

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA CIVIL

Bárbara Werle Nunes Grehs

**REMOÇÃO DE BACTÉRIAS E GENES DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS EM  
ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUAIS URBANAS**

Santa Maria, RS  
2019

**Bárbara Werle Nunes Grehs**

**REMOÇÃO DE BACTÉRIAS E GENES DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS EM  
ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUAIS URBANAS**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Engenharia Civil**.

Orientador: Prof. Dr. Elvis Carissimi  
Coorientadora: Prof. Dra. Maria Angélica Oliveira Linton

Santa Maria, RS  
2019

## Ficha catalográfica

Grehs, Bárbara Werle Nunes  
Remoção de Bactérias e Genes de Resistência a  
Antibióticos em Estações de Tratamento de Águas Residuais  
Urbanas / Bárbara Werle Nunes Grehs.- 2019.  
97 p.; 30 cm

Orientador: Elvis Carissimi  
Coorientadora: Maria Angélica Oliveira Linton  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em  
Engenharia Civil, RS, 2019

1. Bactérias resistentes a antibióticos 2. Genes de  
resistência a antibióticos 3. Estação de tratamento de  
águas residuais 4. Sulfato de alumínio 5. Tanino I.  
Carissimi, Elvis II. Oliveira Linton, Maria Angélica  
III. Título.

sistema de geração automática de ficha catalográfica da unsm. dados fornecidos pelo  
autor(a). sob supervisão da direção da divisão de processos técnicos da biblioteca  
central. biblioteca responsável paula schoenfeldt satta cxa 10/1728.

**Bárbara Werle Nunes Grehs**

**REMOÇÃO DE BACTÉRIAS E GENES DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS EM  
ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUAIS URBANAS**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Engenharia Civil**.

**Aprovado em 28 de fevereiro de 2019:**

---

**Elvis Carissimi, Dr. (UFSM)**  
(Presidente/Orientador)

---

**Maria Angélica Oliveira Linton, Dra. (UFSM)**  
(Coorientadora)

---

**Andressa de Oliveira Silveira, Dr<sup>a</sup>. (UFSM)**



---

**Bárbara Estevão Clasen, Dra. (UERGS)**

---

**Noeli Julia Schussler de Vasconcellos, Dr<sup>a</sup>. (UFN)**

---

**Victor Alcaráz-Gonzalez, Dr. (UdG)**

Santa Maria, RS  
2019

## AGRADECIMENTOS

Mais do que uma jornada educacional este curso de doutorado foi também uma grande experiência de vida, com a participação de familiares, amigos e profissionais que contribuíram de muitas formas. Seja com o suporte necessário para que eu pudesse me dedicar ao curso, com palavras de apoio e incentivo, mas também com esforço e muito trabalho.

Agradeço a UFSM por ter me acolhido em 2012, quando iniciei o mestrado no Programa de Pós Graduação em Engenharia Ambiental. Foi também durante este período que tive a felicidade de ser acolhida pelo Prof. Elvis e pela Prof. Maria Angélica, que não somente me orientaram mas também se tornaram grandes amigos, e seguiriam sendo os meus mentores durante o doutorado. Certamente não poderia ter encontrado profissionais mais dedicados para esta jornada. Muito obrigada aos dois!

Também presto os meus mais sinceros agradecimentos a todos os profissionais envolvidos durante o meu período de doutorado sanduíche na Universidade do Porto, em Portugal. Sem dúvida alguma esta foi uma experiência incrível, não somente academicamente, mas também de vida, contribuindo para o meu crescimento pessoal e profissional. Agradeço especialmente a Prof. Olga Nunes que me orientou durante este período, e também aos colegas de laboratório Nuno Moreira e a Ana Rita Lopes, que não mediram esforços para a realização desta pesquisa.

Não poderia deixar de agradecer aos meus familiares que foram os meus grandes apoiadores e incentivadores. Especialmente minha mãe Marlise que sempre me inspirou a evoluir, buscar novos desafios e nunca desistir. Aos meus sogros sempre tão presentes e atenciosos, a minha irmã Dara muito prestativa aos inúmeros pedidos de ajuda com a tese. E ao meu irmão Jeferson (*in memoriam*) que nos deixou em 2016, mas me presentou com a lição de que não importa o quão impossível seja o seu sonho, ou o quanto você falhe para chegar lá, ou até mesmo que você realmente nunca consiga alcançá-lo, o importante é ter e amar o seu propósito. Pois a felicidade da vida se encontra no meio da jornada e não no fim.

Por último, mas não menos importante agradeço ao meu marido Murilo, que sem dúvida alguma foi o meu maior incentivador e encarou este desafio comigo. Obrigada por todo amor e dedicação, sem você a realização deste sonho não seria possível.

*MUITO OBRIGADA!*

## RESUMO

### REMOÇÃO DE BACTÉRIAS E GENES DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS EM ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUAIS URBANAS

AUTORA: Bárbara Werle Nunes Grehs

ORIENTADOR: Elvis Carissimi

COORIENTADOR: Maria Angelica Oliveira Linton

O aumento da resistência bacteriana a antibióticos é um tema de grande preocupação para a saúde pública e ambiental, ocasionado principalmente pelo uso indiscriminado de antibióticos e pela disposição final incorreta de medicamentos. Dentro desse contexto, as Estações de Tratamento de Águas Residuais - ETAR são um ponto de grande interesse, pois atuam como reservatórios de Bactérias Resistentes a Antibióticos - ARB e Genes de Resistência a Antibióticos - ARG, que posteriormente liberam altas cargas de resistência bacteriana nos corpos hídricos receptores. O reconhecimento de que as ETAR atuam com pressões seletivas nos micro-organismos e favorecem a transferência horizontal de genes, aumentando a abundância de genes de resistência é motivo de apreensão. Baseado no atual estado da arte, este estudo conclui que melhorias nas tecnologias de tratamento das águas residuais são necessárias, não apenas na remoção de sólidos, nutrientes e matéria orgânica, mas também na remoção de resíduos de antibióticos e micro-organismos resistentes. Este trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade da agregação, com sulfato de alumínio e tanino, de reduzir a carga de ARB e ARG em efluentes urbanos tratados, provenientes de uma Estação de Tratamento de Águas Residuais Urbanas – ETARU, assim como, verificar o impacto do tratamento na estrutura e diversidade da comunidade bacteriana. Também foi avaliada a capacidade de reativação dos micro-organismos após período de armazenamento. Ambos os coagulantes reduziram a carga dos organismos procarióticos, incluindo ARB, entretanto apenas o sulfato de alumínio foi eficaz na remoção dos ARG analisados, e ambos os coagulantes promoveram alterações na comunidade bacteriana, em comparação ao efluente não coagulado.

**Palavras-chave:** resistência bacteriana, tratamento de águas residuais, coagulação.

## ABSTRACT

### REMOVAL OF ANTIBIOTICS RESISTANT BACTERIA AND RESISTENCE GENES AT URBAN WASTEWATER TREATMENT PLANTS

AUTHOR: Bárbara Werle Nunes Grehs

ADVISOR: Elvis Carissimi

CO-ADVISOR: Maria Angelica Oliveira Linton

The spread of antibiotics bacterial resistance is a subject of great concern for public and environmental health, caused mainly by the indiscriminate use of antibiotics and the incorrect discard of medicines. In this context, Wastewater Treatment Plants (WWTP) are a particular point of interest, because they act as reservoirs for antibiotic resistant bacteria (ARB) and antibiotic resistance genes (ARG), which subsequently release high loads of bacterial resistance on the waterbodies receptors. The recognition that the WWTPs act with selective pressures on the microorganisms and favor the horizontal transfer of genes, increasing the abundance of resistance genes, causes seizure. Based on the current state of the art, this study concludes that improvements in wastewater treatment technologies are necessary, not only in the removal of solids, nutrients and organic matter, but also in the removal of residues of resistant antibiotics and microorganisms. The main goal of this work was to evaluate the aggregation capacity, with aluminum sulfate and tannin, to reduce the ARB and ARG loading in treated urban effluents from an Urban Waste Water Treatment Plant (UWWTP), as well as, verify the impact of the treatment on the structure and diversity of the bacterial community and evaluate the ability to reactivate the microorganisms after storage period. It was noticed that both coagulants reduced the prokaryotic organisms loading, including ARB, however only aluminum sulphate was effective in the removal of analyzed ARGs. Also, both coagulants promoted changes in the bacterial community compared to uncoagulated effluent.

**Keywords:** Bacterial resistance, wastewater treatment, coagulation.

## LISTA DE FIGURAS

### APRESENTAÇÃO

- Figura 1** - Número de publicações por ano utilizando como palavras-chave: remoção de bactérias resistentes a antibióticos e genes de resistência a antibióticos em estações de tratamento de águas residuais. (do inglês: *removal ARB and ARG in WWTP*).....20
- Figura 2** - Desenho experimental das coletas e alíquotas obtidas durante a primeira e segunda fase do estudo de investigação.....23
- Figura 3** - Ensaio de coagulação/floculação utilizando sulfato de alumínio e tanino.....24
- Figura 4** - Bancada de trabalho para filtração das amostras e cultivo em meios de cultura selecionados.....25
- Figura 5** - Esquema demonstrativo das diluições seriadas e volumes utilizados para cada tipo de alíquota e meio de cultivo.....26
- Figura 6** - Unidades formadoras de colônia em meio mFC utilizando o método de filtração por membrana.....26

### ARTIGO 1

- Figura 1**- Principais mecanismos de resistência bacteriana.....35
- Figura 2** - Esquema genérico de uma Planta de Tratamento de Águas Residuais Urbanas com: pré-tratamento, tratamento primário, tratamento secundário e tratamento terciário.....38

### ARTIGO 2

- Figure 1** - Total heterotrophs (HET) and faecal coliforms (FC) and their antibiotic resistant counterparts (FC/AMX, FC/CIP) in Secondary Treated Wastewater (STWW) and in treated STWW using aluminium sulphate (Alu) or tannin (Tan) as coagulants.....82
- Figure 2** - Abundance of the genes 16S rRNA, *int11*, *bla<sub>TEM</sub>* and *qnrS* in the Secondary Treatment Wastewater (STWW) and in treated STWW using aluminium sulphate (Alu) or tannin (Tan) as coagulant.....83
- Figure 3** - Relative abundance of (a) classes and (b) genera, in the initial STWW samples and in the samples after the coagulation treatments (Alu, Tan).....84



**Figure 4** -Relative abundance of (a) classes and (b) genera in the initial STWW samples and treated wastewater samples following storage at room temperature conditions (RSTWW, RAlu and RTan).....85

**Figure 5** - Biplot of principal coordinates analysis (PCoA) based on weighted-unifrac distances of the initial STWW, wastewater samples after coagulation treatments (Alu, Tan) and treated wastewater samples following storage (RSTWW, RAlu, Rtan).....86

**Figure S1** - Relative abundance of orders (a) in the initial STWW samples and in the samples after the coagulation treatments (Alu, Tan) and (b) in the initial STWW samples and treated wastewater samples following storage at room temperature conditions (RSTWW, RAlu and RTan).....88

## LISTA DE TABELAS

### APRESENTAÇÃO

<b>Tabela 1</b> - Condições utilizadas nas análises de qPCR.....	27
--	----

### ARTIGO 2

<b>Table 1</b> - Physicochemical properties of the analysed samples. Values are means $\pm$ standard deviation(n=3).....	80
--	----

<b>Table 2</b> - Alpha diversity indices of the analysed samples. Values are means $\pm$ standard deviation(n = 3 and n=2*).....	81
--	----

<b>Table S1</b> - Target genes and conditions used in the qPCR assays.....	87
--	----

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	5
<b>ABSTRACT</b> .....	7
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	8
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	10
<b>1 APRESENTAÇÃO</b> .....	13
1.3 PROPOSIÇÃO.....	19
1.3.1 Objetivo.....	20
1.3.2 Objetivos específicos.....	21
1.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
1.4.1 Ensaio de Coagulação.....	23
1.4.2 Análises Microbiológicas.....	24
<b>2 ARTIGO 1 - Resistência a Antibióticos em Estações de Tratamento de Águas Residuais: Compreensão do Problema e Perspectivas Futuras</b> .....	29
RESUMO.....	29
ABSTRACT.....	30
1. Introdução.....	31
2. Contaminação Ambiental por Antibióticos.....	32
3. Impacto na Saúde Humana.....	33
4. Mecanismos de Resistência Bacteriana a Antibióticos.....	34
4.1 Bases Moleculares de Resistência Bacteriana.....	36
5. Estações de Tratamento de Águas Residuais e Resistência Bacteriana.....	37
5.1 Plantas de Tratamento de Águas Residuais.....	38
6. Técnicas de Identificação e Monitoramento de ARB e ARG em ETAR.....	41
6.1 Métodos dependentes de cultivo.....	41
6.2 Métodos independentes de cultivo.....	42
7. Remoção de ARB e ARG em Plantas de Tratamento de Águas Residuais.....	46
8. Considerações Finais.....	47
Referências.....	50
<b>3 ARTIGO 2 - Removal of microorganisms and antibiotic resistance genes from treated urban wastewater: a comparison between aluminium sulphate and tannin coagulants</b> .....	59
HIGHLIGHTS.....	60
ABSTRACT.....	60
1. Introduction.....	62
2. Material and methods.....	63

2.1. Sampling and experimental design.....	64
2.2. Coagulation assays .....	64
2.3. Enumeration of cultivable microorganisms .....	65
2.4 DNA extraction .....	66
2.5 Quantification of antibiotic resistance genes.....	66
2.6 Bacterial community analysis .....	66
2.8 Data Availability .....	68
3.1 Turbidity and organic carbon removal .....	68
3.2. Cultivable bacterial removal and reactivation.....	69
3.3. Effect of coagulation on ARGs and bacterial community composition.....	70
4. Conclusions .....	73
Acknowledgements .....	74
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	90
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	92
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	94

## 1 APRESENTAÇÃO

As relações entre os seres vivos e o meio ambiente formam conexões complexas que afetam direta e indiretamente os ecossistemas. O impacto das ações humanas sejam elas positivas ou negativas não são sentidas apenas localmente, as consequências podem afetar um bioma específico, uma população isolada, assim como podem vir a se tornar um problema mundial. Um exemplo claro são as mudanças climáticas, que afetam o planeta na totalidade, independente da nação que seja responsável pela poluição, todos os países podem vir a sofrer com os seus efeitos (WWF, 2019).

A problemática envolvendo a resistência bacteriana se assemelha a este cenário. Pois o uso indiscriminado de antibióticos em humanos e animais não afetam somente os indivíduos que fizeram o uso do medicamento, a resistência bacteriana pode ser difundida para outros indivíduos e para o meio ambiente, criando um ciclo difícil de ser interrompido. Em consequência do aumento da resistência bacteriana temos internações hospitalares mais longas, maiores custos médicos e um crescente número de óbitos provenientes de infecções por micro-organismos resistentes ou multirresistentes, que não respondem aos antibióticos atualmente existentes (Fiocruz, 2017). O que se tornou um grave problema de saúde pública mundial, que demanda urgência na revisão de políticas públicas que visem combater o uso indiscriminado de antibióticos, bem como o desenvolvimento de soluções que auxiliem no combate da disseminação da resistência bacteriana no meio ambiente (WHO, 2015).

A presença de antibióticos, bactérias resistentes a antibióticos e genes de resistência a antibióticos em estações de tratamento de águas de abastecimento e águas residuais é reportada mundialmente (Manaia et al., 2018). O impacto do processo de tratamento das águas na resistência bacteriana ainda está sob investigação, mas não se pode negar o fato de que as plantas de tratamento são ponto-chave para conter a dispersão deste preocupante fenômeno.

Tratamentos com radiação ultravioleta, catálise, ozonização e cloração já foram propostos por diversos pesquisadores e apresentaram bons resultados (Lamba e Ahammad, 2017). Entretanto, a reativação de micro-organismos com potencial resistência bacteriana após o tratamento ainda é um fator limitante (Becerra-Castro et al., 2016; Jia et al., 2015; Moreira et al., 2018). A agregação de partículas em suspensão a partir do uso de substâncias coagulantes é prática comum em plantas de tratamento de águas de abastecimento e águas residuais (Sillanpää et al., 2018). Porém, o estudo dessa técnica para avaliar o potencial de remoção de

micro-organismos e genes de resistência a antibióticos ainda é escasso. A investigação parte do princípio de que um percentual das bactérias fica adsorvido a partículas orgânicas e inorgânicas e com a agregação destas partículas e posterior remoção por sedimentação ou flotação, é possível a remoção de micro-organismos e genes de resistência a antibióticos.

