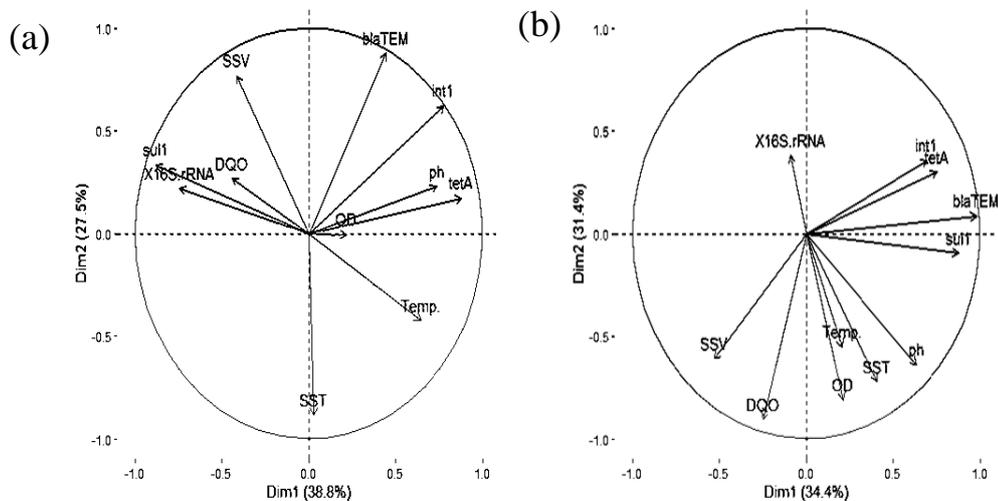


Figura 5.8 - Análise dos componentes principais (a) Efluente ao reator UASB e (b) Efluente às LAT.

5.4 Sistema C (Wetlands Construídas).

5.4.1 Remoção dos genes.

A Figura 5.9a apresenta as concentrações absolutas dos genes nos pontos afluente e efluente às wetlands. Observa-se que o *blaTEM* foi o gene que obteve maior remoção nesse sistema, seguido por *intI*, *RNAr 16S* e *tetA*. No entanto, apenas os genes *blaTEM*, *RNAr 16S* e *intI* foram removidos de forma significativa ($p < 0,05$) em respectivamente, 0,94; 0,45 e 0,66 log (Figura 5.9; Tabela B4, APÊNDICE B). Ávila *et al.* (2021) encontraram remoções de cerca de 0,54 e 0,3 log para o *blaTEM* e *RNAr 16S*, respectivamente em um sistema com duas wetlands de fluxo vertical operando em paralelo (Tabela 5.2). Além disso, remoções entre 0,1 e 1,7 log têm sido reportadas para o gene *intI* nesse tipo de sistema. A partir da Tabela 5.2 e da Figura 5.10 observa-se que os valores de remoção encontrados nesse estudo não se distanciam daqueles reportados na literatura.

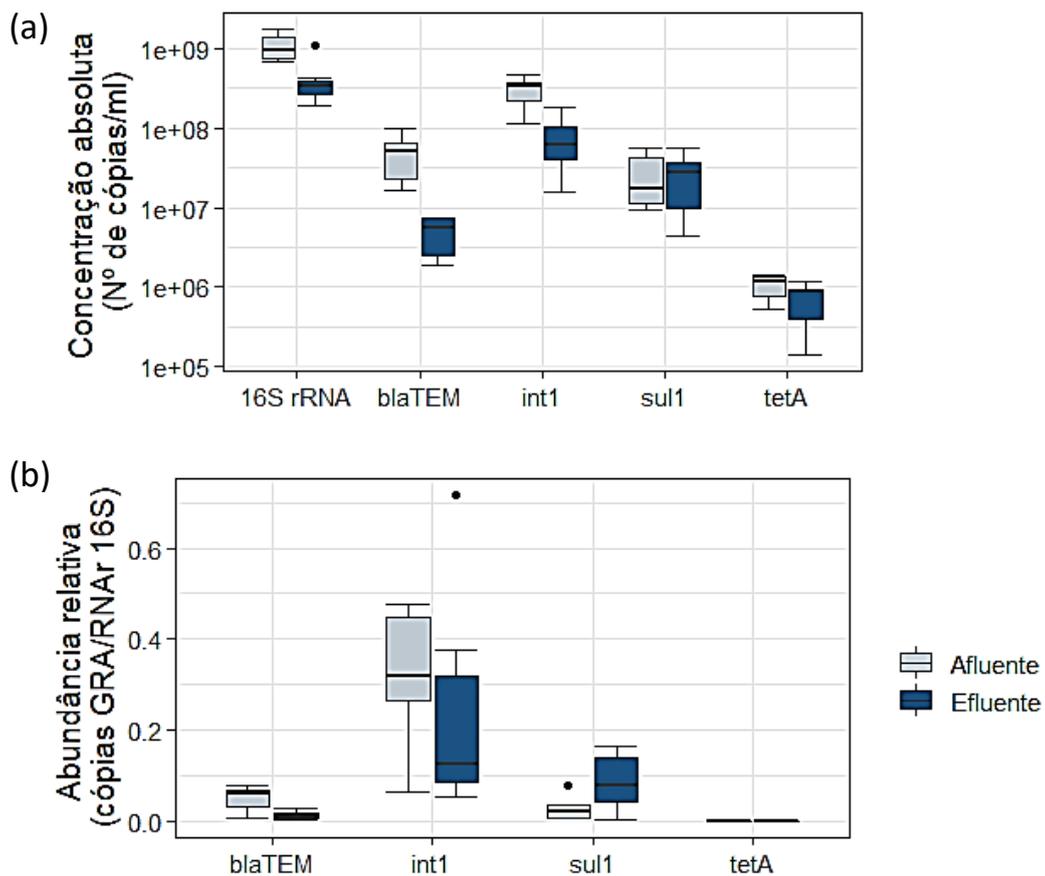


Figura 5.9 - Concentrações absolutas (a) e relativas (b) dos genes afluentes e efluentes às wetlands.

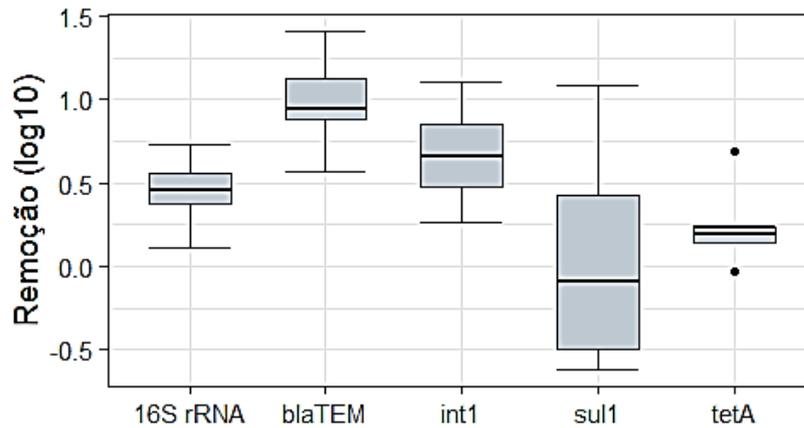


Figura 5.10 - Remoção em log dos genes quantificados pelo sistema wetland.

Tabela 5.2 – Concentrações afluentes e efluentes dos genes investigados reportadas na literatura, em sistemas de wetlands.

Sistema	Gene	Concentração afluente (cópias/ml)	Concentração efluente (cópias/ml)	Remoção absoluta (log)	Tipo de efluente	Referência
Tanque séptico, seguido por 6 wetlands verticais paralelas e 21 wetlands horizontais (3 delas foram avaliadas)	<i>RNAr 16S</i>	10^6	10^7	-0,4*	Efluente de área rural. (Após 26 dias de operação)	NÕLVAK <i>et al.</i> , 2013
	<i>tetA</i>	10^4	10^4	0,03*		
	<i>SulI</i>	10^3	10^4	-0,3*		
wetland construída de fluxo horizontal (w1)	<i>RNAr 16S</i>	$1,2 \times 10^9$ *	6×10^8 *	0,3*	Efluente doméstico	CHEN <i>et al.</i> , 2016
	<i>sulI</i>	$5,5 \times 10^8$ *	$2,5 \times 10^8$ *	0,34*		
wetland construída precedida por valo de oxidação.	<i>sulI</i>	10^5	10^4	1,25	Efluente doméstico	CHEN E ZHANG., 2013
	<i>intII</i>	10^6	10^5	1,7		
Tanque séptico Imhoff seguido por wetlands verticais plantadas com <i>Phragmites australis</i>	<i>RNAr 16S</i>	10^8	$8,5 \times 10^7$	0,3	Efluente doméstico	ÁVILA <i>et al.</i> , 2021
	<i>intII</i>	$3,12 \times 10^6$	$2,46 \times 10^6$	0,1		
	<i>sulI</i>	$4,25 \times 10^6$	$1,7 \times 10^6$	0,4		
	<i>blaTEM</i>	$2,82 \times 10^6$	$8,2 \times 10^5$	0,54		

Sistema	Gene	Concentração afluente (cópias/ml)	Concentração efluente (cópias/ml)	Remoção absoluta (log)	Tipo de efluente	Referência
Wetland Construídas de fluxo vertical (Sistema Francês)	<i>RNAr 16S</i>	1,09E+09	4,31E+08	0,40	Efluente doméstico	Presente Estudo
	<i>blaTEM</i>	5,13E+07	5,07E+06	1,01		
	<i>IntI1</i>	3,03E+08	7,94E+07	0,58		
	<i>SulI</i>	2,72E+07	2,70E+07	0,00		
	<i>tetA</i>	1,06E+06	7,19E+05	0,17		

*Valores aproximados com base nas informações fornecidas pelos autores

A maior remoção do *blaTEM* pode ser devida à remoção das bactérias que carregavam esse gene através de retenção no biofilme. Santos *et al.* (2020) avaliaram a remoção de *P. aeruginosa* em uma wetland construída de fluxo vertical e reportaram uma remoção de cerca de 3,7 logs, indicando que esses organismos ficam bastante retidos no biofilme do sistema. A adsorção e a biodegradação no substrato foram relatadas como dois mecanismos importantes para a remoção de GRAs (Liu *et al.*, 2013).

Os genes *RNAr 16S* e *intI* foram removidos também pela provável retenção da carga de microrganismos, característica de wetlands pelos mecanismos de sedimentação, predação e extinção (GREEN *et al.*, 1997). O *intI1* está presente no DNA plasmidial ou cromossômico das bactérias (GILLINGS *et al.*, 2015). Huang *et al.* (2017) observaram redução na concentração de GRAs em uma wetland construída devido a retenção das bactérias que os continham na superfície do sedimento.

Pontua-se que em geral, nos três sistemas as remoções de GRAs foram muito pequenas, considerando que ainda é bastante expressiva a concentração efluente desses elementos.

No sistema wetland foi possível perceber um ligeiro aumento na concentração do gene *sulI* do afluente para o efluente, no entanto, não foi significativo ($p > 0,05$, Tabela C1, APÊNDICE C). Nolvák *et al.* (2013), também reportaram aumento desse gene em uma wetland de fluxo horizontal em escala de mesocosmo, após 150 dias de operação, em cerca de 0,3 logs. O gene *sulI* já foi correlacionado positivamente com a concentração de antibióticos sulfonamidas (GAO *et al.*, 2012; GUO *et al.*, 2017). Algumas propriedades físicas desse tipo de antibiótico, como o baixo coeficiente de distribuição, podem promover melhor afinidade com a solução aquosa do esgoto, diminuindo o efeito da adsorção pelo sedimento (GUAN *et al.*, 2017). Esse coeficiente indica a afinidade do composto com meio aquoso. Ávila *et al.* (2021) também não

encontraram mudança significativa na concentração de *sulI* no esgoto, após passagem por uma wetland construída de fluxo vertical. Ressalta-se que em caso de utilização do gene *intI1* como marcador representativo dos GRAs, o comportamento do *sulI* não seria representado.

Nõlvak *et al.* (2013) encontraram remoção de cerca de 0,03 log do *tetA*, semelhante ao presente trabalho, apesar das wetlands de fluxo horizontal avaliadas no trabalho de Nõlvak *et al.* (2013) passarem por um pré-tratamento com wetlands de fluxo vertical.

Como observado anteriormente no sistema B, Os genes *sulI* e *tetA* não foram removidos de forma significativa, o que indica maior dificuldade de remoção desses GRAs tanto em sistemas aeróbios quanto anaeróbios. Tal fato aponta para persistência de genes de resistência a tetraciclina e sulfonamida em sistemas biológicos de tratamento de esgoto, que possui intenso contato entre as bactérias e elementos genéticos móveis. Como esses genes estão presentes em DNA plasmidial e cromossômico dentro de células bacterianas, isso indica a permanência de bactérias resistentes a tetraciclina e sulfonamidas no esgoto (ASHBOLT *et al.*, SZCZEPANOWSKI *et al.*, 2009).

As concentrações relativas ao gene *RNAr 16S* são utilizadas em alguns trabalhos para avaliar a concentração dos genes em relação a comunidade bacteriana total. Assim, a Figura 5.9b mostra as concentrações dos genes normalizadas em relação ao marcador genético das bactérias. Percebe-se que o *blaTEM* possui remoção significativa pelo sistema wetland ($p < 0,05$), indicando que esse gene foi removido em consonância com o gene *RNAr 16S*, contribuindo para o fato de que a remoção foi devido a redução da concentração de bactérias que o carregavam. Para os GRAs restantes e para o *intI1*, não houve diminuição ou aumento significativo na abundância relativa ($p > 0,05$). Esse resultado evidencia a prevalência desses genes após passagem pelas wetlands, mesmo com decréscimo na concentração absoluta do gene *RNAr 16S*, que representa a comunidade microbiana total. Isso indica que as bactérias que possuíam esses genes tenham permanecido na mesma proporção em relação a comunidade bacteriana total, após a passagem pelas wetlands.