Dessa maneira, essa tese buscou contextualizar a temática da resistência bacteriana no ambiente das plantas de tratamento de águas residuais e avaliar os efeitos de dois coagulantes em bactérias e genes de resistência selecionados, provenientes dos efluentes de uma estação de tratamento de águas residuais urbanas.

## 1.2 REFERENCIAL TEÓRICO

A água mais do que vital a vida, é também peça chave no desenvolvimento socioeconômico das populações. Serve como indicador de parâmetros multivariados, como produtividade, saúde, desenvolvimento e econômico. Mais do que planejar o uso racional da água como recurso estratégico, o tratamento das águas residuais é imprescindível para assegurar o desenvolvimento sustentável das populações. No Brasil, apenas 45% do esgoto gerado recebe tratamento adequado e 35 milhões de brasileiros ainda não possuem acesso à água potável, de acordo com relatório do Instituto Trata Brasil, que utilizou os dados mais recentes disponibilizados pelo Sistema Nacional de Informação sobre Saneamento (SNIS), referentes ao ano de 2016, (Trata Brasil, 2018). Em comparação ao ano de 2011, houve uma evolução de 0,9 ponto percentual no atendimento a água potável e 7,4% no tratamento de esgoto. Um ritmo lento para universalizar o saneamento básico e alcançar o acesso a saneamento e higiene adequados e equitativos para todos.

O ciclo urbano da água consiste na integração das etapas de: captação da água em corpos hídricos; tratamento em estações de tratamento de água; distribuição da água para abastecimento humano; recolhimento e o transporte para o tratamento em estações de tratamento de águas residuais e por fim, a devolução aos corpos hídricos. O tratamento das águas residuais visa à melhora do efluente final, diminuindo a presença de contaminantes que podem impactar os sistemas aquáticos e a saúde humana. Diversos são os métodos para o tratamento de efluentes, que comumente integram processos (químicos e biológicos) e operações que se organizam em níveis de tratamento: preliminar, primário, secundário e terciário (Pituco, 2017).

O tratamento preliminar tem por finalidade a remoção de sólidos grosseiros, areias e gorduras, cuja presença acarreta problemas de manutenção e funcionamento das diferentes operações, processos e sistemas auxiliares. Já o tratamento primário é constituído por operações físicas, que removem principalmente sólidos sedimentáveis e uma parte de matéria orgânica em suspensão, podendo integrar uma etapa de coagulação/floculação, que envolve o uso de agentes químicos, sintéticos ou naturais, para desestabilizar as partículas coloidais e promover a formação de flocos sedimentáveis ou flotáveis. O tratamento secundário é efetuado predominantemente por processos biológicos através da degradação da matéria orgânica pela ação de micro-organismos. Estes processos podem ser aeróbios, anaeróbios, anóxicos ou facultativos. Uma das aplicações técnicas destes processos é o sistema de lodo ativado, que basicamente consiste na oxidação da matéria orgânica por meio de bactérias aeróbias. Neste sistema a recirculação da biomassa é parte integrante do processo (Metcalf e Eddy, 2013; WEF, 2007).

O tratamento terciário tem sido cada vez mais considerado como medida para obter um efluente final tratado de alta qualidade. Para isso, o tratamento visa além da remoção de compostos orgânicos facilmente metabolizados, a isenção de nutrientes como nitrogênio e fósforo; a remoção de micropoluentes químicos recalcitrantes; e obtenção de cargas microbiológicas extremamente baixas (Henze et. al, 2008). Considerando os altos custos envolvidos na remoção de micropoluentes químicos, a maioria das ETAR, que incluem uma etapa adicional de tratamento terciário, operam com uma etapa de desinfecção do efluente secundário antes do lançamento no corpo hídrico receptor. Cloração, radiação UV e ozonização são as tecnologias de desinfecção mais comumente aplicadas atualmente (EEA, 2007).

A coagulação é um processo que consiste na desestabilização das partículas coloidais ou neutralização das moléculas de substâncias húmicas, através de fenômenos químicos e físicos. Durante o processo químico, ocorrem às reações do coagulante com a água e a formação de espécies hidrolisadas com carga positiva, ou precipitados do coagulante usado. Posteriormente ocorre o processo físico que consiste no transporte das espécies hidrolisadas, ou dos precipitados, para que haja contato com as impurezas presentes na água, de maneira que formem aglomerados maiores, capazes de serem removidos por sedimentação ou flotação (Di Bernardo et al., 2008).

A escolha do coagulante e a dose a ser utilizada dependem de uma série de fatores como: características do coagulante; concentração e o tipo de partículas; características de

matéria orgânica natural – NOM; temperatura da água; e de outros constituintes da água bruta, como pH, alcalinidade e fósforo. Portanto não há uma abordagem formal para incorporar essa coleção de variáveis no processo de seleção, sendo importante a realização do teste de jarros e a experiência profissional para determinar a escolha do produto e a metodologia de uso (Davis, 2017). A presença de partículas e matéria orgânica dissolvida, conhecida como matéria orgânica natural (NOM – natural organic matter), um produto da decomposição e lixiviação de detritos orgânicos. Apresenta um papel importante no tratamento da água, pois é precursora da formação de subprodutos de desinfecção. Portanto, embora o principal objetivo da coagulação seja a remoção do material coloidal e em suspensão, a precipitação de NOM dissolvida é um objetivo simultâneo de relevada importância (Davis, 2017).

As partículas coloidais e em suspensão possuem uma carga de superfície que faz com que as mesmas não se agreguem. A maior parte das partículas na água possui carga elétrica negativa, portanto o objetivo da coagulação é gerar a desestabilização das partículas, de forma que permita o seu agrupamento. Esse processo ocorre através do resultado individual ou combinado de quatro mecanismos: compreensão da dupla camada elétrica; adsorção e neutralização; varredura; e adsorção e formação de pontes. No mecanismo da varredura, as dosagens de coagulante e pH são relativamente altas (acima de 15 mg/L), com presença de excesso de precipitados de alumínio ou ferro, causando o emaranhamento das impurezas entre eles. Já o mecanismo de adsorção e neutralização decorre do precipitado com carga positiva ou de espécies hidrolisadas positivas, caracterizando-se por dosagens de coagulante e pH menores.

Conjuntamente com o uso de coagulante pode haver a adição de auxiliares de coagulação (materiais particulados insolúveis) e floculantes (polímeros), assim como o uso de soluções ácidas e básicas para ajuste de pH. Estas substâncias e materiais são utilizados em condições específicas para potencializar o processo de remoção de impurezas, seja na redução da dose de coagulante ou para acelerar o processo (Di Bernardo et al., 2011). Já na etapa de floculação ocorre o agrupamento dos pequenos flocos provenientes da agregação, formando flocos maiores e mais estáveis que sedimentam com mais facilidade. A mistura é o principal mecanismo para a floculação, pois a agitação de água contendo partículas cria gradientes de velocidade que provocam a colisão de partículas. São utilizados dois tipos de mistura com diferentes finalidades, a mistura rápida é aplicada para a dispersão do coagulante na água bruta e a mistura lenta é empregada para flocular a água coagulada. O gradiente de velocidade



e o tempo de mistura são fatores essenciais para a eficácia do processo de coagulação/floculação (Davis, 2017).

O sulfato de alumínio ( $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ ) é o coagulante mais utilizado em Estações de Tratamento de Água – ETA. Essa ampla utilização é devida à eficiência do reagente no processo de coagulação das partículas, baixo custo, ampla distribuição geográfica do produto e facilidade operacional dos trabalhadores já habituados com a técnica. Uma enorme variedade de reagentes naturais e sintéticos com potencial aplicação para coagulação/floculação no tratamento de água vêm sendo estudados. Nomeados de coagulantes poliméricos verdes, ou coagulantes orgânicos, alguns já foram bem estudados como os taninos; *Moringa oleífera*; e a quitosana; outros nem tanto, como sementes de feijão; *Actinobacteria*; derivados de amido; espécies de cactos; dentre outros, são tido como promissores (Chun-Yang Yin, 2010; Oladoja, 2015).

Choy et al. (2014) apresentaram um trabalho com o resumo de pesquisa de 21 tipos de plantas com propriedades coagulantes naturais, classificados em: frutas, cactos, cereais, fungos, nozes, arbustos e especiarias. Entre tantas possibilidades, o Brasil dispõe em escala comercial para o tratamento da água, tanino proveniente da casca da árvore Acácia Negra, um polímero orgânico-catiônico de baixo peso molecular, de origem essencialmente vegetal, que atua como: coagulante/floculante e auxiliar de coagulação no tratamento de águas em geral. O tanino age em sistemas de partículas coloidais, neutralizando cargas e formando pontes entre estas partículas, sendo este o processo responsável pela formação de flocos e consequente sedimentação (Graham, et al., 2008).

A presença de micro-organismos resistentes a antibióticos em diferentes sítios é uma constatação que vem causando enorme preocupação aos pesquisadores (Cytryn, 2013., Ma et al., 2014). A resistência antibiótica é um fenômeno natural em que os micro-organismos conseguem resistir ao efeito de um antibiótico ou antimicrobiano devido às mutações e à grande capacidade das bactérias em transferir seu material genético, existindo uma clara correlação entre o uso de antibióticos e a resistência bacteriana (Mosquito, 2011). Dentre a enorme diversidade de micro-organismos que compõe a microbiota dos efluentes, as enterobactérias são consideradas um grupo de interesse peculiar para a resistência bacteriana. As enterobactérias são uma família muito abundante de bacilos Gram-negativos, que inclui uma grande variedade de bactérias patogênicas. Elas podem ser encontradas amplamente na natureza, mas a maioria habita os intestinos do homem e dos animais, tanto como parte da microbiota normal, sendo um exemplo a *Escherichia coli*, quanto como agentes de infecção,

como a *Salmonella* (Murray, 2004). A capacidade desse grupo de desenvolver mecanismos de resistência, aliado ao uso indiscriminado de antibióticos de amplo espectro, favoreceu a aparição e disseminação de enterobactérias multirresistentes. Entre os diversos mecanismos de resistência que essas bactérias podem expressar, destacam-se as mediadas por diversos tipos de betalactamases, como as betalactamases de espectro estendido, de tipo AmpC e as carbapenemasas (Guerrero, et al. 2014).

A água residual está entre os principais reservatórios de resistência a antibióticos em ambientes urbanos. O que torna as estações de tratamento de águas residuais um ponto de fundamental interesse, pois afetam direta e indiretamente a população humana e o meio ambiente. Os tratamentos convencionais não são capazes de eliminar totalmente estes micro-organismos e por vezes os processos de desinfecção acabam por facilitar a seletividade dos micro-organismos resistentes a antibióticos, devido ao desequilíbrio gerado na comunidade microbiana que inibe a competição natural existente, favorecendo a prevalência de micro-organismos que representam risco a saúde humana (Becerra-Castro, et al., 2016; Moreira et al., 2018., Sousa, et al., 2016).

A busca por soluções alternativas, como os processos oxidativos avançados, filtração por membranas, ozonização, radiação ultravioleta, dentre outras técnicas que visam à melhora na remoção de micropoluentes e micro-organismos ganha cada dia mais visibilidade (Zhang et al., 2019., Moreira et al., 2018., Sousa et al., 2016., Le et al., 2018). Entretanto, é necessário analisar com cautela diferentes parâmetros físicos, químicos e microbiológicos, bem como, fatores econômicos e viabilidade de implantação, de maneira que a melhora na qualidade da água tratada seja efetiva, justificando tal investimento.

Diferentes metodologias atualmente são utilizadas para avaliar a diversidade, abundância ou prevalência de ARB e ARG num determinado ambiente. Análises microbiológicas dependentes ou independentes de cultivo, como: o método de filtração por membrana e cultivo em meios seletivos; Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa – qPCR para genes selecionados; e análise metagenômica para avaliar a diversidade da comunidade microbiana, são amplamente utilizados e recomendados para o monitoramento das águas residuais e análise da eficácia dos tratamentos empregados na remoção de ARB e ARG (Manaia et al., 2018).

Nesse contexto, a presença difusa de resíduos de antibióticos e resistência bacteriana em Estações de Tratamento de Águas Residuais representa um extraordinário desafio a ser enfrentado. A busca por políticas públicas, tratamentos inovadores, investimento em pesquisa

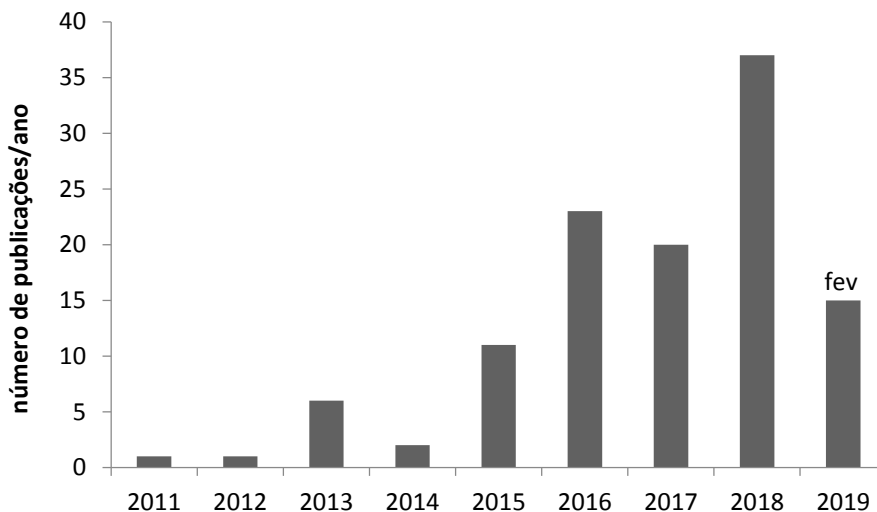
e tecnologias voltadas a solução dessa problemática são de fundamental importância para a melhora do cenário atual.

### 1.3 PROPOSIÇÃO

Diante da eminente ameaça da resistência bacteriana para os ecossistemas e para a saúde humana, o presente trabalho aborda a necessidade de investigação a respeito da presença de bactérias e genes de resistência em estações de tratamento de águas residuais. A compreensão dos mecanismos de resistência, e o monitoramento de ARB e ARG em águas residuais, através de técnicas de microbiologia dependentes e independentes de cultivo, consistem em importantes ferramentas para o controle da resistência bacteriana. Bem como, o desenvolvimento de estudos que proponham tratamentos com a finalidade de remover estes micro-organismos dos efluentes.

Nesse contexto, a avaliação de métodos inovadores que busquem contribuir para a solução desta problemática são de extrema importância. A proposta de avaliar o impacto da etapa de coagulação como alternativa de tratamento terciário em Estações de Tratamento de Águas Residuais Urbanas para a remoção de ARB e ARG é bastante atual, uma vez que processos que desequilibram a estrutura da comunidade microbiana não são desejáveis, devido à sua importância nos ciclos biogeoquímicos e potenciais impactos na saúde humana. Como justificativa da escolha do tema a figura 1 apresenta a evolução de publicações que relatam sobre a temática: Remoção de ARB e ARG em Estações de Tratamento de Águas Residuais (Removal ARB and ARG in Wastewater Treatment Plants). Como apresentado, se trata de uma linha de pesquisa recente, que apresenta um crescente interesse científico devido principalmente, ao fato de se tratar de um grave problema de saúde pública e ambiental, com muitas questões ainda sem respostas.

Figura 1 - Número de publicações por ano utilizando como palavras-chave: remoção de bactérias resistentes a antibióticos e genes de resistência a antibióticos em estações de tratamento de águas residuais. (do inglês: *removal ARB and ARG in WWTP*).



Fonte: Base de dados *Science Direct* (2019).

Apesar do crescente número de publicações considerando essa temática, encontramos apenas um trabalho que reporta o uso da coagulação na remoção de genes de resistência a antibióticos em uma ETAR, utilizando cloreto de ferro e cloreto poliférrico (PFC). O estudo relata remoções de 0.5 a 3.1 log para dois genes de resistência a sulfonamida (*sulI* e *sulII*), três genes de resistência a tetraciclina (*tetO*, *tetW* e *tetQ*) e para o gene relacionado a resistência *intI1* (Li et al., 2017). Resultado bastante promissor, que afirma a necessidade de investigação de estudos de remoção de ARB e ARG a partir de coagulantes, especialmente se considerado a enorme variedade de coagulantes disponíveis atualmente que podem trazer resultados promissores.

### 1.3.1 Objetivo

Compreender a dinâmica das bactérias resistentes a antibióticos e genes de resistência a antibióticos nas estações de tratamento de águas residuais, bem como, avaliar os efeitos de dois coagulantes em ARB e ARG de uma estação de tratamento de águas residuais urbanas.

### 1.3.2 Objetivos específicos

- Auxiliar na compreensão da problemática envolvendo a resistência bacteriana, suas implicações na saúde humana e ambiental e sua relação com as ETAR. Bem como, apresentar ferramentas de monitoramento e tratamentos para a remoção de ARB e ARG nos efluentes;
- Avaliar os efeitos da coagulação com sulfato de alumínio e tanino em bactérias resistentes a antibióticos e genes de resistência a antibióticos em uma estação de tratamento de águas residuais urbanas, a partir de métodos dependentes e independentes de cultivo;
- Avaliar o efeito da coagulação com sulfato de alumínio e tanino na comunidade microbiana dos efluentes provenientes de uma estação de tratamento de águas residuais;
- Analisar a capacidade de perturbação na comunidade e reativação microbiana, após período de armazenamento da água residual tratada com sulfato de alumínio e tanino.

## 1.4 MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia apresentada descreve o que foi realizado para a elaboração dos dois artigos apresentados na tese. Consistindo o primeiro em uma ampla revisão de literatura sobre o tema, e o segundo na investigação experimental sobre o uso potencial da coagulação na remoção de micro-organismos e genes de resistência a antibióticos em estações de tratamento de águas residuais urbanas.

O artigo de revisão desenvolvido busca elucidar o leitor sobre a temática da tese. Para isso foram abordados assuntos relevantes para a problemática da resistência bacteriana como: i) as principais fontes de contaminação ambiental de resíduos de antibióticos, bactérias e genes de resistência a antibióticos; ii) o impacto na saúde humana devido ao crescente aumento da resistência bacteriana; iii) os principais mecanismos desenvolvidos pelos micro-organismos para adquirir resistência aos fármacos; iv) a relação entre as estações de tratamento de águas residuais e a resistência bacteriana; v) as principais técnicas utilizadas para a identificação e monitoramento de bactérias e genes de resistência; vi) bem como, as tecnologias empregadas para a remoção de bactérias e genes de resistência a antibióticos em

plantas de tratamento de águas. O texto baseou-se na extensa pesquisa de revisão de 115 publicações de renomados pesquisadores dessa área do conhecimento.

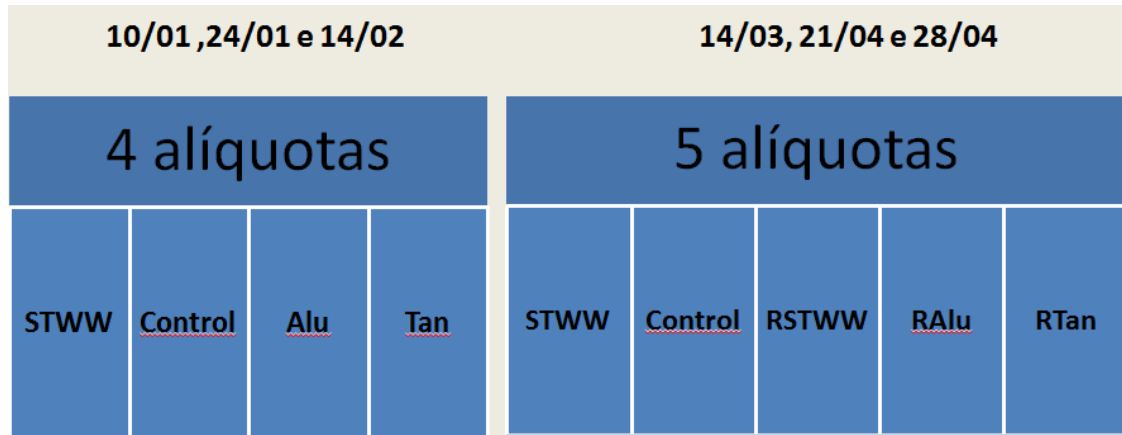
O trabalho de investigação experimental sobre o uso de coagulantes para a remoção de micro-organismos e genes de resistência a antibióticos foi desenvolvido em parceria com Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto (FEUP) – Portugal. A pesquisa buscou avaliar os efeitos de uma etapa adicional de coagulação em efluentes do tratamento secundário, de uma planta de tratamento por lodo ativado convencional de águas residuais urbanas.

As coletas foram realizadas na Estação de Tratamento de Parada – Maia – PT, localizada na região metropolitana do Porto e ocorreram no período da manhã, durante os meses de novembro de 2016 a abril de 2017, correspondendo ao: outono, inverno e primavera europeus. Foram realizados ensaios de coagulação a partir de dois reagentes: Sulfato de Alumínio e Tanino com o objetivo de remover poluentes da água e avaliar a melhoria de parâmetros físico-químicos e microbiológicos da água tratada, em comparação a água residual não coagulada.

Realizaram-se um total de seis experimentos, com amostras em triplicata, distintos em duas fases: i) na primeira fase as análises foram realizadas imediatamente após o ensaio de coagulação; ii) já na segunda fase, após o tratamento de coagulação as amostras eram armazenadas em frascos estéreis, fechados, ao abrigo da luz por um período de 72 horas, e então se prosseguiam as análises conforme descrito anteriormente. O objetivo dessa fase do estudo foi avaliar o recrescimento dos micro-organismos após a estabilização da comunidade, depois do estresse ocasionado pela coagulação. Todos os estudos experimentais foram realizados no LEPABE – Laboratory for Process Engineering, Environment, Biotechnology and Energy, da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto- PT - FEUP.

A figura 2 apresenta o desenho experimental das coletas e as alíquotas correspondentes obtidas. Na primeira fase do estudo STWW se refere à amostra inicial coletada no tratamento secundário da Estação de Parada; Control corresponde ao controle utilizado nos ensaios de Jar test (sem adição de coagulante); Alu e Tan denominam as amostras tratadas com sulfato de alumínio e tanino, respectivamente. Já na segunda fase experimental: RSTWW indica a amostra coletada na estação de tratamento, armazenada pelo período de 3 dias; assim como RAlu e RTan correspondem as amostras tratadas com sulfato de alumínio e tanino, respectivamente, armazenadas por 72 horas; STWW e Control na segunda fase têm o mesmo significado do que foi mencionado anteriormente.

Figura 2 - Desenho experimental das coletas e alíquotas obtidas durante a primeira e segunda fase do estudo de investigação



#### 1.4.1 Ensaios de Coagulação

Os ensaios de coagulação foram realizados em escala laboratorial no equipamento *Jar Test* de seis provas, com regulador de rotação das hastes misturadoras. Utilizaram-se béqueres de 1 litro, preenchidos com 500 mL de amostra para a realização dos experimentos. A temperatura da água foi mantida em torno dos  $20,0 \pm 3,0^\circ\text{C}$  durante todos os ensaios. O equipamento *Jar Test* foi operado com tempo de mistura rápida de 2 minutos a uma velocidade de 100 rpm; tempo de mistura lenta de 30 minutos com velocidade de rotação de 40 rpm; e tempo de sedimentação de 1 hora. Os dados utilizados foram baseados na pesquisa de Beltrán-Heredia e Sánchez-Martín (2009).

As concentrações de coagulantes utilizados variaram entre as amostras em função da quantidade de poluentes presentes na água. Para aperfeiçoar o processo de coagulação, inicialmente foram avaliadas concentrações de sulfato de alumínio entre 10 e  $350 \text{ mg L}^{-1}$  e tanino de 10 a  $70 \text{ mg L}^{-1}$ , de forma a determinar a menor concentração de coagulante necessária para remover com eficiência a maior quantidade de sólidos suspensos da água. As alíquotas utilizadas nas análises foram coletadas com pipetas estéreis a três centímetros de profundidade na posição central de cada béquer, e acondicionadas em frascos também estéreis, para posterior análise. Os parâmetros físicos e químicos avaliados para determinar a eficiência do tratamento foram: turbidez, cor, pH, condutividade e carbono orgânico total. A Figura 3 exemplifica um ensaio em Jartest utilizando amostras em triplicata, a esquerda da

imagem pode-se observar a formação de flocos a partir da coagulação com sulfato de alumínio, e a direita em coloração mais forte o mesmo processo com Tanino.

Figura 3 - Ensaio de coagulação/floculação utilizando sulfato de alumínio e tanino.



Fonte: Acervo da autora.

## 1.4.2 Análises Microbiológicas

### 1.4.2.1 Caracterização Microbiológica

As amostras de águas residuais antes e após a coagulação foram caracterizadas quanto à abundância de diferentes grupos de micro-organismos cultiváveis, também foram avaliados os quantificáveis de resistência aos antibióticos selecionados e os genes relacionados. Estes parâmetros foram avaliados logo depois do tratamento e após período de armazenagem de 72 horas, conforme descrito anteriormente. Foi utilizado o método de filtração por membrana para enumeração dos micro-organismos cultiváveis, para tal, foram feitas diluições seriadas adequadas para cada tipo de amostra, filtradas com o auxílio de funil e bomba a vácuo, através de membranas de nitrato de celulose (porosidade de 0,45 $\mu$ m; Sartorius Stedim, Alemanha) e incubadas em meio de cultura visando diferentes grupos microbianos.

Para a quantificação dos heterotróficos totais foi utilizado o meio Plate Count Agar – PCA (Liofilchem, 30°C, 1 dia) e para as enterobactérias foi utilizado o meio Membrane fecal Coliforms – MFC (Difco, 37°C, 1 dia). Além disso, foram adicionados amoxicilina (32mg/L) e ciprofloxacina (4mg/L) em meio MFC para avaliar a prevalência de resistência em amostras de água antes e após o tratamento com coagulantes. Estes antibióticos foram selecionados por terem sido previamente identificados com potencial de resistência em águas de abastecimento e águas residuais portuguesas. (Silva, M. F. et al., 2007; Moreira, et al., 2016). Na Figura 4 é



apresentada a bancada de trabalho utilizada para as análises de microbiologia, contendo tubos de diluição, placas com meio de cultura, pipeta, ponteira, pinça, vórtex, chama, álcool, rampa de filtração, funis e bomba à vácuo.

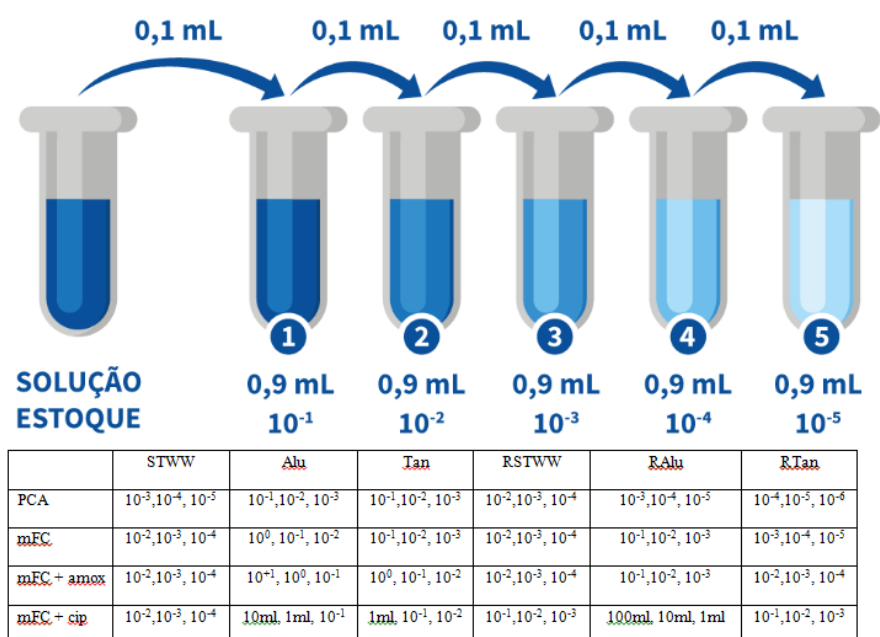
A diluição seriada permite a contagem de micro-organismos em amostras com concentrações elevadas de bactérias. As amostras diluídas em série apresentam concentrações menores de micro-organismos, o que possibilita a contagem das unidades formadoras de colônia – UFC. Para determinar o número de micro-organismos da amostra original multiplica-se o número de UFC formadas a partir da amostra diluída, pelo volume de diluição. As diluições seriadas e volumes utilizados para cada tipo de alíquota e meio de cultivo estão detalhados na figura 5.

Figura 4 - Bancada de trabalho para filtração das amostras e cultivo em meios de cultura selecionados.



Fonte: Acervo da autora.

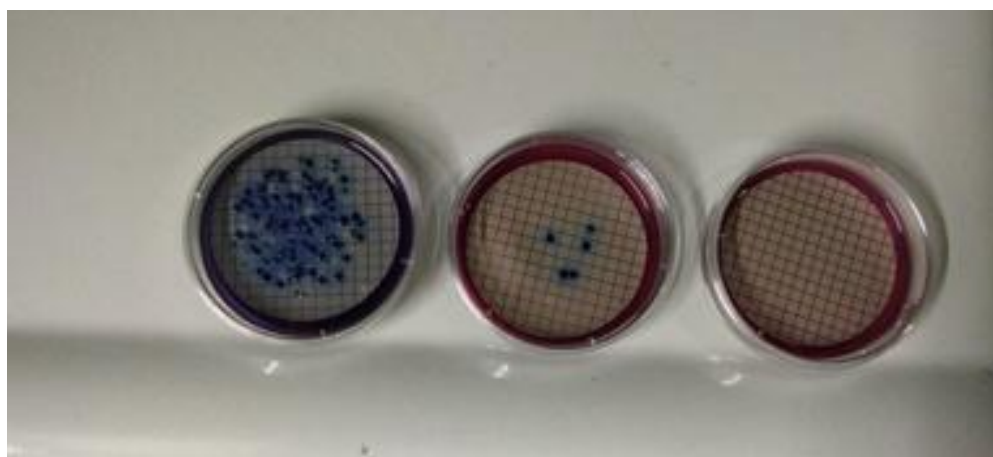
Figura 7 - Esquema demonstrativo das diluições seriadas e volumes utilizados para cada tipo de alíquota e meio de cultivo.



Fonte: Adaptado de: <https://kasvi.com.br>. PCA = Plate Count Agar, mFC= Membrane fecal Coliforms, amox= amoxicilina, cip= ciprofloxacina.

Na Figura 6 é apresentado o resultado de uma análise de organismos cultiváveis por filtração de membrana, após 24 horas de cultivo. Podem-se observar as unidades formadoras de colônia – UFC nas diferentes diluições utilizadas para o meio mFC.

Figura 8 - Unidades formadoras de colônia em meio mFC utilizando o método de filtração por membrana.



Fonte: acervo da autora.

### 1.4.2.2 Extração de DNA

Para as análises de biologia molecular, primeiramente foi realizada a extração do DNA das amostras que variaram entre 100 e 700 mililitros (dependendo do tipo de alíquota), após filtração através de membranas de polycarbonato (porosidade de 0,22µm, Whatman, Reino Unido), usando o kit comercial Power Soil® de isolamento de DNA (MO BIO Laboratories, Inc., USA). A quantificação de DNA foi realizada através de fluorimetria (Qubit – Invitrogen). Os extratos foram congelados a -20°C e descongelados somente no momento da realização das análises quantitativas de DNA.

### 1.4.2.3 PCR quantitativa – qPCR

A qPCR foi realizada conforme demonstrado da Tabela 1 e metodologia descrita por Narciso-da-Rocha et al. (2014). Foram selecionados quatro genes para a análise: 16S rRNA, que reflete a abundância de micro-organismos na amostra, dois genes de resistência a antibióticos:, *bla*<sub>TEM</sub> e *qnrS*, e da integrase relacionada a resistência *int11*. A escolha dos genes foi baseada em estudos anteriores que demonstram a prevalência desses genes em amostras provenientes de estações de tratamento de águas residuais (Souza, et al, 2016; Moreira, et al., 2016).