De forma geral, percebe-se com os resultados supracitados que as wetlands tiveram um desempenho semelhante ao reportado pela literatura. Além disso, nem todos os genes avaliados foram removidos de forma significativa. Os genes *tetA* e *sulI*, que codificam transportadores com função de bomba de efluxo, foram mais prevalentes no tratamento das wetlands. Observou-

se também maiores remoções do gene *blaTEM*, seguidos do *intII* e *RNAr 16S*. Além disso, as concentrações relativas mostraram que a remoção das bactérias teve influência na remoção do *blaTEM*, mas não afetou de forma significativa a redução do *intII*. Além disso, a redução da concentração relativa de GRAs, incluindo o *blaTEM*, após tratamento convencional de efluente já foi observada em trabalhos anteriores (TAO *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2013).

As concentrações dos antibióticos no sistema também podem ter apresentado um papel importante na dinâmica dos GRAs nesse sistema. Já foram encontradas correlações positivas e significativas entre a concentração de tetraciclinas e genes *tet* no solo de wetlands (HUANG *et al.*, 2015). Além disso, mecanismos como sorção e biodegradação já foram apontados como importantes para a remoção de antibióticos em wetlands (LIU *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2016).

5.4.2 Influência dos parâmetros físico-químicos na dinâmica dos GRAs nas wetlands.

Para investigar a influência dos parâmetros físico-químicos analisados na remoção dos genes, foram feitas análises de correlação de *Spearman* entre sua concentração e os valores de DQO, OD, temperatura, pH, SST e SSV nos pontos afluentes e efluentes ao sistema wetlands.

No afluente foram encontradas correlações positivas e significativas ($p < 0,05$) entre o gene *blaTEM* e o pH ($r = 0,89$), e também entre esse gene e a DQO ($r = 0,71$). A matéria orgânica, medida indiretamente pela DQO, e o pH são parâmetros que afetam o crescimento e a sobrevivência das bactérias (MANAIA *et al.*, 2018). O primeiro se trata do substrato dos microrganismos, e o segundo é um parâmetro que influencia diretamente na composição microbiana do meio. Dessa maneira, tais correlações sugerem associação entre a remoção de DQO e o pH do sistema e a remoção das bactérias resistentes a antibióticos da classe dos beta-lactâmicos. Novo *et al.* (2013) mostraram que a concentração de DQO no esgoto bruto e tratado afetou a composição microbiana do meio. Através da análise de componentes principais, esses autores observaram que a DQO afetava a presença de *Epsilonproteobacteria* (com correlações negativas) e *Gammaproteobacteria* (com correlações positivas). Breazeal *et al.* (2013) encontraram correlação significativa ($r = 0,68$ e $p < 0,01$) entre o gene *blaTEM* e os componentes coloidais de carbono orgânico total presentes em esgoto tratado (tratamentos convencionais seguido por várias filtrações em membranas consecutivas). Tais fatos indicam que a concentração do gene *blaTEM* pode ter relação com a matéria orgânica presente no meio.

Além das correlações supracitadas, também pôde ser observada correlação positiva entre *tetA* e *intI1* no esgoto bruto ($r = 0,94$, $p < 0,05$), indicando que o *tetA* pode ter sido carregado por esse elemento. Esse resultado é compatível com o observado por Zhang *et al.* (2019), que avaliou alguns GRAs e *intI1* em isolados de *Salmonella* spp. em diferentes estágios do tratamento de esgoto (Anaeróbio/Anóxico/óxico). Eles encontraram correlação significativa ($p < 0,01$, coeficiente de Pearson $r = 0,95$) entre a presença de *intI1* e *tetA*. Huang *et al.* (2015) sugeriram que o gene *intI1* pode ser importante para a transferência de genes de bombas de efluxo resistentes a tetraciclinas. Salienta-se, no entanto, que mesmo o *intI1* sendo removido de forma estatisticamente significativa pelas wetlands do presente estudo, o mesmo não ocorreu com o *tetA*.

A análise das componentes principais do afluente (Figura 5.5a) mostrou que parâmetros como OD, DQO e pH obtiveram mais relação com as concentrações dos genes que os sólidos suspensos totais e voláteis. Os sólidos suspensos voláteis são uma medida da fração orgânica da biomassa, e por isso esperava-se obter relação positiva entre a concentração de *RNAr 16S* e esse parâmetro. No entanto, isso não foi observado.

Destaca-se que o gene *RNAr 16S* não obteve expressão significativa na análise PCA das

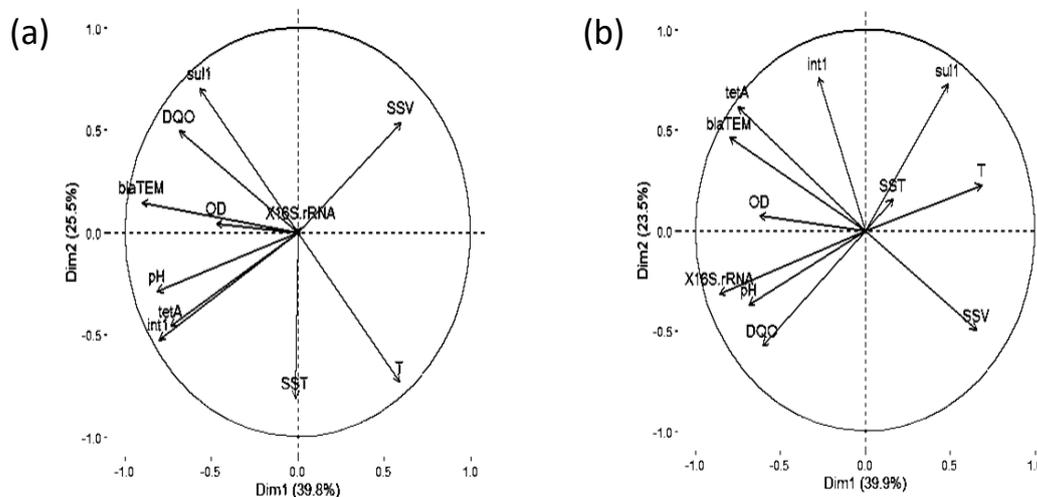


Figura 5.11 - Análise dos componentes principais nos pontos (a) Afluente e (b) Efluente às wetlands. Os parâmetros utilizados foram sólidos suspensos voláteis (SSV) e totais (SST), temperatura (T), Demanda química de oxigênio (DQO), oxigênio dissolvido (OD) e pH

concentrações afluentes (Figura 5.11a) com pesos de 0,08 e 0,011 nas dimensões 1 e 2, indicando menor participação na variabilidade dos dados no afluente. No entanto, esse é um resultado inesperado, uma vez que esse gene é carregado pelas bactérias, representadas por esse

marcador genético. Destaca-se também a proximidade dos genes *intI1* e gene *tetA*, conforme visto na análise de correlação, indicando que esse GRA pode ter sido carregado nos cassetes de genes do *intI1*, como observado anteriormente por Zhang *et al.* (2019).

Avaliando o efluente das wetlands foi possível observar correlação significativa e positiva ($r = 1$, $p < 0,05$) entre as concentrações dos genes *blaTEM* e *tetA*, provavelmente porque bactérias poderiam estar carregando ambos os genes ao mesmo tempo. Isolados de *E.coli* presentes em efluentes de estações de tratamento de esgoto já mostraram a capacidade de múltipla resistência a antibióticos beta-lactâmicos e tetraciclina (ADEFISOYE e OKOH, 2016).

A partir da análise dos componentes principais no efluente do sistema (Figura 5.11b) percebe-se que pH, DQO e OD foram os parâmetros que mais se relacionaram com as concentrações dos genes no efluente. Nota-se que a DQO e o pH parecem estar relacionados com a concentração do marcador *RNAr 16S*. Observa-se também que o *intI1* se distancia do *tetA*, e se aproxima do *sul1*. O gene *sul1* é comumente associado ao *intI1* (WEI *et al.*, 2018) por estar localizado no segmento 3' dos integrons de classe 1. Por fim, percebe-se que a temperatura parece afetar negativamente a concentração dos genes, uma vez que a temperatura afeta diretamente a composição microbiana (MANAIA *et al.*, 2018).

Em geral, parâmetros como DQO, pH e OD obtiveram maior correlação com a concentração dos genes no esgoto, influenciando a dinâmica microbiana e conseqüentemente os genes presentes no meio. As relações observadas no afluente e efluente apontam para a importância da análise do *intI1*, a fim de entender seu papel na disseminação dos GRAs. Pontua-se ainda que a amplitude de temperatura no esgoto bruto e tratado não é significativa (máxima de 7,79°C e mínima de 7,04°C), o que pode justificar a pequena influência desse parâmetro.

5.4.3 Análise comparativa entre sistemas em escala plena e em escala piloto.

Freitas (2020) realizou em seu trabalho a avaliação da remoção de alguns genes em uma ETE em escala plena da região metropolitana de Belo Horizonte. O sistema é formado por tratamento preliminar com gradeamento, caixa de areia e medidor de vazão, seguido por reator UASB, filtro biológico percolador com meio suporte de brita e decantador. Com exceção do decantador, o sistema é composto pelos mesmos componentes do sistema A (UASB/FBP), avaliado no presente trabalho. Além disso, ambos os sistemas estão localizados na região

metropolitana de Belo Horizonte. Desse modo, propõe-se nessa seção comparar o desempenho desses dois sistemas na remoção de genes.

Freitas (2020) quantificou os genes em dois pontos de amostragem do sistema: o esgoto bruto após tratamento preliminar (AF) e o efluente do decantador secundário (EF). Seus resultados estão sumarizados na Tabela 5.3, junto com os resultados encontrados no presente trabalho. Destaca-se que o efluente final (EF) do sistema em escala piloto apresentado na Tabela 5.3 é referente ao efluente do filtro biológico percolador.

Tabela 5.3 - Comparação entre os resultados obtidos por Freitas, 2020 e o presente trabalho.

Gene	Ponto de coleta	UASB/FBP (escala plena)			UASB/FBP (escala piloto)		
		n	Concentração absoluta (N° cópias/ml)	remoção (log)	n	Concentração absoluta (N° cópias/ml)	remoção (log)
RNAr 16S	AF	6	8,73E+08	0,45	9	1,44E+09	0,99
	EF	6	3,11E+08*		9	1,21E+08**	
<i>intI1</i>	AF	6	1,09E+08	0,49	9	3E+08	1,11
	EF	6	3,53E+07*		9	2,8E+07**	
<i>sul1</i>	AF	6	3,85E+08	0,40	9	1,59E+08	0,74
	EF	6	1,52E+08*		9	3,18E+07**	
<i>tetA</i>	AF	6	4,89E+06	0,73	9	2,6E+06	0,78
	EF	6	9,09E+05*		9	3,93E+05**	
<i>blaTEM</i>	AF	6	2,91E+07	1,15	9	4,93E+07	2,20
	EF	6	2,06E+06*		9	2,53E+05**	

*Efluente do decantador secundário

**Efluente do filtro biológico percolador

Nota-se que apesar do sistema em escala plena possuir um decantador após o filtro biológico percolador, a remoção de todos os genes foi maior no sistema em escala piloto. Houve diferença maior que 0,5 log para os genes *RNAr 16S* e *intI1*. Já para o *sul1* e o *tetA* as diferenças foram menores (Tabela 5.3). Para o *blaTEM*, houve diferença de cerca de 1 log de remoção em comparação com o estudo de Freitas (2020). Salienta-se que o *blaTEM* também foi o mais removido no sistema em escala plena, e o *sul1* obteve menor remoção em ambos os sistemas.

Em geral, sabe-se que sistemas em escala piloto ou de bancada para fins de pesquisa são mais fáceis de monitorar. No sistema avaliado por Freitas (2020), por exemplo, o descarte de lodo não era realizado com a frequência necessária, uma vez que não era feito o acompanhamento dos sólidos do lodo. Desse modo, a qualidade do efluente por vezes poderia ser comprometida, à medida que os sólidos poderiam passar para o compartimento de decantação do reator UASB.

Além disso, as condições operacionais e o meio suporte dos dois sistemas eram diferentes. Parâmetros operacionais como tempo de detenção hidráulica, idade do lodo e vazão de entrada podem interferir no contato entre os microrganismos dentro do sistema de tratamento. No entanto, atenta-se para o fato de que, com exceção do *blaTEM*, a diferença de remoção dos genes foi muito pequena.

5.5 Remoção de GRAs no Fotorreator

O fotorreator com lâmpadas UV foi instalado após o filtro biológico percolador do sistema A para avaliar a desinfecção deste efluente. Os genes *blaTEM*, *int11*, *tetA*, *sul1* e *RNAr 16S* foram quantificados antes e após a passagem do efluente pelo fotorreator.