Tabela 1 - Condições utilizadas nas análises de qPCR:

Gene	Primers	Referência	Eficiência (%)	Condições	Referência
16S rRNA	1114F (CGGCAACGAGCGCAACCC) 1275R (CCATTGTAGCACGTGTGTAGC)	Escherichia coli (ATCC25922)	100	95°C por 10 min (1ciclo) 95°C por 15s, 55°C por 20s e 72°C por 10s (35 ciclos) outros: 1a	(Denman e McSweeney, 2006)
<i>int11</i>	<i>int11</i> ILC5-F (GATCGGTGCGAATGCGTGT) <i>int11</i> ILC1-R (GCCTTGATGTTACCCGAGAG)	Escherichia coli (A2FCC14)	94	95°C por 10 min (1ciclo) 95°C por 15s, 55°C por 30s e 72°C por 10s (40 ciclos) outros: 1a	(Goldstein et al., 2001)
<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> -F (TTCCTGTTTTGCTCACCCAG) <i>bla</i> <sub>TEM</sub> -R (CTCAAGGATCTTACCGCTGTG)	Escherichia coli (A2FCC14)	96	95°C por 10 min (1ciclo) 95°C por 15s, 60°C por 30s e 72°C por 10s (40 ciclos) outros: 2a	(Bibbal et al., 2007)
<i>qnrS</i>	<i>qnrS</i> rF11-F (GACGTGCTAACTGCGTG) <i>qnrS</i> rR11-R (TGGCATGTGGAAACT)	Enterobactercloa cae (S1+)	95	95°C por 5 min (1ciclo) 95°C por 15s, 60°C por 1min(40 ciclos) outros: 2b	(Marti e Balcazar, 2013)

- 1) KAPA SYBR® FAST ABI Prism® qPCR Master Mix; 2) SYBR® Select Master Mix; a) 200 nM de primer; b) 600 nM de primer.

#### 1.4.2.4 Análise de Comunidade

Para avaliar a comunidade microbiana das águas residuais da ETE, as amostras de DNA foram submetidas a uma análise de PCR para o gene 16S rRNA, para avaliar se não havia a presença de inibidores de PCR, assim como também foi realizada uma eletroforese das amostras para verificar a integridade do DNA. Após esta análise prévia, as amostras de DNA foram encaminhadas para o laboratório Biocant - PT, especializado na área de sequenciamento de comunidades, para análise das amostras pela metodologia Illumina. Os resultados obtidos foram analisados através do software *Quantitative insights into Microbial Ecology* – QIIME, que permite a execução do controle de qualidade sobre as leituras de sequências de entrada, agrupa as sequências de nucleotídeos do gene marcador em um nível filogenético solicitado (por exemplo 97% para o nível de espécie) em OTU's (unidades taxonômicas operacionais) e organiza taxonomicamente as OTU's através da comparação por sequências similares em uma base de dados taxonômica de referência.

#### 1.4.3 Análise Estatística

Os parâmetros físicos e químicos, as contagens microbiológicas e os dados da PCR quantitativa foram comparados usando o test-t de duas amostras, para indicar a diferença estatística das alíquotas em comparação ao STWW. Estas análises foram realizadas usando o software BioEstat (versão 5.0). Já a análise estatística da comunidade bacteriana foi realizada a partir de análise multivariada de variância permutacional (PERMANOVA) dentro da plataforma QIIME2, para avaliar se as comunidades bacterianas foram agrupadas corretamente por tipo de amostra, e se houveram grupos estatisticamente diferentes. As diferenças na abundância relativa de determinado grupo bacteriano de cada amostra (Alu, Tan, RSTWW, RAlu e RTan) em comparação ao STWW foram obtidas usando um teste-t pareado com a correção Storey FDR para comparações múltiplas, realizado no software STAMP v.2.1.3.

## **2 ARTIGO 1 - Resistência a Antibióticos em Estações de Tratamento de Águas Residuais: Compreensão do Problema e Perspectivas Futuras**

Bárbara, W. N. Grehs.<sup>a</sup>, Maria Angélica O. Linton.<sup>b</sup>, Elvis Carissimi<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima, 1000, CT Lab, Santa Maria, RS 97105-900, Brasil

<sup>b</sup> Departamento de Biologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima, 1000, CE, Santa Maria, RS 97105-900, Brasil

### **RESUMO**

Resíduos de antibióticos (AR), bactérias resistentes a antibióticos (ARB) e genes de resistência a antibióticos (ARG) são considerados uma nova classe de contaminantes das águas, devido aos seus efeitos adversos nos ecossistemas aquáticos e na saúde humana. A contaminação dos corpos hídricos se dá principalmente pela excreção de antibióticos incompletamente metabolizados por humanos e animais sendo considerada a principal fonte de contaminação de antibióticos no meio ambiente. Pela eminente ameaça, a Organização Mundial de Saúde (OMS) categorizou a disseminação de antibióticos como uma das três maiores ameaças à saúde pública no século 21. As Estações de Tratamento de Águas Residuais Urbanas – ETARU reúnem AR, ARB, ARG, tornando a compreensão deste ambiente peculiar fundamental para a investigação de tecnologias que visem combater a disseminação da resistência bacteriana. Diversas metodologias vêm sendo empregadas com o foco de reduzir as cargas de ARB e ARG dos efluentes, entretanto a reativação destes micro-organismos após o tratamento é amplamente relatada. Este trabalho tem por objetivo elucidar o papel das ETARU na disseminação da resistência bacteriana, bem como relatar os esforços que tem sido feitos até o momento e perspectivas futuras para combater esta importante problemática mundial.

Palavras-chave: Tratamento de efluentes; bactérias resistentes a antibióticos; genes de resistência a antibióticos.

## **Resistance to Antibiotics in Wastewater Treatment Plants: Understanding the Problem and Future Perspectives**

Bárbara, W. N. Grehs.<sup>a</sup>, Maria, A. O. Linton.<sup>b</sup>, Elvis Carissimi<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Sanitary and Environmental Engineering, Federal University of Santa Maria (UFSM), Av. Roraima 1000, CT Lab, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

<sup>b</sup>Department of Biology, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, Av. Roraima 1000, CE, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil

### **ABSTRACT**

Antibiotics residues (AR), antibiotic resistant bacteria (ARB) and antibiotic resistance genes (ARG) are a new class of water contaminants, due to their adverse effects on aquatic ecosystems and human health. The contamination of water bodies is caused by the incorrect elimination of antibiotics due to population increase, urbanization, industrialization and misuse of agricultural practices. The excretion of antibiotics incompletely metabolized by humans and animals is considered as the main source of antibiotic contamination in the environment. Given the imminent threat, the World Health Organization (WHO) has categorized the spread of antibiotics as one of the top three threats to public health in the 21st century. The Urban Waste Water Treatment Plants (UWWTP) bring together AR, ARB, ARG, among other potential factors that favor the selection of these microorganisms, making the understanding of this peculiar environment fundamental for the investigation of technologies aimed at combating the spread of bacterial resistance. Several methodologies have been employed focusing on reducing the ARB and ARG loads of the effluents, however the reactivation of these microorganisms after the treatment is widely reported. The objective of this work is to elucidate the role of UWWTPs in the dissemination of bacterial resistance, as well as to report the efforts that have been made so far and future perspectives to combat this important global problem.

**Keywords:** Wastewater treatment; antibiotic resistant bacteria; antibiotic resistance genes.

## 1. Introdução

As Estações de Tratamento de Águas Residuais – ETAR são fundamentais para o desenvolvimento sustentável e para a saúde humana. Asseguram a remoção de detritos, de altas cargas orgânicas, e patógenos dos efluentes antes destes serem descarregados no meio ambiente através de corpos receptores (rios, lagos e mar). Os benefícios da implantação das ETAR incluem evitar a eutrofização dos corpos hídricos receptores e a disseminação de micro-organismos potencialmente nocivos (Henze et al., 2008). Entretanto, o avanço das metodologias de análise, bem como, das tecnologias de tratamento, indicam que a complexidade dos efluentes (que podem conter substâncias químicas recalcitrantes, micropoluentes persistentes e micro-organismos resistentes a antibióticos) cria novos desafios para o tratamento eficiente dos efluentes, e demonstra que melhorias são necessárias a fim de produzir efluentes finais que efetivamente protegerão o meio ambiente e os seres humanos (Manaia, et al., 2018).

A presença de antibióticos no meio ambiente tem sido amplamente relatada, especialmente em águas superficiais, subterrâneas e sedimentos (Cytryn, 2013; Ma et al., 2014). A contaminação dos corpos hídricos ocorre em consequência da incorreta eliminação dos antibióticos, que cresce em decorrência do aumento da população, urbanização e industrialização. A excreção de antibióticos incompletamente metabolizados por humanos e animais é a principal fonte de contaminação de antibióticos no meio ambiente, outros fatores podem incluir a eliminação de medicamentos não utilizados e resíduos de processos de fabricação farmacêutica (Kumar e Pal, 2017). Em consequência da iminência do aumento da resistência bacteriana à saúde pública, a Organização Mundial de Saúde (OMS) categorizou a disseminação de antibióticos como uma das três mais graves ameaças no século 21 (WHO, 2014). Portanto, é bastante perceptível que a maior parte das fontes de contaminação por antibióticos sejam conduzidas para as Estações de Tratamento de Águas Residuais, o que torna claro a importância do estudo da influência destas plantas de tratamento na disseminação de Bactérias Resistentes a Antibióticos – ARB e Genes de Resistência a Antibióticos - ARG.

A água residual está entre os principais reservatórios de resistência à antibióticos em ambientes urbanos. A abundância de fontes de carbono e outros nutrientes, bem como, a presença de oxigênio ou nitrato, partículas nas quais as bactérias podem ficar adsorvidas, pH e temperaturas estáveis, são exemplos de condições que favorecem a notável diversidade de

micro-organismos neste peculiar habitat (Exner et al., 2017; Silva et al., 2006). Estações de Tratamentos de Águas residuais Urbanas – ETARU reúnem Bactérias Resistentes a Antibióticos – ARB, resíduos de antibióticos e outros fatores potenciais que favorecem a seleção para esses micro-organismos. Simultaneamente, oferece um rico suprimento de nutrientes e interação das células bacterianas, o que facilita a transferência horizontal de Genes de Resistência a Antibióticos (Harnisz, 2013; Moura et al., 2011; Silva et al., 2006). Embora apenas uma parte das ARB liberadas no meio ambiente, através dos efluentes provenientes das ETARU seja capaz de causar doenças em humanos ou animais, o risco de enriquecer a resistência ambiental através de seleção, ou Transferência Horizontal de Genes e consequentemente contribuir para o surgimento de resistência em bactérias patogênicas, não pode ser negligenciado (Manaia et al., 2017).

Diversas metodologias vêm sendo empregadas com o foco de reduzir as cargas de ARB e ARG dos efluentes em ETARU, como: cloração, radiação UV, ozonização, fotocatalise, foto-fenton, filtração por membranas, adsorção, dentre outros, bem como, a combinação de mais de um tipo de tratamento (Inyinbor et al., 2018; Kumar e Pal., 2017) . Entretanto, embora ocorra a redução de micro-organismos resistentes após o tratamento, a reativação de ARB e ARG é amplamente relatada na literatura (Huang et al., 2011). Dessa forma, a investigação e estudo aprofundado da influência das ETARU na disseminação da resistência bacteriana, a busca de tecnologias de tratamento de águas residuais que considerem esta problemática, bem como, o monitoramento da presença de ARB e ARG em efluentes são fundamentais, tendo em vista a urgência de aplicação de métodos eficazes de tratamento para a eliminação de ARB em águas residuais.

## 2. Contaminação Ambiental por Antibióticos

Os antibióticos mais frequentemente utilizados mundialmente por humanos e animais incluem o grupo dos beta-lactâmicos, tetraciclina, fluoroquinolonas e sulfonamidas. O metabolismo desses compostos ativos em humanos e animais varia muito. Alguns compostos são 90% metabolizados, ou até mais do que isso, enquanto outros são apenas 10% metabolizados (Kümmerer, 2009). O restante não metabolizado é excretado na forma de compostos metabólitos, através das fezes e urina para as águas residuais, e no caso dos animais, como fertilizante em fazendas, ou diretamente em corpos hídricos receptores



(Guo et al., 2017; Leung et al., 2012; Wei et al., 2011; Marti et al., 2014; Tien et al., 2017).

Os antibióticos e seus respectivos subprodutos (não-metabolizados) que entram em contato com o meio ambiente podem afetar a evolução da estrutura das comunidades bacterianas que desempenham um papel fundamental nos ecossistemas (Aminov e Mackie, 2007; Baran et al., 2011; Grenni et al., 2018; Thiele-Bruhn e Beck, 2005). Outra fonte de contaminação dos ecossistemas por antibióticos é a descarga de águas residuais tratadas, especialmente quando ocorre a inclusão de águas residuais hospitalares (Korzeniewska e Hamisz, 2013; Lien et al., 2017; Wang et al., 2018). A baixa eficácia do tratamento dos efluentes hospitalares, ou até mesmo a falta de tratamento das águas residuais hospitalares pode contribuir de maneira significativa para o incremento e a disseminação de bactérias multirresistentes de fontes hospitalares para as ETARU, e posteriormente para o meio ambiente (Ahn e Choi, 2016; Korzeniewska et al., 2013; Lekunberri et al., 2017).

A real compreensão da contaminação ambiental e exposição dos organismos a concentrações crescentes de antibióticos, assim como a interação de ARB e ARG com os ecossistemas, ainda não é totalmente conhecida e apresenta muitas lacunas a serem esclarecidas. O fato é que a cada dia novos relatos na literatura salientam a fragilidade do meio ambiente diante dessa mútua influência, sendo os reflexos dessa contaminação percebidos não somente nas comunidades ambientais, mas acima de tudo na saúde humana.

### 3. Impacto na Saúde Humana

Os antibióticos salvaram milhões de vidas humanas desde sua descoberta e aplicação no tratamento de doenças infecciosas bacterianas. Contudo, o uso extensivo de antibióticos levou a um aumento da prevalência de ARB (Levy e Marshall, 2004). O último relatório da UK Review on Antimicrobial Resistance, publicado recentemente estima que as 700.000 mortes anuais, atualmente atribuíveis a infecções por patógenos resistentes a medicamentos, aumentará para 10 milhões em 2050, caso não haja mudanças consideráveis no cenário atual (O'Neill, 2016). Portanto, a preocupação com a presença de ARB e ARG é de suma importância, não somente quando pensamos em saúde pública, mas também nos aspectos ecológicos. Considerando os relatos de que o aumento de cepas bacterianas

patogênicas resistentes a antibióticos, pode ser transferido do meio ambiente para seres humanos. (Blasco et al., 2008., Todar, 2008).

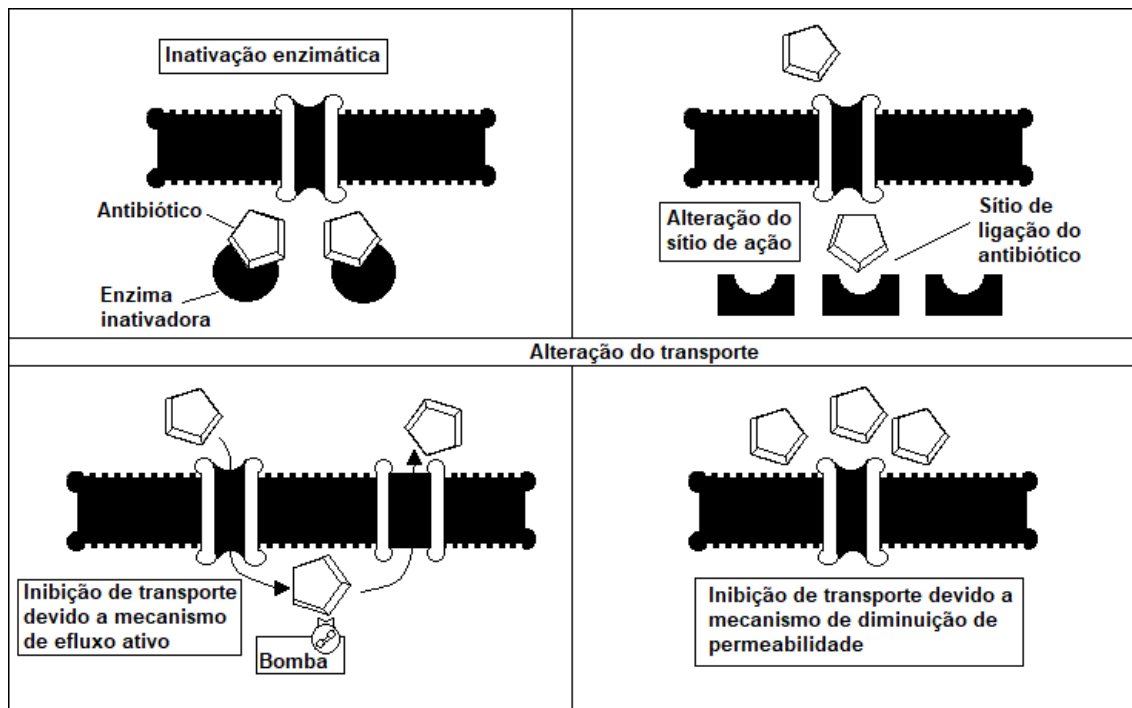
A resistência microbiana é um desafio complexo de saúde pública mundial e não será uma única ou simples estratégia capaz de conter a disseminação de organismos infecciosos que se tornaram resistentes aos antibióticos disponíveis. O desenvolvimento de resistência a antibióticos é um fenômeno natural nos micro-organismos, e é acelerado pela pressão seletiva exercida pelo uso indevido de antibióticos em humanos e animais. Entretanto, a atual falta de novos agentes antimicrobianos que possam substituir de forma eficaz os atualmente empregados, traz urgência na necessidade de proteger a eficácia dos medicamentos atualmente existentes (WHO, 2014).

#### 4. Mecanismos de Resistência Bacteriana a Antibióticos

A resistência antibiótica é um fenômeno natural em que os micro-organismos conseguem resistir ao efeito de um antibiótico ou antimicrobiano devido às mutações e pela grande capacidade das bactérias de transferirem seu material genético, existindo uma clara correlação entre o uso de antibióticos e a resistência bacteriana. Essa relação antibiótico-bactéria se altera por diversos fatores, entre eles a farmacocinética do remédio, a dose, a duração do tratamento e o tamanho do inóculo bacteriano (Mosquito, 2011).

A resistência bacteriana pode ser dividida em dois grupos: resistência intrínseca ou resistência adquirida. A primeira determina uma característica natural da bactéria que acarreta a resistência a um determinado tipo de medicamento. Por exemplo, a *E. coli* apresenta resistência intrínseca à Vancomicina. Já a resistência adquirida é resultado da aquisição de genes de resistência, mutação do DNA cromossômico, ou a combinação de ambos os mecanismos (Baptista, 2013). Este fenômeno ocorre devido a mecanismos complexos que podem envolver: a inativação enzimática; alteração do sítio de ação do antibiótico (mutação ou mecanismos pós-tradução); alteração do transporte do antibiótico através do invólucro bacteriano (altera a permeabilidade, reduz a absorção do antibiótico); e também ao evitar a rota metabólica inibida pelo antimicrobiano (Khameneh et al., 2016). Na Figura 1 são apresentados os principais mecanismos de resistência bacteriana conhecidos.

Figura 1. Principais mecanismos de resistência bacteriana.



Fonte: Adaptado de Barros et al. (2001).

A inativação enzimática do fármaco resulta da produção de enzimas que degradam ou inativam o antibiótico, já a alteração do sítio de ação caracteriza-se pela diminuição ou ausência de afinidade do antibiótico ao local de ligação, e é ocasionada pela alteração da estrutura do peptidoglicano, interferência na síntese de proteínas ou na síntese de DNA. A permeabilidade celular é essencial para que o antibiótico penetre na célula e tenha o efeito desejado, portanto a modificação da permeabilidade por alterações estruturais no número, seletividade ou tamanho das porinas impede a eficácia do medicamento conferindo resistência às bactérias. Enquanto que as bombas de efluxo são proteínas transportadoras envolvidas no bombeamento de drogas ou substratos de dentro da célula para o meio externo. Dessa forma a concentração intracelular de antibiótico diminui e a bactéria sobrevive. O sistema de bomba de efluxo pode transportar uma ou várias estruturas de agentes antibacterianos, o que inclui múltiplas classes de antibióticos, antissépticos, detergentes e corantes, fazendo com que esse mecanismo possa estar associado à resistência a múltiplos medicamentos (Webber e Piddock, 2003).

Genes reguladores que controlam a resistência a múltiplas drogas e a formação de biofilme bacteriano também desempenham papéis importantes na resistência bacteriana

(Khameneh et al., 2016). Os biofilmes bacterianos são peça chave para a compreensão da disseminação do fenômeno da resistência bacteriana nas estações de tratamento de águas residuais. Consistem em compostos de matrizes poliméricas formadas por polissacarídeos que são capazes de proteger os micro-organismos incorporados contra agentes antimicrobianos (Richards e Melander, 2009). A dificuldade de penetração do antibiótico no biofilme, a facilitação de troca de materiais genéticos, alteração do metabolismo das células bacterianas e hiper mutações frequentes são alguns dos possíveis mecanismos envolvidos na participação da resistência bacteriana em biofilmes (Dao et al., 2011; Donlan, 2000; Fish et al., 2016; Mathieu et al., 2014; Singh et al., 2006).

As bactérias resistentes tornaram-se um problema de saúde pública, pois são difíceis de tratar, necessitando de medicações alternativas ou doses significativas. Ainda, há as bactérias multirresistentes, ou seja, que são resistentes a múltiplos antibióticos, conhecidas popularmente como superbactérias. Muitas vezes, as bactérias resistentes acarretam infecções intratáveis, levando a óbito milhões de pessoas por ano (Rossolini et al., 2017). Alguns dos micro-organismos multirresistentes mais problemáticos são *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, incluindo  $\beta$ -lactamases de amplo espectro, enterococos resistentes à vancomicina e *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (Levin et al., 1999; Miller et al., 2005).

A compreensão dos mecanismos de resistência a antibióticos é fundamental para o desenvolvimento de tratamentos eficazes na remoção de ARB e ARG em Estações de Tratamento de Águas Residuais, pois este conhecimento é capaz de auxiliar na percepção de pontos críticos nas etapas de tratamento, e também contribuir na interpretação dos resultados das tecnologias empregadas para solucionar esta problemática.

#### 4.1 Bases Moleculares de Resistência Bacteriana

A aquisição de genes de resistência ocorre através da Transferência Horizontal de Genes que geralmente é mediada por elementos genéticos móveis, ou transferíveis como plasmídeos, *transposons* e *integrans*. Estes são movidos por vários métodos de transferência de genes, tais como: conjugação (transferência de DNA entre dois micróbios via reprodução sexuada), transformação (captação de DNA extracelular de células mortas) e transdução (transferência de DNA mediada por vírus) (Kumar e Pal, 2017).

Os plasmídeos são um meio altamente eficaz para a transferência de genes através do processo de conjugação. Durante este processo, a superfície celular de ambas as bactérias (doadora e receptora) entram em contato formando uma ponte para transferir os plasmídeos (Llosa et al., 2002). Exemplos de resistência bacteriana mediada por plasmídeos podem ser observados em enterobactérias resistentes a quinolonas e  $\beta$ -lactâmicos (Hooper, 2001); e em enterococos resistentes à vancomicina (Low et al., 2001).

Outro mecanismo de ação de resistência bacteriana é a inativação enzimática, a partir de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos ou claranfencol acetiltransferase, por exemplo. Mutações cromossômicas não são tão frequentes em células bacterianas, ocorrendo em um a cada  $10^6$  -  $10^8$  micro-organismos. Essas mutações resultam de erros na replicação cromossômica ou de um reparo incorreto no DNA e são chamadas de mutações espontâneas ou mutações dependentes do crescimento. Um exemplo desse tipo de alteração é a resistência a quinolonas em *E. coli* que ocorre pela alteração em pelo menos sete aminoácidos do gene *gyrA* (Khameneh et al., 2016).

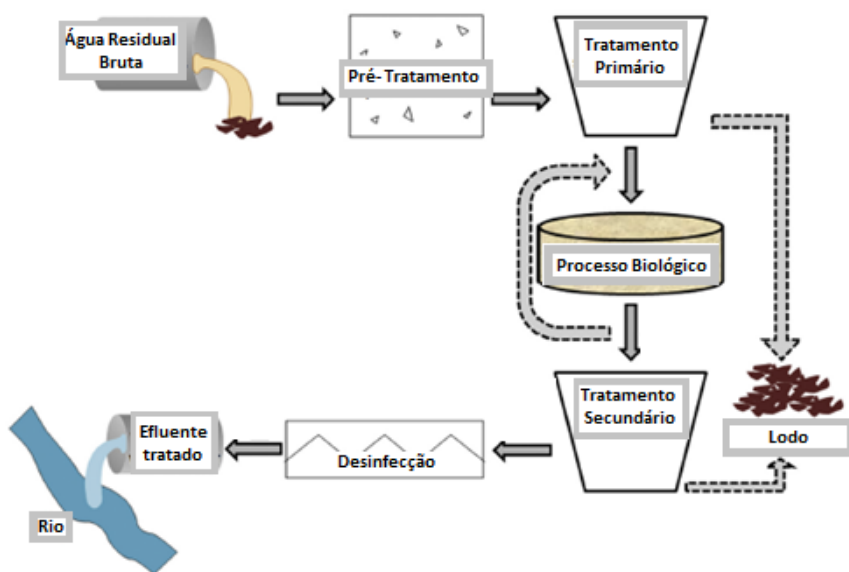
## 5. Estações de Tratamento de Águas Residuais e Resistência Bacteriana

As Estações de Tratamento de Águas Residuais recebem importantes fontes de antibióticos e bactérias resistentes a antibióticos oriundos de esgotos domésticos e hospitalares (Laht et al., 2014). De fato, a presença de ARB e ARG foi confirmada em muitas plantas de tratamento de águas residuais no mundo todo (Michael et al., 2013., Rizzo et al., 2013., Zanotto et al., 2016). O fato das ETAR serem consideradas como um ponto crítico para a aquisição e disseminação da resistência a antibióticos é fundamentado em três fatores principais: i) altas descargas de resíduos de antibióticos, ARB e ARG, coletados no sistema municipal de tratamento de águas residuais; ii) condições favoráveis para a seleção ou transferência horizontal de genes de resistência entre as bactérias durante o processo de tratamento das águas residuais; e iii) altas concentrações de AR no efluente tratado, às vezes, maior até do que na água bruta (Novo et al., 2013). Portanto, os efluentes das ETAR estão entre os principais condutores para a propagação de resistência bacteriana em ambientes aquáticos (Proia et al., 2018).

## 5.1 Plantas de Tratamento de Águas Residuais

A característica dos efluentes domésticos está relacionada aos usos ao qual a água foi submetida, variando com o clima, situação social, econômica e hábitos da população (Sperling, 2005). Atualmente diferentes arranjos são utilizados em Plantas de Estações de Tratamento de Águas Residuais, entretanto todas utilizam pelo menos três etapas sequenciais: o pré-tratamento ou tratamento preliminar; o tratamento primário; e o tratamento secundário (Grady et al., 2011; Henze et al., 2008). A figura 2 apresenta um esquema com as principais etapas de uma Planta de Tratamento de Águas Residuais Urbanas.

Figura 2 - Esquema genérico de uma Planta de Tratamento de Águas Residuais Urbanas com: pré-tratamento, tratamento primário, tratamento secundário e tratamento terciário.



Fonte: Adaptado de Manaia et al., 2018.

### 5.1.1 Pré-Tratamento e Tratamento Primário

O pré-tratamento visa à remoção de materiais grosseiros, sólidos volumosos, areia, etc, ou seja, todo o material que possa vir a prejudicar os equipamentos e tratamentos a jusante. Algumas plantas contam também nessa etapa, com um tanque de equalização com o intuito de

evitar picos de fluxo e homogeneizar a composição da água residual. No tratamento primário é realizada a remoção de gorduras, graxas e sólidos sedimentáveis remanescentes, que são conduzidos para os tanques de decantação primários e canalizados para o tratamento de lodos (Davis, 2017). Uma grande quantidade dos micro-organismos presentes no esgoto adere a partículas orgânicas e inorgânicas e é, portanto, removido do efluente para o lodo já nesta etapa (Manaia et al., 2018). Sendo o restante do efluente do tratamento primário conduzido então para o tratamento secundário.

### 5.1.2 Tratamento Secundário

Uma enorme variedade de processos está disponível para o tratamento secundário, porém todos visam à remoção de compostos biodegradáveis dos efluentes. Compostos suspensos ou dissolvidos são originários principalmente de excrementos humanos, restos de comida e detergentes. Mas uma grande variedade de produtos como metais pesados e pesticidas também estão presentes (Henze e Comeau, 2008., Köck-Schulmeyer et al., 2013., Rizzo et al. 2013., Tchobanoglous et al., 2003).

Dessa forma, as águas residuais não contêm somente micro-organismos e compostos biodegradáveis, mas também substâncias recalcitrantes que podem ser potencialmente tóxicas para uma parcela dos organismos que entram ou habitam o reator, gerando pressão seletiva sobre as bactérias. Por outro lado, o enorme suprimento de nutrientes presente no meio, suporta o crescimento da microbiota capaz de lidar com a condição estressora, que podem então vir a atingir altas densidades. As condições prevalentes no tratamento secundário favorecem o crescimento de organismos formadores de flocos ou biofilmes. Estes micro-organismos são produtores de substâncias poliméricas extracelulares - EPS que atuam como adsorventes não só de micro-organismos incapazes de produzir EPS, mas também de compostos químicos orgânicos e inorgânicos, formando o lodo ativado. Parte dessa biomassa é descartada para o tratamento do lodo e o restante é reciclado para a continuidade do processo (Manaia et al., 2018). Isto propicia que a carga microbiana do efluente secundário diminua de uma a duas unidades em escala logarítmica (1 a 2-log) em relação à água bruta não tratada (EPA, 1986).

No tratamento secundário realizado pelo processo biológico de lodo ativado a microbiota presente na água bruta que não foi removida através do tratamento primário, entra em contato com o lodo ativado no tanque secundário. Isto estimula a competição entre as bactérias pela

matéria orgânica disponível, gerando uma intensa atividade metabólica que leva a importantes alterações na dinâmica das comunidades. O desenvolvimento das ARB, assim como a transferência de ARG, através da transferência horizontal de genes nessa fase do tratamento é o fator crucial que irá determinar a eficácia do tratamento na remoção de fatores que podem contribuir para a resistência bacteriana (Marano e Cytryn, 2017).

A recirculação do lodo no tratamento biológico permite o enriquecimento do mesmo, com células altamente adaptadas às condições da planta de tratamento, incluindo um vasto leque de agentes estressores. Dessa maneira, quando o efluente é finalmente liberado no corpo hídrico receptor pode haver um incremento de  $10^{12}$  ARB ou  $10^{18}$  ARG por dia (Manaia et al., 2016., Vaz-Moreira et al., 2014). Este fato torna este um ponto crítico e determinante no que diz respeito à proliferação de ARB e ARG em Estações de Tratamento de Águas residuais.

### 5.1.3 Tratamento Terciário

Algumas plantas contam com um tratamento terciário ou avançado para obter um efluente final de alta qualidade, principalmente considerando a necessidade do reuso para diferentes finalidades. A maior parte das plantas que dispõe de tratamento terciário utiliza processos de desinfecção como radiação UV, cloração e ozonização (Inyinbor et al., 2018). Dada à capacidade de uma etapa adicional de desinfecção reduzir as cargas microbianas, é esperado que ocorra simultaneamente a remoção de ARB e ARG. No entanto, a provável perturbação das comunidades microbianas e a reativação de ARB e ARG durante o armazenamento de águas residuais tratadas foi observada em diversos estudos (Becerra-Castro et al., 2016; Moreira et al., 2018; Sousa et al., 2016).

Esse fenômeno acontece, pois quando a desinfecção é aplicada, uma grande fração de células morre, incluindo ARB, enquanto outras entrarão em um estado de dormência devido ao estresse e retornarão a se desenvolver assim que condições mais favoráveis forem reestabelecidas. O que ocorre naturalmente quando o efluente final atinge o corpo hídrico receptor, ou a água é armazenada para reuso, por exemplo (Manaia et al, 2018).