Para avaliar os resultados da quantificação dos genes, as doses de UV foram agrupadas em três faixas: A (3- 15 mJ/cm²), B (20-80 mJ/cm²) e C (100-160 mJ/cm²). A Figura 5.12 mostra as concentrações afluentes e efluentes ao fotorreator nas diferentes faixas adotadas. Esses valores



Figura 5.12 - Concentrações absolutas afluentes e efluentes ao fotorreator em três faixas de dose UV: A (3- 15 mJ/cm²), B (20-80 mJ/cm²) e C (100-160 mJ/cm²).

também podem ser observados na Tabela B3, do APÊNDICE B. De modo geral, é perceptível que houve redução na concentração dos genes, mesmo que pequena, após a passagem do efluente pelo fotorreator.

Observando a Faixa A, percebe-se que os genes *intI1* e *sulI* apresentaram maior remoção ($p < 0,05$), com sua concentração reduzida de $3,02E+07$ para $8E+06$ no caso do *intI1* e $2,49E+07$ e $1,2E+07$, no caso do *sulI*.

Na Faixa B, o *intI1* também foi o mais removido ($4,9E+07$ cópias/ml afluente e $7,23E+06$ cópias/ml no efluente), seguido pelo *RNAr 16S* com concentração afluente de $2,28E+08$ cópias/ml e efluente de $6E+07$ cópias/ml, e pelo *sulI*, com respectivamente $4,3E+07$ e $1,05E+7$ cópias/ml, todos com remoções significativas ($P < 0,05$).

Na faixa C ocorreu maior remoção dos genes *tetA* ($1,52E+05$ cópias/ml afluente e $1,91E+04$ cópias/ml efluente) e *blaTEM* ($3,01E+04$ cópias/ml afluente e $2,96E+03$ cópias/ml no efluente), mas com variação considerável dos dados. Para essa faixa, os resultados dos testes estatísticos não foram conclusivos, devido a quantidade de dados obtidos nas maiores doses de UV.

Desse modo, os genes *intI1* e *sulI* foram os mais suscetíveis à radiação UV nas faixas mais baixas. Já nas faixas mais altas, houve maior remoção dos genes *tetA* e *blaTEM*. Como visto na seção anterior, esses dois genes foram os mais removidos pelo filtro biológico percolador que antecede o fotorreator e também possuem as menores concentrações relativas ao *RNAr 16S* (Figura 5.12b). Sabe-se que a suscetibilidade dos genes de resistência a esse tipo de desinfecção pode estar diretamente relacionada com a maneira que o mesmo se encontra no efluente, livre ou em bactérias e até mesmo com o tipo de bactéria (gram-negativas ou gram-positivas) em que o gene se encontra (MCKINNEY e PRUDEN, 2012).

A remoção do gene *RNAr 16S* decresceu com o aumento das doses de UV da faixa B para a faixa C. Zheng *et al.* (2017) mostraram que houve decréscimo na concentração de bactérias resistentes com o aumento da dose aplicada de 10mj/cm^2 a 160mj/cm^2 . No entanto, essa tendência não foi observada no presente estudo. Percebe-se que o gene *RNAr 16S* não foi removido nas maiores doses aplicadas, isso pode indicar reativação das bactérias após a coleta das amostras, e por isso os genes *intI1* e *sulI* também não obtiveram maiores remoções nas últimas fluências. Enquanto que os genes com menores concentrações relativas (*blaTEM* e *tetA*) foram os mais inativados nessas doses. Huang *et al.* (2016) reportaram reativação de bactérias 22 horas após desinfecção do efluente com UV, numa dose de 20mj/cm^2 . Ressalta-se, que a reativação das bactérias depende das capacidade da célula de recuperar os danos provocados pelo UV (NARCISO-DA-ROCHA *et al.*, 2018).

A Tabela 5.4 apresenta alguns resultados reportados na literatura de remoção de genes através de fotorreator UV. Para uma dosagem de 160mj/cm², Zheng *et al.* (2017) encontraram remoção dos genes *tetA*, *RNAr 16S* e *intI1* de respectivamente 0,7; 0,65 e 0,9 log. Em comparação com os valores encontrados nesse estudo na faixa C (0,9; 0,27 e 0,45 log), percebe-se proximidade entre os resultados dos dois trabalhos. Para o gene *sull*, Zheng *et al.* (2017) reportaram remoção de 0,63 utilizando a mesma dose de radiação, valores próximos do encontrado no presente estudo (0,61 log, faixa C).

Tabela 5.4 - Remoção em log de genes por fotorreator com lâmpadas emersas UV encontrados na literatura e no presente trabalho.

Sistema	Faixa dosagem (mj/cm ²)	Remoção (log)					Referencia
		<i>Sull</i>	<i>IntI1</i>	<i>RNAr 16S</i>	<i>TetA</i>	<i>blaTEM</i>	
Lodos ativados + desinfecção com UV	62,4	0,1	0,15	0,4	ND	ND	ZHANG <i>et al.</i> , 2015.
	124,8	0,2	0,25	0,45	ND	ND	
	249,5	0,4	0,4	0,6	ND	ND	
Clarificador primário + tanque Anaeróbio/Anóxico/óxico, clarificador secundário + desinfecção com UV.	40	0,031	0,18	0,19	0,1	ND	ZHENG <i>et al.</i> , 2017.
	160	0,63	0,9	0,65	0,7	ND	
Efluente sintético + desinfecção UV com fotorreator em escala de bancada	ND	ND	ND	ND	0,3	0,5	DESTIANI e TEMPTON, 2019.
	ND	ND	ND	ND	0,3	0,6	
	ND	ND	ND	ND	0,5	1	
UASB + filtro biológico percolador + desinfecção com UV	3 a 15 (A)	1,3	0,57	0,39	0,28	0,48	Presente estudo.
	20 a 80 (B)	0,61	0,83	0,56	0,63	0,016	
	100 a 160 (C)	0,61	0,45	0,27	0,9	1	

ND – Dado não disponível

Remoções de 0,25 e 0,5 log para o *sull* e *blaTEM* já foram reportadas pela literatura em 60mj/cm² (DESTIANI e TEMPTON, 2019).

As remoções encontradas na faixa A do presente trabalho foram parecidas com as reportadas por Destiani e Tempeton (2019): cerca de 0,48 log para o *blaTEM* e 1,3 para o *sull* (Tabela 5.4). No geral, a maioria das remoções resultantes do presente estudo ficaram abaixo de 1 log, assim como os valores reportados pela literatura.

Apesar dos resultados de remoção dos genes após passagem do efluente pelo fotorreator não se distanciar dos valores reportados pela literatura, o comportamento do fotorreator avaliado no presente estudo não foi o esperado. Esse sistema não mostrou uma tendência de aumento da remoção nas maiores doses, com exceção do *tetA*. Muitos autores indicam relação direta entre os tempos de contato ou fluência e a remoção de GRAs (McKINNEY e PRUDEN, 2012; ZHENG *et al.*, 2017).

5.6 Análise comparativa da remoção dos genes avaliados nos sistemas A, B e C.

A Figura 5.13 apresenta as remoções de cada gene quantificado nos três sistemas. O teste de hipóteses de Kruskal Wallis mostrou que houve diferença significativa entre a remoção de todos os genes ($p < 0,05$, Tabela C2, APÊNDICE C) nos diferentes sistemas de tratamento de esgoto.

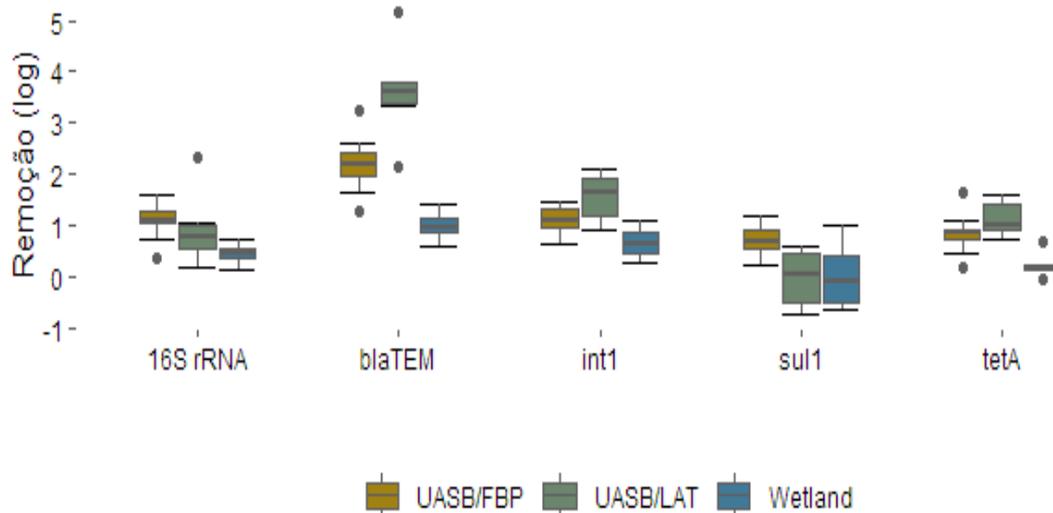


Figura 5.13 - Comparação das remoções dos genes nos três sistemas avaliados

Com o teste de Kruskal Wallis sinalizando diferenças significativas, seguiu-se com o teste de múltiplas comparações de Dunn para avaliar qual dos três tratamentos foi o mais eficaz para cada gene. Os resultados estão sintetizados na Tabela C2 do APÊNDICE C. A máxima remoção dos genes *sul1* e *RNAr 16S* foi obtida pelo sistema A (UASB+FBP), com cerca de 0,7 e 1 log, respectivamente. Para os genes *int11*, *blaTEM* e *tetA*, o sistema B (UASB/LAT) foi responsável pelas maiores remoções, com 1,7; 3,5 e 0,5 logs, respectivamente.

Percebe-se então que a combinação dos sistemas anaeróbios e aeróbios obteve melhor desempenho que o processo de tratamento aeróbio constituído de wetlands construídas. Como

observado por outros autores, o fato de adicionar um tratamento aeróbio a um sistema anaeróbio pode aumentar a eficiência de remoção de GRAs (TAO *et al.*, 2014). Além disso, o fato do reator UASB transferir boa quantidade de suas bactérias para o lodo, pode ter contribuído para o melhor desempenho desses sistemas. Frequentemente são encontradas maiores concentrações de GRAs nos biosólidos em comparação com o efluente (MUNIR *et al.*, 2011), o que também ocorre com BRAs (MACHADO *et al.*, 2020).

Foi possível notar que houve diferença na remoção dos genes entre os reatores UASB dos sistemas A e B. Vários fatores podem interferir no desempenho do reator UASB, tais como idade do lodo, velocidade ascensional, e tempo de detenção hidráulica (PAULA, 2007). Esses fatores interferem no contato entre os microrganismos e podem influenciar a transferência de genes de resistência.

Sabe-se que o lodo excedente do reator UASB deve ser descartado com regularidade para evitar degradação da qualidade do efluente final (CHERNICHARO, 2007). Ambos os reatores avaliados no presente trabalho tinham descarte de lodo regular, monitorado através da concentração de sólidos do lodo.

No sistema A (UASB/FBP), o fotorreator incrementou a remoção de todos os genes nas fluências das faixas A, B e C (Tabela 5.5). Como visto na seção anterior, o fotorreator removeu entre 0,27 e 0,56 log de *RNAr 16S*, que comparado com a remoção dos componentes que o antecedem (UASB 0,8 log e FBP 0,2 log) promoveu um acréscimo de 27 a 56%. Já os genes *blaTEM*, *int11*, *tetA* e *sull* obtiveram remoções acrescidas entre 0,7-45% (0,016-1 log); 40,5-74,8% (0,45 - 0,83 log); 35-112,5% (0,28-0,9 log) e 82,4-175,7% (0,61- 1,3 logs), respectivamente.

Tabela 5.5 - Remoção de genes no sistema UASB/FBP/UV.

Gene	Remoção UASB* (log)	Remoção FBP* (log)	Maior remoção (log)	Faixa da dose aplicada	Menor remoção (log)	Faixa da dose aplicada
<i>RNAr 16S</i>	0,8	0,2	0,56	B	0,27	C
<i>blaTEM</i>	0,9	1,3	1	C	0,016	B
<i>intI1</i>	0,64	0,47	0,83	B	0,45	C
<i>sulI</i>	0,52	0,22	1,3	A	0,61	B e C
<i>tetA</i>	0,3	0,5	0,9	C	0,28	A

*Remoção mediana, considerando as 9 amostras coletadas em cada ponto do sistema A.

Considerando a soma de todos os 5 genes quantificados nesse estudo, o teste de Kruskal Wallis, seguido pelo teste de múltiplas comparações de *Dunn* mostraram que os sistemas A (UASB/FBP) e B (UASB/LAT) removeram significativamente mais genes que o sistema C (wetlands construídas) ($p < 0,05$, Figura 5.14). Ademais, não houve diferença significativa entre os sistemas A e B, diferente dos resultados observados quando cada gene em particular é analisado.

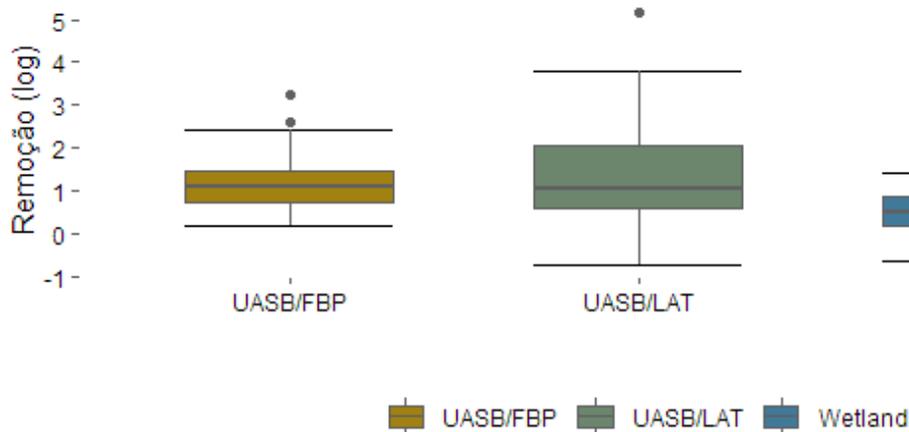


Figura 5.14 - Comparação da remoção dos genes nos três sistemas, considerando os cinco genes quantificados.