Huang et al. (2012) avaliaram o efeito da cloração em ARB no efluente secundário de uma ETAR, e observaram que ocorre a reativação de ARB, especialmente para cloranfenicol, ampicilina e penicilina, sendo que para o cloranfenicol a resistência ultrapassou os 50%. Liu et al. (2017) também relataram o aumento de genes de resistência após a cloração do efluente secundário de uma ETAR. Ou seja, por vezes, submeter o efluente a um processo de



desinfecção pode ser ainda mais prejudicial para a seleção de ARB e ARG, pois a desestabilização da comunidade bacteriana pode favorecer o desenvolvimento de espécies indesejadas, do ponto de vista da saúde pública e do meio ambiente.

## 6. Técnicas de Identificação e Monitoramento de ARB e ARG em ETAR

Diferentes metodologias estão disponíveis para avaliar a diversidade, abundância ou prevalência de ARB e ARG num determinado ambiente. Estes métodos podem ser classificados como dependentes ou independentes de cultivo, dependendo do foco da análise. Métodos dependentes de cultivo utilizam meios de cultura para promover o crescimento dos micro-organismos, já os independentes de cultivo realizam análises diretas de ácidos nucleicos (DNA ou RNA). Também é possível optar por avaliar um grupo ou gene microbiano específico (análise segmentada), ou a comunidade como um todo (não segmentada). A escolha do melhor método para avaliar ARB e ARG deve ser feita de acordo com as questões que o pesquisador busca responder, bem como, com a disponibilidade de equipamentos e recursos financeiros disponíveis. No entanto, a combinação de diferentes métodos pode ser uma abordagem promissora (Manaia et al., 2018).

### 6.1 Métodos dependentes de cultivo

Os métodos tradicionais de microbiologia dependentes de cultivo são baseados nas diferenças morfológicas, metabólicas e fisiológicas dos micro-organismos. Isto inclui o isolamento, cultivo e identificação em meio de cultura. A identificação microbiológica tradicional inclui a avaliação de características macroscópicas como temperatura ótima de crescimento e morfologia das colônias, e microscópicas como tamanho, formato, padrões de agregação celular, mobilidade, presença ou ausência de flagelos, coloração Gram, etc. (Tarazi, 2010).

Os métodos dependentes de cultivo podem avaliar a viabilidade dos micro-organismos e permitem a caracterização fenotípica de isolados, característica muito importante para avaliar o perfil de resistência a múltiplas drogas, a concentração inibitória mínima de antibióticos e a capacidade de propagação potencial da transferência horizontal de genes sob condições ambientais específicas (Buthelezi et al., 2010; Garcha et al., 2016; Li et al., 2009).

Dentro das características fenotípicas possíveis de serem avaliadas em isolados estão inclusas: alterações no metabolismo, condições físico-químicas, capacidade de formação de biofilme, esporulação, motilidade e tolerância a condições estressantes (McLain et al., 2016). Além disso, a análise de isolados de ARB facilita a análise de ARG relacionados, e apoia a identificação das espécies ou clones que podem ser de grande relevância para a disseminação de um determinado ARG. Outro ponto importante é o fato de procedimentos padronizados, baseados em métodos de cultivo, já serem atualmente utilizados no monitoramento da qualidade das águas, o que facilita a adaptação para a vigilância de ARB em ambientes aquáticos (Guardabassi et al., 2002; Hembach et al., 2017; Kaplan et al., 2015; Varela et al., 2015; Vaz-Moreira et al., 2014).

As desvantagens das análises dependentes de cultivo estão em se tratar de uma técnica trabalhosa, demorada e cara, se o processamento pós-isolamento se destina a epidemiologia molecular, por exemplo. A cultura estudada também não é representativa de toda a diversidade da comunidade bacteriana, pois se estima que somente 1-10% dos micro-organismos cresçam em condições de cultivo (Cowan, 2000). A técnica também apresenta limitações quanto aos limites de quantificação (muito altos) em condições não seletivas; risco potencial de contaminação biológica; e requer profissionais habilitados com experiência para a correta quantificação de ARB (Manaia et al., 2018).

## 6.2 Métodos independentes de cultivo

A extração dos ácidos nucleicos (DNA e RNA) é o primeiro passo para a realização das técnicas de biologia molecular como: reação em cadeia da polimerase – PCR, eletroforese em gel de gradiente desnaturante – DGGE e sequenciamento. É possível obter DNA a partir de inúmeros tipos de tecidos e células, existindo assim uma infinidade de protocolos para a realização deste procedimento. Nos últimos anos a tecnologia disponível para o sequenciamento de genomas de bactérias evoluiu muito, em termos de acessibilidade, velocidade e precisão (Van Dijk et al, 2014). As análises baseadas em DNA são altamente dependentes da qualidade do DNA extraído, dessa forma os kits comerciais são uma opção menos tóxica para os profissionais que realizam a análise, do que a abordagem tradicional de extração de DNA que utiliza fenol-clorofórmio. Os kits comerciais também apresentam uma combinação de técnicas comprovadas para minimizar a perda de DNA e potencializar a

remoção de inibidores de PCR produzindo resultados bastante confiáveis (Walden, et al. 2017).

Em um estudo realizado por Walden, et al., 2017, avaliou-se diferentes métodos de extração de DNA, usando o método de sequenciamento avançado (Illumina MiSeq). O objetivo do estudo foi determinar as vantagens e desvantagens entre os protocolos para uma variedade de amostras de água e efluentes utilizados na área da engenharia ambiental. Foram avaliados quatro kits comerciais de extração de DNA (QIAamp DNA Mini kit, QIAamp DNA Stool Mini Kit, MO BIO Power Water Kit, e MO BIO Power Soil DNA Isolation Kit). O Stool Mini Kit foi o menos eficiente em termos de diversidade nos resultados de amostras de água doce, surpreendentemente o Power Water Kit, foi o menos eficiente em todos os tipos de amostras examinados. As comparações detalhadas da diversidade beta do sequenciamento avançado indicaram que o Mini Kit e o Power Soil kit, são os mais adequados para estudos que extraem DNA de uma variedade de amostras de água superficiais e águas residuais. Portanto, os pesquisadores recomendam a aplicação do Mini Kit ou do Power Soil Kit como uma melhoria nos protocolos para as análises de sequenciamento avançado em amostras de águas ambientais (Walden, et al., 2017). As principais abordagens de métodos independentes de cultivo utilizadas para análise de resistência a antibióticos em águas residuais são a PCR quantitativa (qPCR) e a análise de comunidade por sequenciamento.

#### 6.2.1 PCR quantitativa (qPCR)

Todas as análises que envolvem um método molecular de amplificação, como a reação em cadeia da polimerase – PCR compreendem etapas de extração de ácidos nucleicos de amostras biológicas, seguido da amplificação de um segmento selecionado mediante a reação em cadeia de polimerase e detecção dos fragmentos amplificados durante o processo. A PCR quantitativa - qPCR associa a metodologia da PCR a um sistema de detecção e quantificação de fluorescência produzida durante todos os ciclos de amplificação. A metodologia permite a amplificação, detecção e quantificação de DNA em uma única etapa, agilizando a obtenção de resultados e minimizando o risco decorrente de possíveis contaminações. A possibilidade de monitorar, ao longo da reação, a quantidade de produto formado a cada ciclo de amplificação e de quantificar este produto durante a fase ótima de formação, confere maior precisão e reprodutibilidade à qPCR quando comparado a PCR convencional (Mackay, et al., 2004).

Os equipamentos destinados a realização de qPCR, associam um termociclador a um leitor de fluorescência capaz de medir a luz proveniente de uma reação de amplificação. A metodologia utiliza os mesmos reagentes de uma PCR convencional acrescido de fluorocromos, intercalados em cadeias de DNA (metodologia SYBER Green) ou presentes em sondas de hibridização específicas (metodologia TaqMan). O SYBR Green e o sistema TaqMan são o corante fluorescente e a sonda mais utilizados, respectivamente. Entretanto, SYBR Green é preferível devido ao custo mais baixo, apesar da menor sensibilidade (Manaia et al., 2018). Na presença de produto amplificado, os fluorocromos excitados por uma fonte de luz (laser), emitem um sinal proporcional à quantidade de produto sintetizado, que por sua vez, será proporcional à quantidade inicial de sequências-alvo presentes na reação de amplificação. Os sinais são detectados por um sistema ótico e analisados por software específico. Os sinais de fluorescências, produzidos à medida que o produto é amplificado são expressos graficamente (sinais de fluorescência x número de ciclos) permitindo monitorar, em tempo real, a cinética e a eficiência da reação de amplificação. A quantificação do produto amplificado é realizada através da comparação com uma curva padrão que correlaciona à intensidade de sinais de fluorescência gerados durante os ciclos de amplificação, com as concentrações conhecidas de uma sequência idêntica a que se quer quantificar (Saunders, 2004).

O uso da qPCR para análises ambientais se difundiu na última década por uma série de fatores positivos como: o potencial de apresentar uma análise direcionada, que permite a busca de um gene ou mutação específica; a quantificação da abundância ou prevalência de genes específicos de resistência em determinada amostra; a análise simultânea de vários genes, bem como de genes de referência, como o 16S; assim como a descrição na literatura de protocolos padronizados (primers, referências e condições), que possibilitam a reprodução da técnica em diferentes laboratórios e facilitam a comparação dos resultados entre diferentes estudos. (Czekalski et al., 2015; Rocha et al., 2018). Entretanto, a qPCR também apresenta algumas limitações como: os resultados dependem fundamentalmente da qualidade da extração do DNA; a presença de inibidores da PCR em matrizes complexas pode comprometer a precisão da quantificação de ARG; o limite de quantificação pode ser alto quando comparado ao risco associado para alguns ARG; os protocolos disponíveis estão limitados a ARG que já foram previamente caracterizados; assim como, matrizes complexas podem levar a amplificações incorretas, gerando falsos resultados (Manaia et al., 2018).

## 6.2.2 Análise da Comunidade Microbiana

Métodos de análise molecular da comunidade microbiana têm revolucionado o entendimento de diversidade e distribuição de bactérias, arqueias e micro-organismos eucariotos. As informações obtidas têm demonstrado que a análise de sistemas de modelos microbianos podem prover importantes percepções dentro da funcionalidade e estabilidade de um ecossistema (Bent & Forney, 2008). O conceito de metagenoma é o acesso ao DNA microbiano total extraído de uma amostra ambiental independente de cultivo, incluindo clonagem e análise da amostra. A metagenômica é uma poderosa ferramenta para explorar a ecologia e perfil metabólico do complexo ambiente das comunidades microbianas, bem como identificar novas biomoléculas pelo uso de bibliotecas construídas a partir de ácidos nucléicos isolados (Ferrer, et al., 2009; Simon & Daniel, 2010).

A técnica incide nas seguintes etapas básicas: isolamento de DNA de qualquer amostra ambiental, clonagem do DNA em vetor apropriado, transformação dos clones recombinantes em uma célula hospedeira, e análise da biblioteca metagenômica, que pode ser baseada em função dos genes ou no sequenciamento de DNA. As análises metagenômicas de amostras ambientais têm sido propostas por esta ser a mais acurada técnica para descrição de comunidades microbianas presentes em um habitat (Von Mering, et al., 2007).

Um grande diferencial das análises metagenômicas é o potencial de fornecer não apenas uma visão geral da comunidade de ARG presente em determinada amostra, mas também suas variáveis, ou novos ARG que podem estar presentes em um determinado ambiente (Oulas et al. 2015). A aplicação da metagenômica para estudar ARG e a diversidade bacteriana em vários ambientes, incluindo águas residuais tem sido amplamente demonstrada (Li et al., 2015; Munck et al., 2015; Tang et al., 2016).

Entretanto, o método apresenta algumas desvantagens como: a necessidade de equipamentos sofisticados e profissionais com conhecimentos avançados em bioinformática e microbiologia para a correta interpretação dos resultados; requer uma determinada quantidade de DNA para análise, que nem sempre é possível ser obtida em algumas amostras; pode apresentar alta variação entre as réplicas, o que significa que um maior número de repetições pode ser necessário para detectar diferenças estatisticamente significativas; assim como a falta de métodos padronizados para a análise de dados, reduz a reprodutibilidade e comparação entre estudos similares.

Recentemente, muitos estudos tem validado a utilização do sequenciamento metagenômico para detectar ARG em ETAR, com o objetivo de avaliar a abundância de ARG em diferentes plantas de tratamento e determinar a eficiência de remoção de ARG em diferentes processos de tratamento nos efluentes e no lodo (Li et al., 2013; Li et al., 2015; Paiva et al., 2017., Yang et al., 2014; Bengtsson-Palme et al., 2016., Christgen et al., 2015).

## 7. Remoção de ARB e ARG em Plantas de Tratamento de Águas Residuais

Um grande número de metodologias vem sendo estudado para auxiliar na remoção de ARB e ARG nas estações de tratamento de águas residuais. Tais estudos buscam estabelecer tecnologias eficientes e inovadoras para abordar esta problemática. No entanto, a remoção de ARB e ARG em ETAR depende não somente da tecnologia de tratamento utilizada, mas também das condições de operação da planta de tratamento (Christgen et al., 2015; Kim et al., 2007; Manaia et al., 2010). Christgen et al. (2015) relataram que reatores aeróbios, ou a combinação de reatores aeróbios-anaeróbios são mais eficazes na remoção de ARG do que reatores anaeróbios. Maiores tempos de detenção hidráulica também auxiliam no aumento da remoção de micro-organismos no sistema de lodo ativado. No entanto, o maior tempo de exposição pode favorecer a troca de ARG, podendo promover a resistência a múltiplas drogas (Manaia et al., 2010).

A utilização de processos avançados de tratamento, após o tratamento biológico tem sido amplamente avaliada para a remoção de ARB e ARG, técnicas como: radiação ultravioleta e cloração (Zhang et al., 2019); coagulação (Li et al., 2017); fotocatalise, e foto-fenton (Moreira et al., 2018); ozonização (Sousa et al., 2016); filtração por membrana (Le et al., 2018), entre outras tem sido testadas. A remoção de ARG, conjuntamente com as ARB é crucial, pois mesmo com a inativação dos micro-organismos, os genes de resistência contidos no DNA das bactérias é liberado no meio ambiente, podendo ser transferido para outras células pelo processo de transferência horizontal de genes, contribuindo para a proliferação da resistência bacteriana (Crecchio et al., 2005).

Nesse contexto, tecnologias de tratamento que utilizam radiação UV e ozonização parecem bastante promissoras, tendo em vista que ambas apresentam a capacidade de causar danos no DNA das células (Macauley et al., 2006; Oncü et al., 2011; Rastogi et al., 2010). Entretanto, a discrepância de resultados entre diferentes estudos, demonstra a dificuldade de se padronizar metodologias para a remoção da resistência bacteriana em efluentes, uma vez

que os resultados podem variar por uma série de fatores como: dosagem utilizada, condições físicas e químicas da amostra, assim como pela susceptibilidade dos micro-organismos. Por exemplo, para a radiação UV, alguns estudos apontam a redução de ARB em escala de 3 a 5 log (Macauley et al., 2006; Mckinney e Pruden, 2012), entretanto outras publicações relatam a ineficiência do tratamento na diminuição da abundância de ARB e ARG em efluentes (Munir et al., 2011; Rusin e Gerba, 2001).

O mesmo ocorre com a cloração onde alguns trabalhos relatam a remoção de ARB (Huang et al., 2011; Macauley et al., 2006) e outros apontam para nenhum efeito positivo (Munir et al., 2011; Rusin e Gerba, 2001). Na ozonização ocorre situação similar, Macauley et al. 2006 e Zhuang et al. 2015, descrevem que o tratamento contribuiu para uma redução que variou de 2 a 3.9 log, já Alexander et al. 2016 não observou nenhuma mudança para *Pseudomonas aeruginosa* e constatou o aumento da abundância dos genes de resistência vanA e bla<sub>VIM</sub> (Alexander et a., 2016).

Portanto fica claro que muito ainda deve ser feito, na busca por tecnologias e procedimentos que efetivamente contribuam para a remoção da resistência bacteriana nas ETAR. Entretanto, a variabilidade das características dos efluentes e a dificuldade de controle de fatores adversos nas plantas de tratamento são considerados um importante agravante na dificuldade de reprodutibilidade e comparação entre estudos similares. Isto demonstra que talvez seja impossível o desenvolvimento de um único modelo de tratamento que solucione a problemática da resistência bacteriana em ETAR, e que protocolos regionais que levem em consideração as peculiaridades das suas águas residuais, assim como a viabilidade de combinação de diferentes técnicas de tratamento, possam ser o caminho mais próximo para a obtenção de resultados consistentes.

## 8. Considerações Finais

A presença difusa de resíduos de antibióticos e resistência bacteriana em Estações de Tratamento de Águas Residuais representa um extraordinário desafio a ser enfrentado. A busca por políticas públicas, tratamentos inovadores, investimento em pesquisa e tecnologias voltadas à solução dessa problemática são de suma importância para a melhora do cenário atual. Tentativas de atenuar, adiar e gerenciar a presença de bactérias e genes de resistência são um desafio para diversas áreas de investigação, mas sem dúvida alguma, o uso consciente de antibióticos pela medicina, pecuária e agricultura é peça chave para conter o avanço de

ARB e ARG. Apesar do pouco conhecimento e compreensão ainda existente sobre os efeitos da presença de antibióticos no meio ambiente, e conseqüentemente da exposição dos organismos aquáticos e terrestres a estes medicamentos, o risco eminente desta exposição não pode ser negligenciado.

Embora várias técnicas de inativação tenham sido investigadas, com a finalidade de se estabelecer uma maneira correta de evitar a liberação de ARB no meio ambiente, a maioria das técnicas apresentam limitações. O estudo da interação de ARB e ARG nas águas residuais apresenta uma alta complexidade, em razão de inúmeros fatores externos que são dificilmente controlados e monitorados em sistemas reais de tratamento. Esta provavelmente seja a razão de encontrar-se achados tão contraditórios na literatura, e muitos questionamentos ainda não terem sido respondidos, apesar dos esforços de pesquisadores do mundo todo em contribuir para a solução deste problema.

Outra questão importante diz respeito à reativação dos micro-organismos após o tratamento. Como relatado em estudos anteriores (Becerra-Castro et al., 2016; Moreira et al., 2018; Sousa et al., 2016), o desafio de inativar ARB e ARG dos efluentes não pode ser avaliado somente imediatamente após o tratamento proposto. Pois os micro-organismos apresentam a capacidade de se reestabelecer após o período de superação da condição estressora, o que pode ocasionar o aumento de ARB e ARG no efluente tratado. Dessa forma, não apenas acarretando ineficiência do tratamento proposto, mas também piora da condição inicial observada, levando ao incremento de ARB e ARG no ambiente.

Em resumo, o combate ao avanço da resistência bacteriana deve considerar alguns fatores como:

- O controle e monitoramento de águas contaminadas com antibióticos;
- Priorizar a análise de antibióticos, ARB e ARG em amostras ambientais, através de protocolos bem fundamentados que facilitem a reprodução e comparação dos resultados;
- As pesquisas devem servir de apoio para auxiliar o poder público na tomada de decisão de medidas de combate à resistência bacteriana;
- A sensibilização e educação da população, bem como dos profissionais de saúde em geral sobre o uso sensato de antibióticos é vital para garantir a eficácia dos antibióticos atualmente existentes, assim como diminuir o incremento de subprodutos de antibióticos no meio ambiente;



- E por fim, porém não menos importante, a continua investigação de tecnologias que possam contribuir para a remoção de antibióticos e inativação de ARB e ARG nos efluentes de forma eficaz, evitando o ciclo de contaminação e disseminação de resistência bacteriana que vivenciamos atualmente.

## Referências

- Ahn, Y., Choi, J., 2016. Bacterial communities and antibiotic resistance communities in a full-scale hospital wastewater treatment plant by high-throughput pyrosequencing. *Water* 8, 580.
- Alexander, J., Knopp, G., Dotsch, A., Wieland, A., Schwartz, T., 2016. Ozone treatment of conditioned wastewater selects antibiotic resistance genes, opportunistic bacteria, and induce strong population shifts. *Sci. Total Environ.* 559, 103-112.
- Aminov, R. I., Mackie, R. I., 2007. Evolution and ecology of antibiotic resistance genes. *FEMS Microbiol. Lett.* 271, 147–161.
- Baptista, M. G. F. M., 2013. Mecanismos de Resistência aos antibióticos. Dissertação de mestrado, Programa de Ciências Farmacêuticas da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia - Lisboa, p. 51.
- Baran, W., Adamek, E., Ziemiańska, J., Sobczak, A., 2011. Effects of the presence of sulfonamides in the environment and their influence on human health. *J. Hazard. Mater.* 196, 1–15.
- Barros, E., Bittencourt, H., Caramori, M. L., Machado, A., 2001. Antimicrobianos. *Artmed* 3, 419.
- Becerra-Castro, C., Macedo, G., Silva, A.M.T., Manaia, C.M., Nunes, O.C., 2016. Proteobacteria become predominant during regrowth after water disinfection. *Sci. Total Environ.* 573, 313–323.
- Bengtsson-Palme, J., Hammaren, R., Pal, C., Ostman, M., Bjorlenius, B., Flach, C.F., Fick, J., Kristiansson, E., Tysklind, M., Larsson, D.G.J., 2016. Elucidating selection processes for antibiotic resistance in sewage treatment plants using metagenomics. *Science of the Total Environment* 572, 697-712.
- Bent, S. J., Forney, L. J., 2008. The tragedy of the uncommon: understanding limitations in the analysis of microbial diversity. *International Society for Microbial Ecology* 2, 689- 695
- Blasco, M. D., Esteve, C., Alcaide, E., 2008. Multiresistant waterborne pathogens isolated from water reservoirs and cooling systems, *J. Appl. Microbiol.* 105, 469–475.
- Buthelezi, S. P., Olaniran, A. O., Pillay, B., 2010. Production and characterization of biofloculants from bacteria isolated from wastewater treatment plant in South Africa. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 15, 874–881.
- Christgen, B., Yang, Y., Ahammad, S. Z., Li, B., Rodriguez, D. C., Zhang, T., Graham, D. W., 2015. Metagenomics shows that low-energy anaerobic–aerobic treatment reactors reduce antibiotic resistance gene levels from domestic wastewater. *Environmental Science & Technology* 49, 2577-2584.
- Cowan, D. A., 2000. Microbial genomes – the untapped resource. *Tibtech.* 18:14-16, p. 15.

- Crecchio, C., Ruggiero, P., Curci, M., Colombo, C., Palumbo, G., Stotzky, G., 2005. Binding of DNA from on montmorillonitehumic acidsealuminum or iron hydroxypolymers. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 69, 834-837.
- Cytryn, E., 2013. The soil resistome: the anthropogenic, the native, and the unknown. *Soil Biol. Biochem.* 63, 18-23.
- Czekalski, N., Sigdel, R., Birtel, J., Matthews, B., Bürgmann, H., 2015. Does human activity impact the natural antibiotic resistance background? Abundance of antibiotic resistance genes in 21 Swiss lakes. *Environ. Int.* 81, 45–55.
- Dao, N., Joshi-Datar, A., Lepine, F., Bauerle, E., Olakanmi, O., Beer, K., McKay, G., Siehnel, R., Schafhauser, J., Wang, Y., Britigan, B.E., Singh, P.K., 2011. Active Starvation Responses Mediate Antibiotic Tolerance in Biofilms and Nutrient-Limited Bacteria. *Science* 334, 982-986.
- Davis, M., 2017. Tratamento de águas para abastecimento e residuárias: princípios e práticas. Elsevier 1, 801.
- Donlan, R.M., 2000. Role of biofilms in antimicrobial resistance. *ASAIO J.* 46, 47-52.
- Exner, M. et al., 2017. Antibiotic resistance: what is so special about multidrug- resistant gram-negative bacteria?. *GMS Hygiene and Infection Control.* 12.
- Ferrer, M. A., Beloqui, A., Timmis, K. N., Golyshin, P. N., 2009. Metagenomics for mining new genetic resources of microbial communities. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 16, 109-123.
- Fish, K.E., Osborn, A.M., Boxall, J., 2016. Characterising and understanding the impact of microbial biofilms and the extracellular polymeric substance (EPS) matrix in drinking water distribution systems. *Environmental Science-Water Research & Technology* 2, 614-630
- Garcha, S., Verma, N., Brar, S. K., 2016. Isolation, characterization and identification of microorganisms from unorganized dairy sector wastewater and sludge samples and evaluation of their biodegradability. *Water Resour. Ind.* 16, 19–28.
- Grady, C. P. L., Daigger, G. T., Love, N., Filipe, C. D. M., 2011. Biological wastewater treatment. CRC Press.
- Grenni, P., Ancona, V., Caracciolo, A. B., 2018. Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: a review. *Microchem. J.* 136, 25–39.
- Guardabassi, L., Lo Fo Wong, D. M. A., Dalsgaard, A., 2002. The effects of tertiary wastewater treatment on the prevalence of antimicrobial resistant bacteria. *Water Res.* 36, 1955–1964.
- Guo, X., Feng, C., Zhang, J., Tian, C., Liu, J., 2017. Role of dams in the phase transfer of antibiotics in an urban river receiving wastewater treatment plant effluent. *Sci. Total Environ.* 607–608, 1173–1179.
- Harnisz, M., 2013. Total resistance of native bacteria as an indicator of changes in the water environment. *Environ. Pollut.* 174, 85–92.

- Hembach, N., Schmid, F., Alexander, J., Hiller, C., Rogall, E. T., Schwartz, T., 2017. Occurrence of the *mcr-1* colistin resistance gene and other clinically relevant antibiotic resistance genes in microbial populations at different municipal wastewater treatment plants in Germany. *Front. Microbiol.* 8.
- Henze, M., Comeau, Y., 2008. Wastewater characterization. *Biol. Wastewater Treat. Princ. Model. Des.*, 33–52.
- Henze, M., Van Loosdrecht, M. C. M., Ekama, G. A., Brdjanovic, D., 2008. Biological wastewater treatment: principles, modelling and design. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 511.
- Hooper, D. C., 2001 Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Emerg Infect Dis.* 7, 41-337.
- Huang, J. J., Hu, H. Y., Lu, S. Q., Li, Y., Tang, F., Lu, Y., Wei, B., 2012. Monitoring and evaluation of antibiotic-resistant bacteria at a municipal wastewater treatment plant in China. *Environ. Int.* 42, 31–36.
- Inyinbor, A. A., Bello, O. S., Fadiji, A. E., Inyinbor, H. E., 2017. Threats from antibiotics: a serious environmental concern. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 6, 784-793.
- Kaplan, E., Sela, N., Doron-Faigenboim, A., Navon-Venezia, S., Jurkevitch, E., Cytryn, E., 2015. Genomic and functional characterization of *qnr*-encoding plasmids from municipal wastewater biosolid *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Front. Microbiol.* 6.
- Khameneh, B., Diab, R., Ghazvini, K., Barraza, B. S. F., 2016. Breakthroughs in bacterial resistance mechanisms and the potential ways to combat them. *Microbial Pathogenesis* 95, 32-42.
- Kim, S., Jensen, J. N., Aga, D. S., Weber, A. S., 2007. Fate of tetracycline resistant bacteria as a function of activated sludge process organic loading and growth rate. *Water Sci. Technol.* 55, 291-297.
- Köck-Schulmeyer, M., Villagrasa, M., López de Alda, M., Céspedes-Sánchez, R., Ventura, F., Barceló, D., 2013. Occurrence and behavior of pesticides in wastewater treatment plants and their environmental impact. *Sci. Total Environ.* 458–460, 466-476.
- Korzeniewska, E., Harnisz, M., 2013. Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-positive Enterobacteriaceae in municipal sewage and their emission to the environment. *J. Environ. Manag.* 128, 904–911.
- Korzeniewska, E., Korzeniewska, A., Harnisz, M., 2013. Antibiotic resistant *Escherichia coli* in hospital and municipal sewage and their emission to the environment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 91, 96–102.
- Kumar, A., Pal, D., 2017. Antibiotic resistance and wastewater: correlation, impact and critical human health challenges. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 6, 52-58.
- Kümmerer, K., 2009. Antibiotics in the aquatic environment – a review – part I. *Chemosphere* 75, 417–434.

- Laht, M., Karkman, A., Voolaid, V., Ritz, C., Tenson, T., Virta, M., Kisand, V., 2014. Abundances of tetracycline, sulphonamide and beta-lactam antibiotic resistance genes in conventional Wastewater Treatment Plants (WWTPs) with different waste load. 9, 1-8.
- Le, T., Ng, C., Tran, N. H., Chen, H., Gin, K. Y., 2018. Removal of antibiotic residues, antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes in municipal wastewater by membrane bioreactor systems. *Water Research* 145, 498-508.
- Lekunberri, I., Villagrasa, M., Balcázar, J. L., Borrego, C. M., 2017. Contribution of bacteriophage and plasmid DNA to the mobilization of antibiotic resistance genes in a river receiving treated wastewater discharges. *Sci. Total Environ*, 601–602, 206–209.
- Leung, H. W., Minh, T. B., Murphy, M. B., Lam, J. C. W., So, M. K., Martin, M., Lam, P. K. S., Richardson, B. J., 2012. Distribution, fate and risk assessment of antibiotics in sewage treatment plants in Hong Kong, South China. *Environ. Int.* 42, 1–9.
- Levin, A. S., Barone, A. A., Penço, J., Santos, M. V., Marinho, I. S., Arruda, E. A., et al, 1999. Intravenous colistin as therapy for nosocomial infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Clin Infect Dis.* 28, 11-1008.
- Levy, S. B., Marshall, B., 2004. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat. Med.* 10, 122-129.
- Li, B., Yang, Y., Ma, L., Ju, F., Guo, F., Tiedje, J. M., Zhang, T., 2015. Metagenomic and network analysis reveal wide distribution and co-occurrence of environmental antibiotic resistance genes. *ISME Journal* 9, 2490-2502.
- Li, B., Zhang, X., Guo, F., Wu, W., Zhang, T., 2013. Characterization of tetracycline resistant bacterial community in saline activated sludge using batch stress incubation with high throughput sequencing analysis. *Water Research* 47, 4207-4216.
- Li, D., Yang, M., Hu, J., Zhang, J., Liu, R., Gu, X., Zhang, Y., Wang, Z., 2009. Antibiotic resistance profile in environmental bacteria isolated from penicillin production wastewater treatment plant and the receiving river. *Environ. Microbiol* 11.
- Li, N., Sheng, G., Lu, Y., Zeng, R. J., Yu, H., 2017. Removal of antibiotic resistance genes from wastewater treatment plant effluent by coagulation. *Water Research* 111, 204-212.
- Lien, L. T. Q., Lan, P. T., Chuc, N. T. K., Hoa, N. Q., Nhung, P. H., Thoa, N. T. M., Diwan, V., Tamhankar, A. J., Lundborg, C. S., 2017. Antibiotic resistance and antibiotic resistance genes in *Escherichia coli* isolates from hospital wastewater in Vietnam. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 14, 699.
- Liu, S., Qu, H., Yang, D., Hu, H., Liu, W., Qiu, Z., Hou, A., Guo, J., Li, J., Shen, Z., Jin, M., 2018. Chlorine disinfection increases both intracellular and extracellular antibiotic resistance genes in a full-scale wastewater treatment plant. *Water Research* 136, 131-136.
- Llosa, M., Gomis-Rüth, F. X., Coll, M., De la Cruz, F., 2002. Bacterial conjugation: a two-step mechanism for DNA transport. *Mol Microbiol.* 45, 1-8.