Ao avaliar os genes de forma individual, fica mais perceptível as diferenças no desempenho dos sistemas na sua remoção. O tipo de ambiente criado nos sistemas de tratamento, bem como as características do efluente são importantes parâmetros para entender a dinâmica dos genes nesses ambientes. Apesar destes sistemas não objetivarem em princípio a remoção de microrganismos e de GRAs, foi constatado que a remoção ocorre.

Foi observado que, apesar das características que tornam as ETEs *hotspots*, como o intenso contato entre bactérias e presença de substâncias causadoras de pressão seletiva, não houve aumento significativo na concentração absoluta de GRAs em nenhum sistema avaliado. No entanto, as concentrações relativas ao *RNAr 16S* mostraram que houve a prevalência de alguns genes após passagem pelo sistema de tratamento. É necessário notar que as ETEs são sistemas que contribuem muito para a proteção do meio ambiente e da saúde pública, uma vez que tratam esgotos que seriam lançados *in natura*.

O presente estudo também mostrou que apesar de alguns genes serem reduzidos após passagem pelo sistema de tratamento, as remoções ainda são pequenas. Mais pesquisas devem ser desenvolvidas para avaliar outros sistemas de tratamento de esgoto (principalmente tratamentos terciários) e para apoiar o desenvolvimento de uma legislação que busque limitar a liberação desses poluentes emergentes no ambiente. No Brasil, ainda não há um esforço direcionado para que esse limite seja estabelecido, e também não se tem conhecimento sobre legislações em outros países que busquem limitar o lançamento de GRAs ou BRAs.

Outras soluções tecnológicas devem ser investigadas para minimizar o lançamento dos GRAs nos corpos hídricos. Como visto nesse estudo, o fotorreator é uma solução limitada, pelo menos nas doses testadas. Talvez, ao aumentar as doses de UV, ou testá-las em combinação com processos oxidativos avançados, o resultado possa ser mais expressivo. Desse modo, as ETEs poderiam ser aliadas na redução da disseminação de GRAs no ambiente.

6 CONCLUSÕES FINAIS

- Em geral, os sistemas de tratamento de esgoto avaliados no presente estudo não promoveram aumento significativo na concentração dos GRAs quantificados. Apesar das ETES não serem construídas para a remoção desses poluentes emergente, alguns genes de resistência foram removidos. Dentre os sistemas avaliados, a maior remoção foi obtida pelo sistema UASB seguido por lagoas de alta taxa, que conseguiu remover cerca de 3,5 logs do gene *blaTEM*, no entanto, em geral as remoções de cada componente dos sistemas resultaram no máximo em 1 log. Pontua-se ainda que os três sistemas avaliados apresentaram diferentes padrões de remoção dos GRAs.
- Após a passagem do efluente pela ETE ainda há lançamento de grande quantidade de GRAs nos corpos hídricos receptores, mas isso não indica que os sistemas de tratamento contribuem para a disseminação dos GRAs (e da RA) no ambiente, uma vez que não houve aumento na concentração desses elementos após a passagem pelos sistemas.
- Quanto à quantificação dos genes no afluente, verificou-se que o mais abundante foi o *RNAr 16S* (como esperado), seguido por *intII* e os GRAs (*sull*, *blaTEM* e *tetA*). Além disso, os genes de resistência à tetraciclina foram os menos abundantes no esgoto bruto nos dois períodos de coleta.
- As concentrações relativas mostraram que os genes de resistência a sulfonamida e o *intII* foram os mais prevalentes nos sistemas de tratamento.
- O aumento da dose de radiação aplicada no fotorreator não aumentou a remoção de GRAs, o que pode ser devido a reativação das bactérias. Além disso, os genes *sull* e *intII* foram mais removidos nas menores doses de radiação, enquanto que o *tetA* e o *blaTEM* foram mais suscetíveis nas maiores doses.
- Os parâmetros pH e DQO mostraram ter maior influência na concentração dos genes que os demais parâmetros avaliados. Além disso, as relações ente os genes e parâmetros físico-químicos naturalmente se modificam ao longo do tratamento.

7 RECOMENDAÇÕES

- A partir das análises e conclusões desse estudo, recomenda-se correlacionar em trabalhos futuros dados dos GRAs obtidos nesse estudo, com as respectivas bactérias resistentes obtidas com métodos de cultivo.
- A quantificação dos antibióticos também poderia auxiliar as análises de GRAs. Principalmente em sistemas que possuem meios porosos com formação de biofilme, pois os antibióticos podem ser adsorvidos no substrato.
- A quantificação dos GRAs e BRAs tanto no lodo dos reatores UASB quanto no sedimento das wetlands (em diferentes profundidades) também poderiam auxiliar nas análises e discussões dos resultados encontrados, bem como explicar os fatores que mais contribuem na remoção dos genes.
- A complexidade da matriz de esgoto real traz muitas dificuldades ao se analisar a influência dos parâmetros físico-químicos na concentração dos GRAs. Recomenda-se iniciar com experimentos em menor escala com variações de um ou dois parâmetros e com a utilização de um sistema controle para melhor avaliação da influência de parâmetros individuais.
- Outras soluções tecnológicas devem ser investigadas para minimizar o lançamento dos GRAs nos corpos hídricos. Como base nos dados desse estudo, o fotorreator possui limitações, pelo menos nas doses testadas.

REFERÊNCIAS

- ADEFISOYE, M.; OKOH, A. Identification and antimicrobial resistance prevalence of pathogenic *Escherichia coli* strains from treated wastewater effluents in Eastern Cape, South Africa. *Microbiology Open*. v. 5, n.1, p. 143–151, 2016.
- AERTSEN, A.; MICHIELS, C. Upstream of the SOS response: figure out the trigger. *Trends in Microbiology*. v. 14, n. 10, p. 421-423, 2006.
- ALLEN, K.; DONATO, J.; WANG, H.; CLOUD-HANSEN, K.; DAVIES, J.; HANDELSMAN, J. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nature Reviews Microbiology*, v. 8, n. 4, p. 251-259, 2010.
- BESSEREAU, J. Transposons in *C. Elegans*. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community. 2006, p.13.
- AMARASIRI, M.; SANO, D.; SUZUKI, S. Understanding human health risks caused by antibiotic resistant bacteria (ARB) and antibiotic resistance genes (ARG) in water environments: Current knowledge and questions to be answered. *Environmental Science and Technology*. v. 50, p. 2016-2059, 2020.
- ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). Antimicrobianos: Bases teóricas e usos clínicos. BRASIL, 2007. Disponível em: <<https://tecnoblog.net/247956/referencia-site-abnt-artigos/>>. Acesso em: 23 de ago, 2020.
- ASHBOLT, N. J.; PRUDEN, A.; MILLER, J. H.; RIQUELME, M. V.; MAILE-MOSKOWITZ, A. Antimicrobial resistance: fecal sanitation strategies for combatting a global public health threat. *Global Water Pathogens Project (GWPP)*, 2018.
- ÁVILA, C.; GARCÍA-GALÁN, M.; BORREGO, C.; RODRÍGUEZ-MOZAZ, S.; GARCÍA, J.; BARCELÓ, D. New insights on the combined removal of antibiotics and ARGs in urban wastewater through the use of two configurations of vertical subsurface flow constructed wetlands. *Science of the Total Environment*, v. 755, p. 2-10, 2021.
- BARAN, W.; ADAMEK, E.; ZIEMIANSKA, J.; SOBCZAKA, A. Effects of the presence of sulfonamides in the environment and their influence on human health. *Journal of Hazardous Materials*. v. 196, p. 1– 15, 2011.
- BISHOP, M.; MELVANI, S.; HOWDEN, B.; CHARLES, P.; GRAYSON, M. Good Clinical Outcomes but High Rates of Adverse Reactions during Linezolid Therapy for Serious Infections: a Proposed Protocol for Monitoring Therapy in Complex Patients. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. p. 1599–1602, 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Plano de ação nacional de prevenção e controle da resistência aos antimicrobianos no âmbito da saúde única 2018-2022 (PAN-BR) / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Brasília, 2018.
- BREAZEAL, M.; NOVAK, J.; VIKESL, P. E PRUDEN, A. Effect of wastewater colloids on membrane removal of antibiotic resistance genes. *Water Research*. v. 47, p. 130-140, 2013.
- BRESSANI-RIBEIRO, Thiago. Optimization of sponge-bed trickling filters for nitrogen removal from anaerobically treated sewage. 2018. Qualificação de doutorado (Doutorado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos) - Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2018. Não publicado.

- BURGMANN, H.; FRIGON, D.; GAZE, H.; MANAIA, C.; PRUDEN, A.; SINGER, A.; SMETS, B. E ZHANG, T. Water and sanitation: an essential battlefield in the war on antimicrobial resistance. *FEMS Microbiology Ecology*. v. 94, p. 1-14, 2018.
- BUSCHMANN, A; TOMOVA, A.; LÓPEZ, A.; MALDONADO, M.; HENRÍQUEZ, L.; IVANOVA, L.; MOY, F.; GODFREY, H.; CABELLO, F. Salmon Aquaculture and Antimicrobial Resistance in the Marine Environment.
- BYARUGABA, D. Mechanisms of Antimicrobial Resistance. In: Sosa, A.; Byarugaba, D.; Amábile-Cuevas, C.; Hsueh, P.; Kariuki, S.; Okeke, I. (Ed) Antimicrobial Resistance in Developing Countries. Springer, New York, 2009, p. 15-26.
- CASTRO, M.; KOPITKE, L.; FUNCHS, F.; TANNHAUSER, M. Evidence of Inappropriate Use of Vancomycin in a University Affiliated Hospital in Brazil. *Pharmacoepidemiology and drug safety*, v. 8, n. 6, p. 405-411, 1999.
- CASTRO, P.; RODRIGUES, D.; ROESER, H.; SANTIAGO, A.; AFONSO, R. Antibiotic consumption in developing countries defies global commitments: an overview on Brazilian growth in consumption. *Environmental Science and Pollution Research*. v. 27, p. 21013-21020, 2020.
- CHEN, H.; ZHANG, M. Effects of Advanced Treatment Systems on the Removal of Antibiotic Resistance Genes in Wastewater Treatment Plants from Hangzhou, China. *Environ. Sci. Technol.* v. 47, p. 8157-8163, 2013.
- CHEN, J.; LIU, YOU-SHENG.; SU, HAO-CHANG.; YING, GUANG-GUO.; LIU, F.; LIU, SHUANG-SHUANG.; HE, LIANG-YING.; CHEN, ZHI-FENG.; YANG, YONG-QIANG.; CHEN, FAN-RONG. Removal of antibiotics and antibiotic resistance genes in rural wastewater by an integrated constructed wetland. *Environ Sci Pollut Res*. v. 22, n. 3, p.1794-803, 2014
- CHEN, J.; WEI, XIAO-DONG.; LIU, YOU-SHENG.; YING, GUANG-GUO.; LIU, SHUANG-SHUANG.; HE, LIANG-YING.; SU, HAO-CHANG.; HU, LI-XIN.; CHEN, FAN-RONG. YANG. YONG-QIANG. Removal of antibiotics and antibiotic resistance genes from domestic sewage by constructed wetlands: Optimization of wetland substrates and hydraulic loading. *Science of the Total Environment* v. 565, p. 240–248, 2016.
- CHERNICHARO, C.A.L. de. Princípios do tratamento biológico de águas residuárias: reatores anaeróbios. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Minas Gerais. v.5, 379 p. 2007.
- CHOWDHURY, P.; MCKINNON, J.; LIU, M.; DJORDJEVIC, S. Multidrug Resistant Uropathogenic Escherichia coli ST405 With a Novel, Composite IS26 Transposon in a Unique Chromosomal Location. *Front. Microbiol.* v. 8, 2019.
- CHRISTGEN, B.; YANG, Y.; AHAMMAD, S.; LI, B.; RODRIQUEZ, D.; ZHANG, T.; GRAHAM, D. Metagenomics Shows That Low-Energy Anaerobic–Aerobic Treatment Reactors Reduce Antibiotic Resistance Gene Levels from Domestic Wastewater. *Environ. Sci. Technol.* v. 49, p. 2577–2584, 2015.
- DENG, Y.; LI, B.; ZHANG, T. Bacteria That Make a Meal of Sulfonamide Antibiotics: Blind Spots and Emerging Opportunities. *Environ. Sci. Technol.* v. 52, p. 3854–3868, 2018.
- DESTIANI, R.; TEMPTON, M. Chlorination and ultraviolet disinfection of antibiotic-resistant bacteria and antibiotic resistance genes in drinking water. *AIMS Environmental Science*. v. 6, n. 3, p. 222–241, 2019.

- DI CESARE, A.; ECKERT, E. M.; D'URSO, S.; BERTONI, R.; GILLAN, D. C.; WATTIEZ, R.; CORNO, G. Co-occurrence of integrase 1, antibiotic and heavy metal resistance genes in municipal wastewater treatment plants. *Water Research*, v. 94, p. 208-214, 2016.
- DO, T. T.; MURPHY, S.; WALSH, F. Antibiotic Resistance and Wastewater Treatment Process. *Antimicrobial Resistance in Wastewater Treatment Processes*, p. 263-291, 2017.
- DU et al., 2014 DU, J.; REN, H.; GENG, J.; ZHANG, Y.; XU, K.; DING, L. Occurrence and abundance of tetracycline, sulfonamide resistance genes, and class 1 integron in five wastewater treatment plants. *Environ Sci Pollut Res*, v. 21, p. 7276–7284, 2014.
- VASSALLE, L.; DÍEZ-MONTERO, R.; TRINDADE ROSA MACHADO, A.; MOREIRA, C. Upflow anaerobic sludge blanket in microalgae-based sewage treatment: Codigestion for improving biogas production. *Bioresource Technology*, v.300, p. 1-9, 2020.
- ENGEMANN, C.; ADAMS, L.; KNAPP, C.; GRAHAM, D. Disappearance of oxytetracycline resistance genes in aquatic systems Engemann. *FEMS Microbiol Lett*. v. 263, p. 176–182, 2006.
- ETEBU, E.; ARIKEKPAR, I. Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. *Int. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. Res*. v.4, p. 90-101, 2016.
- FERRIS, M. J.; MUYZER, G.; WARD, D. M. Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. *Applied and environmental microbiology*, v. 62, n. 2, p. 340–6, 1996.
- FREITAS, D. Elementos genéticos de resistência a antibióticos, composição microbiana total e de potenciais patógenos em diferentes estações de tratamento de esgotos sanitários. Belo Horizonte, 2020. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2020.
- FROST, L.; LEPLAE, R.; SUMMERS, A.; TOUSSAINT, A. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nature reviews*. v.3, p.722-732, 2005.
- GALES, A.; SADER, H.; RIBEIRO, J.; ZOCCOLI, C.; BARTH, A.; PIGNATARI, A. Antimicrobial Susceptibility of Gram-Positive Bacteria Isolated in Brazilian Hospitals Participating in the SENTRY Program (2005-2008). *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. v. 13, n. 2, p. 90-98, 2009.
- GAO, P.; MUNIR, M.; XAGORARAKI, I. 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. 42, p. 173–183, 2012;
- GARCIA-ARMISEN, T.; ANZIL, A.; PIERRE, C.; CHEVREUIL, M.; SERVAISA, P. Identification of antimicrobial resistant bacteria in rivers: Insights into the cultivation bias. *Water Research*. v; 47, n.14, p. 4938-4947, 2013
- GILLINGS, M.; GAZE, W.; PRUDEN, A.; SMALLA, K.; TIEDJE, J.; ZHU, YONG-GUAN. Using the class 1 integron-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution. *The ISME journal*, v. 9, n. 6, p. 1269-1279, 2015.
- GOLDSTEIN, C.; LEE, M.; SANCHEZ, S.; HUDSON, C.; PHILLIPS, B.; REGISTER, B.; GRADY, M.; LIEBERT, C.; SUMMERS, A.; WHITE, D.; MAURER, J. Incidence of Class 1 and 2 Integrases in Clinical and Commensal Bacteria from Livestock, Companion Animals, and Exotics. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 45, n.3, p. 723–726, 2001.

- GÓMEZ-PACHECO, C.; SÁNCHEZ-POL, M.; RIVERA-UTRILLA, J.; LÓPEZ-PEÑALVER, J. Tetracycline degradation in aqueous phase by ultraviolet radiation. *Chemical engineering journal*, v. 187, p. 89-95, 2012.
- GREEN, M.; GRIFFIN, P.; SEABRIDGE, J.; DHOBIE, D. Removal of bacteria in Subsurface flow wetlands. *Wat. Science and tech.* v. 3, n.5, p. 109-116, 1997.
- GUO, M.; YUAN, Q.; YANG, J. Distinguishing Effects of Ultraviolet Exposure and Chlorination on the Horizontal Transfer of Antibiotic Resistance Genes in Municipal Wastewater. *Environ. Sci. Technol.* v. 49, n. 9, p. 5771-5778, 2015.
- GUO, X.; PANG, W.; DOU, C.; YIN, D. Sulfamethoxazole and COD increase abundance of sulfonamide resistance genes and change bacterial community structures within sequencing batch reactors. *Chemosphere.* v. 175, p. 21-27, 2017.
- HAGBØ, M. E. S. Characterization of conjugative plasmids in the gut microbiota from a preterm twin pair. Master's thesis. Norwegian University of Life Sciences, Ås, p. 9, 2017.
- HASAN, H.; MUHAMMAD, M.H.; ISMAIL, N. A review of biological drinking water treatment technologies for contaminants removal from polluted water resources. *Journal of Water Process Engineering.* v. 33, 16 p. 2020.
- HELMS, M.; SIMONSEN, J.; MØLBAK, K. Quinolone Resistance Is Associated with Increased Risk of Invasive Illness or Death during Infection with Salmonella Serotype Typhimurium. *The Journal of Infectious Diseases.* v.190, p.1654-1654, 2004.
- HEYDARI, S.; EFTEKHAR, F. Biofilm Formation and β -Lactamase Production in Burn Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Jundishapur J Microbiol.* v. 8, n. 3, p. 1-5, 2015.
- HOU, J.; CHEN, Z.; GAO, J.; XIE, Y.; LI, L.; QIN, S.; WANG, Q.; MAO, D.; LUO, Y. Simultaneous removal of antibiotics and antibiotic resistance genes from pharmaceutical wastewater using the combinations of up-flow anaerobic sludge bed, anoxic-oxic tank, and advanced oxidation technologies. *Water Research.* v. 159, p. 511-520, 2019.
- HUANG, X.; LIU, C.; LI, K.; SU, J.; ZHU, G.; LIU, L. Performance of vertical up-flow constructed wetlands on swine wastewater containing tetracyclines and tet genes. *water research.* v. 70, p. 109-117, 2015.
- HUANG, J.; XI, J.; HU, H.; LI, Y.; LU, S.; TANG, F.; PANG, Y. UV light tolerance and reactivation potential of tetracycline-resistant bacteria from secondary effluents of a wastewater treatment plant. *Journal of Environmental Sciences.* v. 41, p. 146-153, 2016.
- HUANG, X.; ZHENG, J.; LIU, C.; LIU, L.; LIU, Y.; FAN, H. Removal of antibiotics and resistance genes from swine wastewater using vertical flow constructed wetlands: Effect of hydraulic flow direction and substrate type. *Chemical Engineering Journal*, v. 308, p. 692-699, 2017.
- JÄGER, T.; HEMBACH, N.; ELPERS, C.; WIELAND, A.; ALEXANDER, J.; HILLER, C.; KRAUTER, G.; SCHWARTZ, T. Reduction of Antibiotic Resistant Bacteria During Conventional and Advanced Wastewater Treatment, and the Disseminated Loads Released to the Environment. *Frontiers in Microbiology.* v. 9, p. 1-16, 2018.
- KADLEC, R.; WALLACE, S. *Treatment wetlands.* 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 1.016 p., 2009.
- KANG, H.; JEONG, H.; OH, J.; TAE, S.; CHOI, C.; MOON, D.; LEE, W.; LEE, Y.; SEOL, S.; CHO, D.; LEE, J. Characterization of antimicrobial resistance and class 1 integrons found

in *Escherichia coli* isolates from humans and animals in Korea. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 55, n. 5, p. 639–644, 2005.

KAPOOR, G.; SAIGAL, S.; ELONGAVAN, A. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of Anaesthesiol Clinical Pharmacol.* V. 33, n.3, p.300-305, 2017.

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

KÜMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. *Chemosphere*. v. 75, p. 417–434, 2009.

LAI, H.; WANG, T.; CHOU, C. Implication of light sources and microbial activities on degradation of sulfonamides in water and sediment from a marine shrimp pond. *Bioresource Technology*. v. 102, p. 5017–5023, 2011.

LAUTENBACH, E.; PATEL, J.; BILKER, W.; EDELSTEIN, P.; FISHMAN N. Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: Risk Factors for Infection and Impact of Resistance on Outcomes. *Clinical Infectious Diseases*. v. 32, p.1162-1171, 2001.

LE, T.; NG, C.; TRAN, N.; CHEN, H. EGIN, H. 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, 2018.

LEE, J.; JEON, J. H.; SHIN, J.; JANG, H. M.; KIM, S.; SONG, M. S.; KIM, Y. M. Quantitative and qualitative changes in antibiotic resistance genes after passing through treatment processes in municipal wastewater treatment plants. *Science of The Total Environment*, v. 605, p. 906-914, 2017.

LEVIN, A.; BARONE, A.; PENÇO, J.; SANTOS, M.; MARINHO, I.; ARRUDA, E.; MANRIQUE, E.; COSTA, S. Intravenous Colistin as Therapy for Nosocomial Infections Caused by Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Clinical Infectious Diseases*. v. 28, p. 1008–11, 1999.

LIU, L.; LIU, C.; ZHENG, C.; HUANG, X.; WANG, Z.; LIU, Y.; ZHU, G. Elimination of veterinary antibiotics and antibiotic resistance genes from swine wastewater in the vertical flow constructed wetlands. *Chemosphere*. v. 91, p. 1088-1093, 2013.

LOPES, B.; MACHADO, E.; RODRIGUES, H.; LEAL, C.; ARAÚJO, J.; MATOS, A. Effect of alkaline treatment on pathogens, bacterial community and antibiotic resistance genes in different sewage sludges for potential agriculture use. *Environ Technol*. v. 41, n. 4, p. 529-538, 2018.

MACHADO, E.; LEAL, C.; COELHO, B.; CHERNICHARO, C.; ARAÚJO, J. Detecção e quantificação de bactérias resistentes aos antibióticos ampicilina e cloranfenicol em estações de tratamento de esgoto doméstico. *Eng Sanit Ambient*. v.25, n.6, 2020.

MANAIA, C.; MACEDO, G.; FATTA-KASSINOS, D.; NUNES, O. Antibiotic resistance in urban aquatic environments: can it be controlled?. *Appl Microbiol Biotechnol*. v.100, p. 1543–1557, 2016.

MANAIA, C.; ROCHA, J.; SCACCIA, N.; MARANO, R.; RADUD, E.; BIANCULLO, F. CERQUEIRA, F. FORTUNATO, G.; IAKOVOS C. IAKOVIDESI, ZAMMITJ, I.; KAMPOURISK, L.; VAZ-MOREIRAA, L. E NUNES, O. Antibiotic resistance in wastewater treatment plants: Tackling the black box. *Environment International*. v. 115, 312–324, 2018.

- MAO, D.; YU, S.; RYSZ, M.; LUO, Y.; YANG, F.; LI, F.; HOU, J.; MU, Q.; ALVAREZ, P. Prevalence and proliferation of antibiotic resistance genes in two municipal wastewater treatment plants. *Water Research*, v. 85, p. 458-466, 2015.
- MARAGAKIS, L.; PERENCEVICH, E.; COSGROVE, S. Clinical and economic burden of antimicrobial resistance. *Expert. Rev. Ant. Infec. Ther.* v.6, n.5, p. 751-763, 2008.
- MARTINEZ, E.; MARQUEZ, C.; INGOLD, A.; MERLINO, J.; DJORDJEVIC, S.; STOKES, H.W.; CHOWDHURYA, P. Diverse Mobilized Class 1 Integrons Are Common in the Chromosomes of Pathogenic *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 54, n.4, p. 2169–2172, 2012.
- McKINNEY, C.; PRUDEN, A. Ultraviolet Disinfection of Antibiotic Resistant Bacteria and Their Antibiotic Resistance Genes in Water and Wastewater. *Environ. Sci. Technol.* v. 46, p. 13393–13400, 2012.
- METCALF & EDDY. Wastewater engineering. Treatment, disposal, and reuse. 3 Ed. Singapore: McGraw-Hill, Inc. International Edition, 1334p, 1991.
- MOLIN, S.; TOLKER-NIELSEN, T. Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Current Opinion in Biotechnology*. v. 14, n. 3, p. 255-261, 2003.
- MÜLLER, E.; SCHÜSSLER, W.; HORN, H.; LEMMER, H. Aerobic biodegradation of the sulfonamide antibiotic sulfamethoxazole by activated sludge applied as co-substrate and sole carbon and nitrogen. *Chemosphere*. v. 92, p. 969–978, 2013.
- MUNIR, M.; WONG, K.; XAGORARAKI, I. Release of antibiotic resistant bacteria and genes in the effluent and biosolids of five wastewater utilities in Michigan. *Water reserarch*. v. 45, p. 681-693, 2011.
- NARCISO-DA-ROCHA, C.; ROCHA, J.; VAZ-MOREIRA, I.; LIRA, F.; TAMAMES, J.; HENRIQUES, I.; MARTINEZ, J. L.; MANAIA, C. M. Bacterial lineages putatively associated with the dissemination of antibiotic resistance genes in a full-scale urban wastewater treatment plant. *Environment International*, v. 118, p. 179-188, 2018.
- NÕLVAK, H.; TRUU, M.; TIIRIK, K.; OOPKAUP, K.; SILDVEE, T.; KAASIK, A.; MANDER, U.; TRUU, J. Dynamics of antibiotic resistance genes and their relationships with system treatment efficiency in a horizontal subsurface flow constructed wetland. *Science of the Total Environment*. v.461-462, p. 636–644, 2013.
- NOVO, A.; ANDRE, S.; VIANA, P.; NUNES, O.; MANAIA, C. Antibiotic resistance, antimicrobial residues and bacterial community composition in urban wastewater. *Water research*, v. 47, p. 1875-1887, 2013.
- OLIVER, C.; BLAKE, R.; STEED, L.; SALGADO, C. Risk of Vancomycin-Resistant Enterococcus (VRE) Bloodstream Infection Among Patients Colonized With VRE. *Infection control and hospital epidemiology*. v. 29, n.5, p. 404-409, 2008.
- OMS. Global action plan on antimicrobial resistance. Geneva: OMS, 2015.
- PATERSON, D.; KO, W.; GOTTBORG, A.; MOHAPATRA, S.; CASELLAS, J.; GOOSSENS, H.; MULAZIMOGLU, L.; TRENHOLME, G.; KLUGMAN, K.; BONOMO, R.; RICE, L.; WAGENER, M.; MCCORMACK, J.; YU, V. Antibiotic Therapy for *Klebsiella pneumoniae* Bacteremia: Implications of Production of Extended-Spectrum b-Lactamases. *Clinical Infectious Diseases*. v. 39, p. 31–37, 2003.

- PAULA, F. Influência de aspectos hidráulicos na otimização de parâmetros de projeto de reatores UASB tratando esgotos domésticos. Belo Horizonte, 2007. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.
- PAZDA, M.; KUMIRSKA, J.; STEPNOWSKI, P.; MULKIEWICZ E. Antibiotic resistance genes identified in wastewater treatment plant systems – A review. *Science of the Total Environment*. v. 697, p. 1-21, 2019.
- PEI, A. Y.; OBERDORF, W.E.; NOSSA, C.W.; A, A.; CHOKSHI, P.; GERZ, E. A.; JIN, Z.; LEE, P. YANG, L.; POLES, M.; BROWN, S.; SOTERO, S.; DESANTIS, T.; BRODIE, E.; NELSON, K.; PEI, Z. Diversity of 16S rRNA Genes within Individual Prokaryotic Genomes. *Applied and environmental microbiology*, v.76, n. 12, p. 3886–3897, 2010.
- PIETRAMELLARA, G.; ASCHER, J.; BORGOGNI, F.; CECCHERINI, M.T.; GUERRI, G.; NANNIPIERI, P. Extracellular DNA in soil and sediment: fate and ecological relevance. *Biol. Fertil. Soils*, v. 45, p. 219-235, 2008.
- REED, S.; FRIEDMAN, J.; ENGEMANN, J.; GRIFFITHS, R.; ANSTROM, K.; KAYE, K.; STRYJEWski, M.; SZCZECHE, L.; RELLER, B.; COREY, R.; SCHULMAN, K.; FOWLER, V. Costs and outcomes among hemodialysisdependent patients with methicillin-resistant or methicillin-usceptible staphylococcus aureus bacteremia. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. v. 26, n. 2, p. 175-183, 2005.
- REIS, A. C.; KOLVENBACH, B. A. NUNES, O. C.; CORVIN, P. F. Biodegradation of antibiotics: The new resistance determinants – part I. *New Biotechnology*. v. 54, p. 34-51, 2020.
- RIBEIRO, V.; LINCOPAN, N.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B.; DESTRO, M. Characterization of class 1 integrons and antibiotic resistance genes in multidrugresistant salmonella enterica isolates from foodstuff and related sources. *Brazilian Journal of Microbiology*. v. 42, p. 685-692, 2011.
- RIZZO, L.; MANAIA, C.; MERLIN, C.; SCHWARTZ, T.; DAGOT, C.; PLOY, M.; MICHAEL, I.; FATTA-KASSINOS, D. Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: A review. *Science of the Total Environment*, v. 447p. 345-360, 2013.
- RIZZO, L.; AGOVINO, T.; NAHIM-GRANADOS, S.; CASTRO-ALFÉREZ, M.; FERNÁNDEZ-IBÁÑEZ, P.; POLO-LÓPEZ, M. I. Tertiary treatment of urban wastewater by solar and UV-C driven advanced oxidation with peracetic acid: Effect on contaminants of emerging concern and antibiotic resistance. *Water Research*, v. 149, p. 272-281, 2019
- SADER, L.; GALES, A.; PFALLER, M.; MENDES, R.; ZOCCOLI, C.; BARTH, A.; JONES, R. Pathogen Frequency and Resistance Patterns in Brazilian Hospitals: Summary of Results from Three Years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. v.5, n.4, p. 200-214, 2001.
- SALMOND, G.; FINERAN, P. A century of the phage: past, present and future. *Nature reviews microbiology*. v.13, p.777-786, 2015.
- SALTOGLUA, N.; ERGONULB, O.; TULEKC, N.; YEMISENA, M.; KADANALID, A.; KARAGOZD, G.; BATIRELE, A.; AKE, O.; SONMEZERC, C.; ERAKSOYF, H.; CAGATAYF, A.; SURMEA, S.; NEMLIG, S.; DEMIRDALG, T.; COSKUNH, O.;OZTURKI, D.; CERANI, N.; PEHLIVANOGLUJ, F.; SENGOZJ, G.; ASLANK, T.; AKKOYUNLUK, Y.; ONCULL, O.; AYL, H.; MULAZIMOGLUM, L.; ERTURKM, B.;YILMAZN, F.; YORUKO, G.; UZUNP, N.; SIMSEKQ, F.; YILDIRMAKQ, T.; YAŞARJ, K.; SONMEZOGLUR, M.; KÜÇÜKARDALIR, Y.; TUNAS, N.; KARABAYS, O.;

- OZGUNESN, N.; SARGINN, F. Influence of multidrug resistant organisms on the outcome of diabetic foot infection, *Stambul*, v. 70, p.10-14, 2018.
- SANTOS, V.; MACHADO, B.; ATALLA, A.; CAVALHERI, P.; MAGALHÃES, F. Microbiological evaluation of constructed wetlands and solar disinfection in wastewater treatment and reuse. *Journal of water and health*. v. 18, p. 1146-1153, 2020.
- SONG, H.; ZHANG, S.; GUO, J.; YANG, Y.; ZHANG, L.; LI, H.; YANG, X.; LIU, X. Vertical up-flow constructed wetlands exhibited efficient antibiotic removal but induced antibiotic resistance genes in effluent. *Chemosphere*. v. 203, p. 434-441, 2018.
- SØRENSEN, S.; BAILEY, M.; HANSEN, L.; KROER, N.; WUERTZ, S. Studying plasmid Horizontal transfer in situ: a critical review. *Nature reviews microbiology*. v. 3, p.700-710, 2015.
- SOUCY, S.; HUANG, J. e GOGARTEN, J. Horizontal gene transfer: building the web of life. *Nature reviews microbiology*. v. 16, p. 472-482, 2015.
- SOUSA, J.; MACEDO, G.; PEDROSAC, M.; BECERRA-CASTROA, C.; CASTRO-SILVA, S.; PEREIRA C, M.; SILVAC, A.; NUNESA, O.; MANAIA, C. Ozonation and UV254nm radiation for the removal of microorganism sand antibiotic resistance genes from urban wastewater. *Journal of Hazardous Materials*. v. 323, p. 434–441, 2017.
- SU, HAO-CHANG; YING, GUANG-GUO; HE, LIANG-YING; LIU, YOU-SHENG; ZHANGA, RUI-QUAN; TAO, R. Antibiotic resistance, plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes and ampC gene in two typical municipal wastewater treatment plants. *Environ. Sci.: Processes Impacts*, v. 16, p. 324–332, 2014.
- SU, H.; LIU, Y.; PAN, C.; CHEN, J.; HE, L.; YING, G. Persistence of antibiotic resistance genes and bacterial community changes in drinking water treatment system: From drinking water source to tap water. *Science of the Total Environment*. v. 616, p. 453–461, 2018.
- SULLIVAN, B.; VANCE, C.; GENTRY, T.; KARTHIKEYAN, R. Effects of chlorination and ultraviolet light on environmental tetracycline-resistant bacteria and tet(W) in water. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. v. 5, p. 777–784, 2017.
- SZCZEPANOWSKI, R.; LINKE, B.; KRAHN, I.; GARTEMANN, K.; GÜTZKOW, T.; EICHLER, W.; PÜHLER, A.; SCHLÜTER, A. Detection of 140 clinically relevant antibiotic-resistance genes in the plasmid metagenome of wastewater treatment plant bacteria showing reduced susceptibility to selected antibiotics. *Microbiology*. v. 155, p. 2306–2319, 2009.
- TANDUKAR, M.; HARADA, A. Performance comparison of a pilot-scale UASB and DHS system and activated sludge process for the treatment of municipal wastewater. *Water research*. v. 41, p. 2697 – 2705, 2007.
- TAO, C.; HSU, B.; JI, W.; HSU, T.; KAO, P.; HSU, C.; SHEN, S.; SHEN, T.; WAN, T.; HUANG, Y. Evaluation of five antibiotic resistance genes in wastewater treatment systems of swine farms by real-time PCR. *Science of the Total Environment*, v. 496, p. 116-121, 2014.
- THOMAS, C.; NIELSEN, K. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nature reviews microbiology*. v.3 p. 711-721, 2005.
- TREIN, C.; ZUMALACARREGUI, J.; MORAES, M.; VON SPERLING, M. Performance of a French system of vertical flow wetlands (first stage) operating with an extended feeding cycle. *Water Research*, v. 80, n.8, p. 1443-1455, 2019.

- VACCA, G.; WAND, H.; NIKOLAUSZ, M.; KUSCHK, P.; KASTNER, M. Effect of plants and filter materials on bacteria removal in pilot-scale constructed wetlands. *Water Research*. v. 39, p. 1361–1373, 2005.
- VON SPERLLING, M. *Introdução à Qualidade das águas e ao Tratamento de Esgotos*. 7 ed. Belo Horizonte: UFMG., 2011. 238 p.
- VON SPERLLING, M.; SEZERINO, P.H. (2018). Dimensionamento de wetlands construídos no Brasil. *Boletim Wetlands Brasil, Edição Especial, dezembro/2018*. 65 p. ISSN 2359-0548. 2018.
- WANG, L.; LIU, Y.; MA, J.; ZHAO, F. Rapid degradation of sulphamethoxazole and the further transformation of 3-amino-5-methylisoxazole in a microbial fuel cell. *Water Research*. v. 88, p. 322-328, 2016.
- WEI, Z.; FENG, K.; LI, S.; ZHANG, Y.; CHEN, H.; YIN, H.; XUF, M.; DENG, Y. Exploring abundance, diversity and variation of a widespread antibiotic resistance gene in wastewater treatment plants. *Environment International*. v.117, p. 186–195, 2018.
- WINTERSDORFF, C.; PENDERS, J.; NIEKERK, J.; MILLS, N.; MAJUMDER, S.; ALPHEN, L.; SVELKOU, P.; WOLFFS, P. Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. *Frontiers in Microbiology*. v.7, p.1-10, n.173, 2016.
- World Health Organization. WHO Report on Surveillance of Antibiotic Consumption: 2016-2018 early implementation. Geneva: World Health Organization; 2018.
- WRIGHT, G. Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic?. *Current Opinion in Microbiology*. v.13, n. 5, p. 589-594, 2010.
- XIONG, J.; KURADE, M.; JEON, B. Can Microalgae Remove Pharmaceutical Contaminants from Water?. *Trends in biotechnology*, v. 36, n.1, p. 30-44, 2018.
- YANG, F.; ZHANG, K.; ZHI, S.; LI, J.; TIANA, X.; GU, Y.; ZHOU, J. High prevalence and dissemination of β -lactamase genes in swine farms in northern China. *Science of the Total Environment*, v. 651, p. 2507–2513, 2019.
- YI, X.; TRAN, N.; YIN, T.; HE, Y.; GIN, K. Removal of selected PPCPs, EDCs, and antibiotic resistance genes in landfill leachate by a full-scale constructed wetlands system. *Water Research*. v. 121, p. 46-60, 2017.
- YOUNG, P.; BUCHANAN, N.; FALLOWFIELD, H. Inactivation of indicator organisms in wastewater treated by a high rate algal pond system. *Journal of Applied Microbiology*, v. 121, p. 577-586, 2016.
- YUAN, QING-BIN; GUO, MEI-TING; YANG, JIAN. Fate of antibiotic resistant bacteria and genes during wastewater chlorination: implication for antibiotic resistance control. *PloS One*, v. 10, n. 3, p. 11, 2015.
- YUAN, QING-BIN; GUO, MEI-TING; WEI, WU-JI.; YANG, JIAN. Reductions of bacterial antibiotic resistance through five biological treatment processes treated municipal wastewater. *Environ Sci Pollut Res*. v.23, p.19495–19503, 2016.
- YOUSEF, S.; YOUNIS, S.; FARRAG, E.; MOUSSA, H.; BAYOUMI, F.; ALI, A. Clinical and Laboratory Profile of Urinary Tract Infections Associated with Extended Spectrum β -Lactamase Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Clinical & Laboratory Science*, v. 46, n. 4, p.393-400, 2016.

ZHANG, Y.; ZHUANG, Y.; GENG, J.; REN, H.; ZHANG, Y.; DING, L.; XU, K. Inactivation of antibiotic resistance genes in municipal wastewater effluent by chlorination and sequential UV/chlorination disinfection. *Science of The Total Environment*. v. 512–513, p. 125-132, 2015.

ZHANG, C.; XU, L.; MOU, X.; XU, H.; LIU, J.; MIAO, Y.; WANG, X.; LI, X. Characterization and evolution of antibiotic resistance of Salmonella in municipal wastewater treatment plants. *Journal of Environmental Management*. v. 251, p. 8, 2019.

ZHENG, J.; SU, C.; ZHOU, J.; XU, L.; QIAN, Y.; CHEN, H. Effects and mechanisms of ultraviolet, chlorination, and ozone disinfection on antibiotic resistance genes in secondary effluents of municipal wastewater treatment plants. *Chemical Engineering Journal*. v. 317, p. 309–316, 2017.

ZHUANG, Y.; REN, H.; GENG, J.; ZHANG, Y.; ZHANG, Y.; DING, L.; XU, K. Inactivation of antibiotic resistance genes in municipal wastewater by chlorination, ultraviolet, and ozonation disinfection. *Environ Sci Pollut Res*. v. 22, p. 7037–7044, 2015.

APÊNDICE A – RESULTADOS DOS ENSAIOS DE qPCR.

Tabela A1 - Informações das curvas padrão utilizadas para cada elemento genético.

Parâmetro	<i>blaTEM</i>	<i>RNAr 16S</i>	<i>tetA</i>	<i>sull</i>	<i>intI1</i>
Eficiência (%)	96,9	92,6	96,1	94,6	98,9
Threshold	0,033	0,012	0,032	0,038	0,043
Equação da reta	$y = -3,39x + 43,05$	$y = -3,51x + 44,08$	$y = -3,42x + 43,29$	$y = -3,45x + 44,01$	$y = -3,35x + 45,12$
R ²	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99

Tabela A2 - Resultados das quantificações dos genes.

SISTEMA C (Wetlands construídas)										
Amostra	<i>blaTEM</i>		<i>RNAr 16S</i>		<i>tetA</i>		<i>sull</i>		<i>intI1</i>	
	cópias/ml	DP	cópias/ml	DP	cópias/ml	DP	cópias/ml	DP	cópias/ml	DP
AF Ago/2019	5,6E+0 7	2,4E+0 6	7,0E+0 8	4,4E+0 7	1,1E+0 6	3,2E+0 4	5,5E+0 7	6,6E+0 5	3,3E+0 8	2,2E+0 7
EF Ago 2019	7,5E+0 6	4,0E+0 5	2,5E+0 8	3,6E+0 7	1,2E+0 6	5,9E+0 4	3,8E+0 7	8,5E+0 5	1,8E+0 8	2,5E+0 6
AF set/2019	1,0E+0 8	5,3E+0 6	1,4E+0 9	3,3E+0 8	1,3E+0 6	1,7E+0 5	8,7E+0 7	2,6E+0 6	3,7E+0 8	2,9E+0 7
EF set/2019	6,7E+0 6	2,9E+0 5	1,1E+0 9	2,2E+0 8	9,3E+0 5	5,9E+0 4	1,5E+0 7	3,0E+0 5	5,9E+0 7	2,5E+0 6
AF out/2019	4,9E+0 7	2,5E+0 6	7,3E+0 8	4,1E+0 8	6,8E+0 5	2,1E+0 4	5,2E+0 7	3,7E+0 6	1,9E+0 8	5,0E+0 6
EF out/2019	1,9E+0 6	7,1E+0 4	1,9E+0 8	1,2E+0 7	1,4E+0 5	3,0E+0 3	4,3E+0 6	8,3E+0 4	1,5E+0 7	1,7E+0 6
AF Nov/2019	6,9E+0 7	1,9E+0 7	1,2E+0 9	3,9E+0 8	1,4E+0 6	9,4E+0 3	9,1E+0 7	2,8E+0 6	4,6E+0 8	1,5E+0 7
EF Nov/2019	7,5E+0 6	2,3E+0 5	4,2E+0 8	7,2E+0 6	9,4E+0 5	3,7E+0 4	1,3E+0 7	2,4E+0 5	6,2E+0 7	6,2E+0 6
AF Dez/2019	1,6E+0 7	5,3E+0 5	1,8E+0 9	2,4E+0 8	5,3E+0 5	2,4E+0 4	2,3E+0 7	2,4E+0 6	1,1E+0 8	1,2E+0 7
EF Dez/2019	2,0E+0 6	3,3E+0 3	3,3E+0 8	8,7E+0 7	3,0E+0 5	1,8E+0 4	7,2E+0 6	1,8E+0 5	3,5E+0 7	2,5E+0 6
AF jan/2020	1,7E+0 7	2,2E+0 6	7,4E+0 8	2,0E+0 8	1,4E+0 6	2,7E+0 4	5,8E+0 7	9,8E+0 5	3,5E+0 8	9,2E+0 6
EF jan/2020	4,7E+0 6	3,4E+0 5	3,2E+0 8	7,4E+0 7	8,5E+0 5	5,1E+0 4	3,2E+0 7	3,4E+0 6	1,2E+0 8	9,5E+0 6

SISTEMA B (UASB/LAT)										
Amostra	<i>blaTEM</i>		<i>RNAr 16S</i>		<i>tetA</i>		<i>sull</i>		<i>intI1</i>	
	cópias/ml	DP	cópias/ml	DP	cópias/ml	DP	cópias/ml	DP	cópias/ml	DP
AF Ago/2019	5,6E+0 7	2,4E+0 6	7,0E+0 8	4,4E+0 7	1,1E+0 6	3,2E+0 4	5,5E+0 7	6,6E+0 5	3,3E+0 8	2,2E+0 7
EF UASB Ago 2019	2,9E+0 6	8,0E+0 4	1,8E+0 8	7,4E+0 7	9,2E+0 5	1,0E+0 5	2,3E+0 7	1,2E+0 6	3,8E+0 7	5,5E+0 6
EF LAT Ago 2019	1,2E+0 4	3,5E+0 3	4,4E+0 8	4,8E+0 7	9,5E+0 4	4,4E+0 3	2,5E+0 7	1,7E+0 6	1,4E+0 7	2,7E+0 6
AF set/2019	1,0E+0 8	5,3E+0 6	1,4E+0 9	3,3E+0 8	1,3E+0 6	1,7E+0 5	8,7E+0 7	2,6E+0 6	3,7E+0 8	2,9E+0 7

EF UASB set/2019	6,9E+0 6	1,8E+0 5	2,1E+0 8	7,9E+0 7	1,2E+0 6	2,7E+0 4	3,7E+0 7	5,4E+0 5	4,9E+0 7	1,3E+0 7
EF LAT set/2019	1,6E+0 4	1,8E+0 3	1,2E+0 8	3,1E+0 7	1,6E+0 5	1,7E+0 3	8,3E+0 6	4,4E+0 5	4,4E+0 6	9,1E+0 5
AF out/2019	4,9E+0 7	2,5E+0 6	7,3E+0 8	4,1E+0 8	6,8E+0 5	2,1E+0 4	5,2E+0 7	3,7E+0 6	1,9E+0 8	5,0E+0 6
EF UASB out/2019	1,1E+0 6	1,8E+0 4	3,0E+0 8	1,0E+0 8	2,5E+0 5	2,2E+0 4	1,0E+0 7	4,5E+0 4	1,6E+0 7	4,5E+0 6
EF LAT out/2019	2,2E+0 4	2,4E+0 3	2,5E+0 8	3,9E+0 7	7,5E+0 4	1,4E+0 3	9,5E+0 6	1,5E+0 5	1,6E+0 6	4,2E+0 5
AF Nov/2019	6,9E+0 7	1,9E+0 7	1,2E+0 9	3,9E+0 8	1,4E+0 6	9,4E+0 3	9,1E+0 7	2,8E+0 6	4,6E+0 8	1,5E+0 7
EF UASB Nov/2019	6,7E+0 6	2,1E+0 5	1,7E+0 8	4,8E+0 7	1,7E+0 6	6,4E+0 4	4,2E+0 7	1,1E+0 6	7,1E+0 7	9,1E+0 6
EF LAT Nov/2019	2,0E+0 4	5,2E+0 3	1,6E+0 8	4,2E+0 7	3,8E+0 4	6,3E+0 3	3,3E+0 7	1,9E+0 6	5,9E+0 6	1,2E+0 6
AF Dez/2019	1,6E+0 7	5,3E+0 5	1,8E+0 9	2,4E+0 8	5,3E+0 5	2,4E+0 4	2,3E+0 7	2,4E+0 6	1,1E+0 8	1,2E+0 7
EF UASB Dez/2019	1,4E+0 6	1,4E+0 5	5,8E+0 7	8,9E+0 6	1,7E+0 6	6,1E+0 4	1,3E+0 7	5,1E+0 5	1,4E+0 7	3,2E+0 6
EF LAT Dez/2019	4,3E+0 3	7,5E+0 2	8,4E+0 6	1,1E+0 6	1,3E+0 4	3,8E+0 3	6,8E+0 6	4,6E+0 5	2,6E+0 6	2,6E+0 5
AF jan/2020	1,7E+0 7	2,2E+0 6	7,4E+0 8	2,0E+0 8	1,4E+0 6	2,7E+0 4	5,8E+0 7	9,8E+0 5	3,5E+0 8	9,2E+0 6
EF UASB jan/2020	7,2E+0 6	2,1E+0 5	1,2E+0 8	2,7E+0 7	1,8E+0 6	3,3E+0 4	5,5E+0 7	4,2E+0 5	8,3E+0 7	2,3E+0 7
EF LAT jan/2020	1,2E+0 5	1,1E+0 4	1,5E+0 8	7,4E+0 6	2,8E+0 5	2,7E+0 4	5,3E+0 7	3,6E+0 6	2,8E+0 7	1,2E+0 6

SISTEMA B (UASB/LAT)

Amostra	<i>blaTEM</i>		<i>RNAr 16S</i>		<i>tetA</i>		<i>sulI</i>		<i>intI1</i>	
	cópias/ml	DP	cópias/ml	DP	cópias/ml	DP	cópias/ml	DP	cópias/ml	DP
AF Ago/2020 (C1)	3,5E+0 7	2,7E+0 5	1,1E+0 9	3,8E+0 7	1,4E+0 6	5,3E+0 4	1,1E+0 8	1,1E+0 7	2,3E+0 8	1,3E+0 7
EF UASB Ago/2020 (C1)	5,3E+0 6	2,5E+0 5	1,7E+0 8	1,3E+0 7	8,8E+0 5	5,1E+0 4	3,7E+0 7	3,6E+0 6	6,2E+0 7	8,9E+0 6
EF FBP Ago/2020 (C1)	1,9E+0 6	1,5E+0 5	4,7E+0 8	1,8E+0 8	9,7E+0 5	1,0E+0 5	6,5E+0 7	2,9E+0 6	4,8E+0 7	6,1E+0 6
AF Ago/2020 (C2)	6,3E+0 7	1,3E+0 7	2,1E+0 9	5,1E+0 8	2,4E+0 6	1,3E+0 5	1,6E+0 8	1,6E+0 6	2,9E+0 8	1,5E+0 6
EF UASB Ago/2020 (C2)	5,6E+0 6	1,0E+0 5	2,0E+0 8	4,1E+0 7	8,9E+0 5	9,7E+0 3	4,3E+0 7	1,2E+0 6	6,0E+0 7	1,2E+0 7
EF FBP Ago/2020 (C2)	4,2E+0 5	8,3E+0 3	1,3E+0 8	1,1E+0 7	2,8E+0 5	2,3E+0 4	1,1E+0 7	3,7E+0 5	1,0E+0 7	1,0E+0 6
AF Ago/2020 (C3)	4,6E+0 7	1,8E+0 6	1,4E+0 9	2,3E+0 8	1,7E+0 6	6,1E+0 4	1,2E+0 8	5,4E+0 6	2,1E+0 8	3,9E+0 7
EF UASB Ago/2020 (C3)	5,0E+0 6	1,2E+0 5	1,1E+0 8	2,6E+0 7	8,8E+0 5	5,9E+0 4	3,3E+0 7	3,3E+0 6	4,3E+0 7	7,3E+0 6
EF FBP Ago/2020 (C3)	1,0E+0 6	7,1E+0 4	1,2E+0 8	2,1E+0 7	6,3E+0 5	1,0E+0 4	2,0E+0 7	1,1E+0 6	2,2E+0 7	4,2E+0 6
AF Ago/2020 (C4)	6,7E+0 7	2,5E+0 6	2,4E+0 9	1,4E+0 8	2,6E+0 6	4,2E+0 5	1,6E+0 8	1,8E+0 7	3,8E+0 8	6,7E+0 7

EF UASB Ago/2020(C 4)	1,0E+0 7	1,5E+0 6	5,2E+0 8	4,0E+0 7	2,9E+0 6	3,1E+0 5	7,5E+0 7	2,4E+0 6	1,2E+0 8	1,4E+0 7
EF FBP Ago/2020 (C4)	2,5E+0 5	3,3E+0 4	5,4E+0 7	2,5E+0 6	4,5E+0 5	2,8E+0 4	3,2E+0 7	1,8E+0 6	1,7E+0 7	5,7E+0 6
AF set/2020 (C5)	5,3E+0 6	3,9E+0 5	1,1E+0 9	1,9E+0 8	3,0E+0 6	1,4E+0 5	1,6E+0 8	1,3E+0 7	3,0E+0 8	1,7E+0 7
EF UASB set/2020 (C5)	3,9E+0 5	5,2E+0 4	1,3E+0 8	2,0E+0 7	1,2E+0 6	1,1E+0 5	4,8E+0 7	4,1E+0 6	6,8E+0 7	1,2E+0 7
EF FBP set/2020 (C5)	4,9E+0 7	8,3E+0 6	1,0E+0 8	5,6E+0 6	3,9E+0 5	2,3E+0 4	4,5E+0 7	1,0E+0 6	3,5E+0 7	4,7E+0 6
AF set/2020 (C6)	8,0E+0 6	8,1E+0 5	8,4E+0 8	7,4E+0 7	3,5E+0 6	8,9E+0 4	1,5E+0 8	7,5E+0 6	3,2E+0 8	3,1E+0 7
EF UASB set/2020 (C6)	2,2E+0 5	2,5E+0 4	1,8E+0 8	4,7E+0 7	1,8E+0 6	8,2E+0 4	6,1E+0 7	4,6E+0 6	8,4E+0 7	1,1E+0 7
EF FBP set/2020 (C6)	1,9E+0 7	1,7E+0 6	4,4E+0 7	3,5E+0 6	2,8E+0 5	7,0E+0 3	1,3E+0 7	1,1E+0 6	1,1E+0 7	2,6E+0 6
AF nov/2020 (C7)	1,9E+0 7	1,7E+0 6	1,5E+0 9	1,4E+0 7	1,8E+0 6	3,1E+0 4	1,1E+0 8	2,4E+0 6	1,9E+0 8	1,9E+0 7
EF UASB nov/2020 (C7)	1,0E+0 7	1,2E+0 6	1,1E+0 9	1,6E+0 8	1,6E+0 6	4,9E+0 4	7,3E+0 7	3,8E+0 6	1,3E+0 8	4,0E+0 6
EF FBP nov/2020 (C7)	2,0E+0 5	2,1E+0 4	2,8E+0 8	5,5E+0 6	2,3E+0 5	8,8E+0 3	3,2E+0 7	3,4E+0 6	4,2E+0 7	1,1E+0 7
AF nov/2020 (C8)	6,1E+0 7	2,4E+0 6	5,7E+0 9	1,7E+0 9	2,8E+0 6	2,9E+0 5	1,7E+0 8	1,3E+0 7	5,8E+0 8	4,8E+0 7
EF UASB nov/2020 (C8)	7,6E+0 6	5,8E+0 5	1,2E+0 9	3,0E+0 8	1,7E+0 6	9,7E+0 4	5,1E+0 7	1,9E+0 6	1,3E+0 8	7,8E+0 6
EF FBP nov/2020 (C8)	3,4E+0 4	4,7E+0 3	1,4E+0 8	1,0E+0 7	6,2E+0 4	6,8E+0 3	6,2E+0 7	8,2E+0 6	4,5E+0 7	3,0E+0 6
AF fev/2020 (C9)	6,9E+0 7	7,8E+0 6	9,6E+0 8	1,7E+0 8	3,0E+0 6	2,0E+0 5	1,9E+0 8	2,3E+0 7	3,4E+0 8	5,0E+0 7
EF UASB fev/2020 (C9)	3,7E+0 6	3,4E+0 5	1,1E+0 8	2,4E+0 7	1,0E+0 6	6,6E+0 4	3,8E+0 7	9,0E+0 5	3,2E+0 7	5,1E+0 5
EF FBP fev/2020 (C9)	1,8E+0 5	4,1E+0 3	8,8E+0 7	2,1E+0 7	5,5E+0 5	2,2E+0 4	2,3E+0 7	1,6E+0 6	2,8E+0 7	4,3E+0 6

AF: Afluente; EF: Efluente; C1-C9: coletas 1 a 9; DP: Desvio padrão.

APÊNDICE B – ESTATÍSTICA DESCRITIVA DAS QUANTIFICAÇÕES DOS GENES RELATIVAS A TODO PERÍODO DE AMOSTRAGEM.

Tabela B1 - Estatística descritiva das quantificações absolutas dos genes, considerando todas as amostras quantificadas.

Ponto de Coleta	Gene	Wetland (n=6)		
		Média	Mediana	Desvio padrão
Afluente	<i>RNAr 16S</i>	9,83E+08	1,09E+09	4,40E+08
	<i>blaTEM</i>	5,22E+07	5,13E+07	3,19E+07
	<i>IntI1</i>	3,40E+08	3,03E+08	1,26E+08
	<i>Sull</i>	1,82E+07	2,72E+07	2,09E+07
	<i>tetA</i>	1,18E+06	1,06E+06	3,71E+05
Efluente final	<i>RNAr 16S</i>	3,28E+08	4,31E+08	3,23E+08
	<i>blaTEM</i>	5,72E+06	5,07E+06	2,61E+06
	<i>IntI1</i>	6,10E+07	7,94E+07	6,18E+07
	<i>Sull</i>	2,84E+07	2,70E+07	1,94E+07
	<i>tetA</i>	8,90E+05	7,19E+05	4,01E+05
UASB-LAT (n=6)				
Afluente	<i>RNAr 16S</i>	9,83E+08	1,09E+09	4,40E+08
	<i>blaTEM</i>	5,22E+07	5,13E+07	3,19E+07
	<i>IntI1</i>	3,40E+08	3,03E+08	1,26E+08
	<i>Sull</i>	1,82E+07	2,72E+07	2,09E+07
	<i>tetA</i>	1,18E+06	1,06E+06	3,71E+05
Efluente UASB	<i>RNAr 16S</i>	1,75E+08	1,74E+08	8,31E+07
	<i>blaTEM</i>	4,79E+06	4,37E+06	2,89E+06
	<i>IntI1</i>	4,39E+07	4,88E+07	2,46E+07
	<i>Sull</i>	4,72E+07	5,05E+07	3,38E+07
	<i>tetA</i>	1,46E+06	1,27E+06	6,08E+05
Efluente final	<i>RNAr 16S</i>	1,53E+08	1,87E+08	1,44E+08
	<i>blaTEM</i>	1,78E+04	3,27E+04	4,42E+04
	<i>IntI1</i>	1,00E+07	1,13E+07	9,58E+06
	<i>Sull</i>	2,34E+07	2,73E+07	1,79E+07
	<i>tetA</i>	8,50E+04	1,10E+05	9,61E+04
UASB-FBP (n=9)				
Afluente	<i>RNAr 16S</i>	1,91E+09	1,44E+09	1,51E+09
	<i>blaTEM</i>	5,07E+07	4,93E+07	1,64E+07
	<i>IntI1</i>	3,14E+08	3,00E+08	1,15E+08
	<i>Sull</i>	1,49E+08	1,59E+08	2,80E+07
	<i>tetA</i>	2,46E+06	2,60E+06	6,93E+05
Efluente UASB	<i>RNAr 16S</i>	4,16E+08	1,78E+08	4,40E+08
	<i>blaTEM</i>	6,72E+06	5,56E+06	2,29E+06
	<i>IntI1</i>	8,15E+07	6,75E+07	3,80E+07
	<i>Sull</i>	5,13E+07	4,83E+07	1,55E+07

	<i>tetA</i>	1,43E+06	1,21E+06	6,70E+05
Efluente final	<i>RNAr 16S</i>	1,62E+08	1,21E+08	1,32E+08
	<i>blaTEM</i>	5,07E+05	2,53E+05	5,78E+05
	<i>IntI1</i>	2,88E+07	2,80E+07	1,45E+07
	<i>Sul1</i>	3,36E+07	3,18E+07	1,99E+07
	<i>tetA</i>	4,26E+05	3,93E+05	6,70E+05

Tabela B2 - Estatística descritiva das quantificações relativas ao *RNAr 16S*, considerando todas as amostras quantificadas.

Ponto de coleta	Gene	Wetlands Construídas		
		Mediana	média	DP
Afluente	<i>blaTEM</i>	0,06	0,05	0,03
	<i>intI1</i>	0,32	0,32	0,16
	<i>sul1</i>	0,02	0,03	0,027
	<i>tetA</i>	0,001	0,001	0,0006
Efluente final	<i>blaTEM</i>	0,012	0,014	0,0089
	<i>intI1</i>	0,13	0,25	0,26
	<i>sul1</i>	0,08	0,09	0,065
	<i>tetA</i>	0,0016	0,002	0,0015
UASB/LAT				
Afluente	<i>blaTEM</i>	0,06	0,05	0,03
	<i>intI1</i>	0,32	0,32	0,16
	<i>sul1</i>	0,02	0,03	0,027
	<i>tetA</i>	0,001	0,001	0,0006
Efluente UASB	<i>blaTEM</i>	0,028	0,029	0,019
	<i>IntI1</i>	0,33	0,37	0,25
	<i>Sul1</i>	0,32	0,3	0,17
	<i>tetA</i>	0,008	0,011	0,01
Efluente LAT	<i>blaTEM</i>	0,00012	0,00028	0,0003
	<i>IntI1</i>	0,036	0,33	0,68
	<i>Sul1</i>	0,19	0,31	0,35
	<i>tetA</i>	0,0008	0,0009	0,0007
UASB/FBP				
Afluente	<i>blaTEM</i>	0,032	0,04	0,027
	<i>IntI1</i>	0,15	0,21	0,1
	<i>sul1</i>	0,076	0,1	0,06
	<i>tetA</i>	0,001	0,004	0,007
Efluente UASB	<i>blaTEM</i>	0,03	0,028	0,014
	<i>IntI1</i>	0,3	0,31	0,14
	<i>Sul1</i>	0,33	0,24	0,14
	<i>tetA</i>	0,005	0,006	0,003
Efluente FBP	<i>blaTEM</i>	0,0033	0,0033	0,0024
	<i>IntI1</i>	0,19	0,22	0,095
	<i>Sul1</i>	0,26	0,28	0,16

	<i>tetA</i>	0,0038	0,0036	0,0023
--	-------------	--------	--------	--------

Tabela B3 - Resultado das quantificações afluentes e efluentes ao fotorreator nas três faixas de dose de radiação adotadas.

Faixa da dose*	Ponto	<i>RNAr 16S</i>	<i>blaTEM</i>	<i>IntII</i>	<i>tetA</i>	<i>sulI</i>
A	Afluente	1,51E+08	1,54E+05	3,03E+07	5,29E+05	2,49E+07
	Efluente	6,05E+07	5,02E+04	8,04E+06	2,79E+05	1,20E+06
B	Afluente	2,20E+08	7,06E+04	4,87E+07	3,34E+05	4,30E+07
	Efluente	6,05E+07	6,81E+04	7,24E+06	7,89E+04	1,05E+07
C	Afluente	2,91E+08	3,01E+04	4,83E+07	1,52E+05	5,61E+07
	Efluente	1,57E+08	2,96E+03	1,71E+07	1,91E+04	1,36E+07

*.,°0o Resultados em mediana.

Tabela B4 - Remoções em log de cada componente dos sistemas A (UASB/FBP), B(UASB/LAT) e C(Wetlands construídas).

Gene*	Wetlands Construídas	UASB (Sistema B)	LAT	UASB (Sistema C)	FBP
<i>blaTEM</i>	0,45	1,12	2,43	0,9	1,3
<i>RNAr 16S</i>	0,94	0,8	0,055	0,8	0,2
<i>intII</i>	0,66	0,84	0,75	0,64	0,47
<i>sulI</i>	-0,095	-0,25	0,37	0,52	0,22
<i>tetA</i>	0,19	-0,04	0,93	0,29	0,29

*Resultados em mediana

APÊNDICE C – RESULTADOS DOS TESTES DE HIPÓTESES.

Tabela C1 - Valores de p resultantes dos testes de wilcoxon para comparação entre o esgoto afluente e efluente a cada componente dos sistemas A, B e C.

Gene	Valores de p para comparação entre concentrações absolutas.				
	Wetlands	UASB (Sistema B)	LAT	UASB (Sistema C)	FBP
<i>RNAr 16S</i>	0.03125*	0.03125*	0.6875	0,0039*	0,074
<i>blaTEM</i>	0.03125*	0.03125*	0.03125*	0,0039*	0,0039*
<i>tetA</i>	0.0625	0.6875	0.03125*	0,012*	0,0078*
<i>intI1</i>	0.03125*	0.03125*	0.03125*	0,039*	0,0039*
<i>sulI</i>	1	0.0625	0.3125	0,0039*	0,074
Valores de p para comparação entre concentrações relativas ao <i>RNAr 16 S</i>					
<i>blaTEM</i>	0.03125	0,219	0.03125	0,0547	0,0039
<i>tetA</i>	0.1563	0,0625	0.03125	0,129	0,0039
<i>intI1</i>	0.5625	0,843	0.4375	0,027	0,203
<i>sulI</i>	0.09375	0,0312	1	0,008	0,82

*Valores abaixo do nível de significância de 0,05.

Tabela C2 - Valores de p resultantes dos testes de hipótese de kruskal wallis e Dunn para comparação entre os três sistemas.

Teste	Sistemas	<i>RNAr 16S</i>	<i>blaTEM</i>	<i>intI1</i>	<i>sulI</i>	<i>tetA</i>
Kruskal Wallis	UASB/FBP, UASB/LAT e Wetlands	0,025*	0,0005*	0,0086*	0,0315*	0,0035*
Comparações múltiplas de Dunn	UASB/FBP e UASB/LAT	0,28	0,057	0,15	0,078*	0,28
	UASB/FBP e Wetlands	0,02*	0,035*	0,11	0,078*	0,025*
	UASB/LAT e Wetlands	0,27	0,00028*	0,0064*	0,96	0,0034*

*Valores abaixo do nível de significância de 0,05.