- Low, D. E., Keller, N., Barth, A., Jones, R. N., 2001. Clinical prevalence, antimicrobial susceptibility, and geographic resistance patterns of enterococci: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin Infect Dis.* 32, 45-133.
- Luprano, M. L., De Sanctis, M., Moro, G. D., Iaconi, C. D., Lopez, A., Levantesi, C., 2016. Antibiotic resistance genes fate and removal by a technological treatment solution for water reuse in agriculture. *Sci Total Environ.* 571, 809–818.
- Ma, L. P., Li, B., Zhang, T., 2014. Abundant rifampin resistance genes and significant correlations of antibiotic resistance genes and plasmids in various environments revealed by metagenomic analysis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 5195-204.
- Macauley, J. J., Qiang, Z., Adams, C. D., Surampalli, R., Mormile, M. R., 2006. Disinfection of swine wastewater using chlorine, ultraviolet light and ozone. *Water Res.* 40, 2017-2026.
- Mackay, I. M., et al., 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clinic Microbiol infect* 10, 190-212.
- Manaia, C. M., 2017. Assessing the risk of antibiotic resistance transmission from the environment to humans: non-direct proportionality between abundance and risk. *Trends Microbiol* 25, 173-181.
- Manaia, C. M., Macedo, G., Fatta-Kassinos, D., Nunes, O. C., 2016. Antibiotic resistance in urban aquatic environments: can it be controlled? *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 1543–1557.
- Manaia, C. M., Novo, A., Coelho, B., Nunes, O. C., 2010. Ciprofloxacin resistance in domestic wastewater treatment plants. *Water. Air. Soil Pollut.* 208, 335-343.
- Manaia, C. M., Rocha, J., Scaccia, N., Marano, R., Radu, H., Biacullo, F., Cerqueira, F., Fortunato, G., Iakovos, C. I., Zammit, I., Kampouris, I., Vaz-Moreira, I., Nunes, O. C., 2018. Antibiotic resistance in wastewater treatment plants: tackling the black box. *Environment International* 115, 312-324.
- Marano, R., Cytryn, E., 2017. The mobile resistome in wastewater treatment facilities and downstream environments. *Antimicrobial Resistance in Wastewater Treatment Processes*, 129.
- Marti, R., Tien, Y. C., Murray, R., Scott, A., Sabourin, L., Topp, E., 2014. Safely coupling livestock and crop production systems: how rapidly do antibiotic resistance genes dissipate in soil following a commercial application of swine or dairy manure? *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 3258–3265.
- Mathieu, L., Bertrand, I., Abe, Y., Angel, E., Block, J., Skali-Lami, S., Francius, G., 2014. Drinking water biofilm cohesiveness changes under chlorination or hydrodynamic stress. *Water Research* 55, 175-184.
- Mckinney, C. W., Pruden, A., 2012. Ultraviolet disinfection of antibiotic resistant bacteria and their antibiotic resistance genes in water and wastewater. *Environ. Sci. Technol.* 46, 13393-13400.

- McLain, J. E., Cytryn, E., Durso, L. M., Young, S., 2016. Culture-based methods for detection of antibiotic resistance in agroecosystems: advantages, challenges, and gaps in knowledge. *J. Environ. Qual.* 45, 432.
- Michael, I., Rizzo, L., McArdell, C. S., Manaia, C. M., Merlin, C., Schwartz, T., Dagot, C., Fatta-Kassinos, D., 2013. Urban wastewater treatment plants as hotspots for the release of antibiotics in the environment: a review. *Water Res.* 47, 957–995.
- Miller, L. G., Perdreau-Remington, F., Rieg, G., Mehdi, S., Perlroth, J., Bayer, A. S., et al., 2005. Necrotizing fasciitis caused by community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Los Angeles. *N Engl J Med.* 352, 1445-53.
- Moreira, N. F. F., Narciso-da-Rocha, C., Polo-López, M. I., Pastrana-Martínez, L. M., Faria, J. L., Manaia, C. M., Fernández-Ibáñez, P., Nunes, O. C., Silva, A. M. T., 2018. Solar treatment (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub>-P25 and GO-TiO<sub>2</sub> photocatalysis, photo-fenton) of organic micropollutants, human pathogen indicators, antibiotic resistant bacteria and related genes in urban wastewater. *Water Res.* 15, 195–206.
- Mosquito, S., et al., 2011. Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 28, 648-656.
- Moura, A., Pereira, C. C., Henriques, I., Correia, A., 2011. Novel gene cassettes and integrons in antibiotic-resistant bacteria isolated from urban wastewaters. *Res. Microbiol.* 163, 92–100.
- Munck, C., Albertsen, M., Telke, A., Ellabaan, M., Nielsen, P. H., Sommer, M. O., 2015. Limited dissemination of the wastewater treatment plant core resistome. *Nat. Commun.* 6, 8452.
- Munir, M., Wong, K., Xagorarakis, I., 2011. Release of antibiotic resistant bacteria and genes in the effluent and biosolids of five wastewater utilities in Michigan. *Water Res.* 45, 681-693.
- Novo, A., Andre, S., Viana, P., Nunes, O. C., Manaia, C. M., 2013. Antibiotic resistance, antimicrobial residues and bacterial community composition in urban wastewater. *Water Res.* 47, 1875-1887.
- Oncü, N. B., Ziya, Y., Balç, A., 2011. Comparison of the effectiveness of chlorine, ozone,  $\text{H}_2\text{O}_2$  and photocatalytic disinfection in reducing the risk of antibiotic resistance pollution. *J. Adv. Oxid. Technol.* 14, 196-203.
- O'Neill, J., 2016. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. *Rev. Antimicrob. Resist.* 84.
- Oulas, A., Pavludi, C., Polymenakou, P., Pavlopoulos, G. A., Papanikolaou, N., Kotoulas, G., Arvanitidis, C., Iliopoulos, I., 2015. Metagenomics: tools and insights for analyzing next-generation sequencing data derived from biodiversity studies. *Bioinf. Biol. Insights* 9, 75–88.
- Paiva, M. C., Reis, M. P., Costa, P. S., Dias, M. F., Bleicher, L., Scholte, L. L. S., Nardi, R. M. D., Nascimento, A. M. A., 2017. Identification of new bacteria harboring *qnrS* and *aac* (6')-Ib/cr and mutations possibly involved in fluoroquinolone resistance in raw sewage and activated sludge samples from a full-scale WWTP. *Water Research* 110, 27-37.

- Proia, L., Anzil, A., Subirats, J., Borrego, C., Farrè, M., Llorca, M., Balcázar, J. L., Servais, P., 2018. Antibiotic resistance in urban and hospital wastewaters and their impact on a receiving freshwater ecosystem. *Chemosphere* 206, 70-82.
- Rafraf, I. D., Lekunberri, I., Sanchez-Melsi, A., Aouni, M., Borrego, C. M., Balcazar, J. L., 2016. Abundance of antibiotic resistance genes in five municipal wastewater treatment plants in the Monastir Governorate, Tunisia. *Environmental Pollution*. 219, 353-358.
- Rastogi, R. P., Richa Kumar, A., Tyagi, M. B., Sinha, R. P., 2010. Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair. *J. Nucleic Acids*, 1-32.
- Richards, J. J., Melander, C., 2009. Small molecule approaches toward the non-microbicidal modulation of bacterial biofilm growth and maintenance. *Antiinfect Agents Med Chem*. 8, 295-314.
- Rizzo, L., Manaia, C., Merlin, C., Schwartz, T., Dagot, C., Ploy, M. C., Michael, I., Fatta-Kassinos, D., 2013. Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: a review. *Sci Total Env*. 447, 345–360
- Rocha, J., Cacace, D., Kampouris, I., Guilloteau, H., Jäger, T., Marano, R. B. M., Karaolia, P., Manaia, C. M., Merlin, C., Fatta-Kassinos, D., 2018. Inter-laboratory calibration of quantitative analyses of antibiotic resistance genes. *J. Environ. Chem. Eng*.
- Rossolini, G. M., Arena, F., Giani, T., 2017. Infectious diseases. Mechanisms of Antibacterial Resistance 138, 1181- 1196.
- Rusin, P., Gerba, C., 2001. Association of chlorination and UV irradiation to increasing antibiotic resistance in bacteria. *Rev. Environ. Contam. Toxicol*. 171, 1-52.
- Saunders, N. A., 2004. Real-time PCR. *Methods Mol. Biol* 266, 191-211.
- Silva, J., Castillo, G., Callejas, L., Lopez, H., Olmos, J., 2006. Frequency of transferable multiple antibiotic resistance amongst coliform bacteria isolated from a treated sewage effluent in Antofagasta, Chile. *Elect. J. Biotechnol*. 9, 533–540.
- Simon, C., Daniel, R., 2010. Construction of small-insert and large-insert metagenomic libraries. *Methods in Molecular Biology* 668, 39-50.
- Singh, R., Paul, D., Jain, R. K., 2006. Biofilms: implications in bioremediation. *Trends Microbiol*. 14, 389-97.
- Sousa, J. M., Macedo, G., Pedrosa, M., Becerra-Castro, C., Castro-Silva, S., Pereira, M. F. R., Silva, A. M. T., Nunes, O. C., Manaia, C. M., 2016. Ozonation and UV254nm radiation for the removal of microorganisms and antibiotic resistance genes from urban wastewater. *J. Hazard. Mater*. 323, 434–441.
- Sperling, M. V., 2005. Princípios do tratamento biológico de águas residuárias. *Introdução à Qualidade das Águas e ao Tratamento de Esgotos* 1, 238.
- Tang, J., Bu, Y., Zhang, X. X., Huang, K., He, X., Ye, L., Shan, Z., Ren, H., 2016. Metagenomic analysis of bacterial community composition and antibiotic resistance genes in



a wastewater treatment plant and its receiving surface water. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 132, 260–269.

Tarazi, M. F. A., 2010. Comunidade bacteriana endofítica em microplantas de abacaxizeiro: estrutura, diversidade e sua influência na morfologia após antibioticoterapia. Tese de doutorado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 137.

Tchobanoglous, G., Stensel, H. D., Burton, F. L., Eddy, M., 2003. *Wastewater engineering: treatment and reuse*. McGraw Hill.

Thiele-Bruhn, S., Beck, I. C., 2005. Effects of sulfonamide and tetracycline antibiotics on soil microbial activity and microbial biomass. *Chemosphere* 59, 457–46.

Tien, Y. C., Li, B., Zhang, T., Scott, A., Murray, R., Sabourin, L., Topp, E. M. R., 2017. Impact of dairy manure pre-application treatment on manure composition, soil dynamics of antibiotic resistance genes, and abundance of antibiotic-resistance genes on vegetables at harvest. *Sci. Total Environ.* 581–582, 32–39.

Todar, K., 2008. Bacterial resistance to antibiotics, principles of bacterial pathogenesis, *Todar's Online Textbook of Bacteriology*.

United States Environmental Protection Agency, 1986. Ambient water quality criteria for bacteria. Regulations and Standards Criteria and Standards Division Office of Water.

Van Dijk, E. L., Auger, H., Jaszczyszyn, Y., Thermes, C., 2014. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends in Genetics*. 30, 418-426.

Varela, A. R., Manageiro, V., Ferreira, E., Guimarães, M. A., Da Costa, P. M., Caniça, M., Manaia, C. M., 2015. Molecular evidence of the close relatedness of clinical, gull and wastewater isolates of quinolone-resistant *Escherichia coli*. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 3, 286–289.

Vaz-Moreira, I., Nunes, O. C., Manaia, C. M., 2014. Bacterial diversity and antibiotic resistance in water habitats: searching the links with the human microbiome. *FEMS Microbiol. Rev.* 38, 761–778.

Von Mering, C., Hugenholtz, P., Tringe, S. G., Doerks, T., Jensen, L. J., Ward, N., Bork, P., 2007. Quantitative phylogenetic assessment of microbial communities in diverse environments. *Science* 315, 1126-1130.

Walden, C., Carbonero, F., Zhang, W., 2017. Assessing impacts of DNA extraction methods on next generation sequencing of water and wastewater samples. *Journal of Microbiological Methods* 141, 10-16.

Wang, Q., Wang, P., Yang, Q., 2018. Occurrence and diversity of antibiotic resistance in untreated hospital wastewater. *Sci. Total Environ.* 621, 990–999.

Webber, M., Piddock, L., 2003. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother.* 51, 9-11.

- Wei, R., Ge, F., Huang, S., Chen, M., Wang, R., 2011. Occurrence of veterinary antibiotics in animal wastewater and surface water around farms in Jiangsu Province, China. *Chemosphere* 82, 1408–1414.
- WHO, 2014. Antimicrobial Resistance: global report on surveillance. World Health Organization.
- Yang, Y., Li, B., Zou, S., Fang, H.H.P., Zhang, T., 2014. Fate of antibiotic resistance genes in sewage treatment plant revealed by metagenomic approach. *Water Res.* 62, 97–106.
- Zanotto, C., Bissa, M., Illiano, E., Mezzanotte, V., Marazzi, F., Turolla, A., Antonelli, M., Morghen C. D. G., Radaelli, A., 2016. Identification of antibiotic-resistance *Escherichia coli* isolated from a municipal wastewater treatment plant. *Chemosphere* 164, 627-633.
- Zhang, T., Hu, Y., Jiang, L., Yao, S., Lin, K., Zhou, Y., Cui, C., 2019. Removal of antibiotic resistance genes and control of horizontal transfer risk by UV, chlorination and UV/chlorination treatments of drinking water. *Chemical Engineering Journal* 358, 589-597.
- Zhuang, Y., Ren, H., Geng, J., Zhang, Y., Zhang, Y., Ding, L., Xu, K., 2015. Inactivation of antibiotic resistance genes in municipal wastewater by chlorination, ultraviolet, and ozonation disinfection. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 7037-7044.

### **3 ARTIGO 2 - Removal of microorganisms and antibiotic resistance genes from treated urban wastewater: a comparison between aluminium sulphate and tannin coagulants**

Bárbara W. N. Grehs <sup>a</sup>; Ana Rita Lopes<sup>\*,b</sup>; Nuno F. F. Moreira<sup>\*,b,c</sup>; Telma Fernandes <sup>d</sup>; Maria A. O. Linton <sup>e</sup>; Adrián M. T. Silva <sup>c</sup>; Célia M. Manaia <sup>d</sup>; Elvis Carissimi <sup>a,#</sup>; Olga C. iNunes <sup>b,#</sup>

<sup>a</sup> Department of Sanitary and Environmental Engineering, Federal University of Santa Maria (UFSM), Av. Roraima 1000, CT Lab, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

<sup>b</sup> LEPABE - Laboratory for Process Engineering, Environment, Biotechnology and Energy, Faculty of Engineering, University of Porto, Rua Dr. Roberto Frias, 4200-465 Porto, Portugal

<sup>c</sup> Laboratory of Separation and Reaction Engineering - Laboratory of Catalysis and Materials (LSRE-LCM), Faculdade de Engenharia, Universidade do Porto, Rua Dr. Roberto Frias, 4200-465 Porto, Portugal

<sup>d</sup> Universidade Católica Portuguesa, CBQF - Centro de Biotecnologia e Química Fina – Laboratório Associado, Escola Superior de Biotecnologia, Rua Arquiteto Lobão Vital, 172, 4200-374 Porto, Portugal

<sup>e</sup> Department of Biology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

\* Both authors contributed equally to this manuscript

# Corresponding author

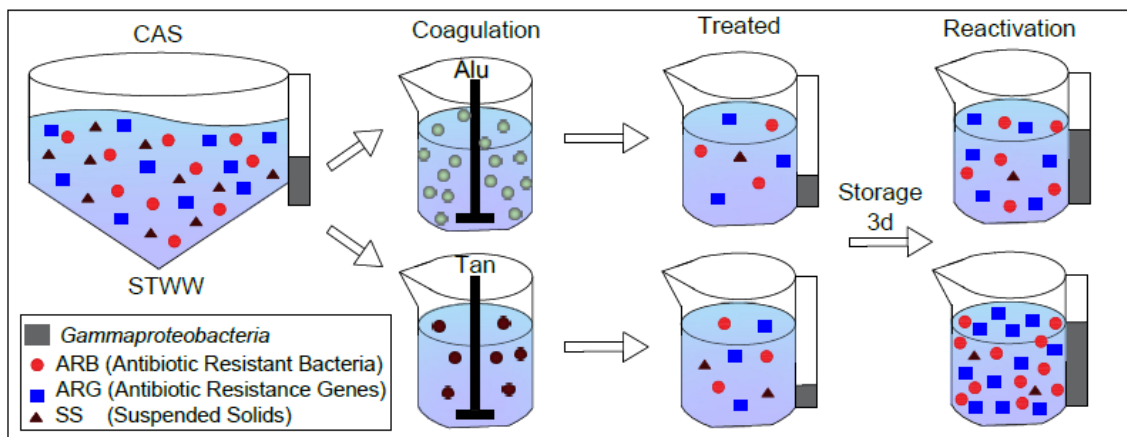
Address 1: Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, University of Porto, Rua Dr. Roberto Frias, s/n 4200-465 Porto, Portugal; Email address: [opnunes@fe.up.pt](mailto:opnunes@fe.up.pt)

Address 2: Department of Sanitary and Environmental Engineering, Federal University of Santa Maria (UFSM), Av. Roraima 1000, CT Lab, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil; Email address: [ecarissimi@gmail.com](mailto:ecarissimi@gmail.com)

## HIGHLIGHTS

- Both coagulants reduced the load of the prokaryotic organisms, including ARB.
- Storage of tannin-treated samples led to reactivation of ARB&ARG content.
- For both coagulants, the load of *int11* decreased independent of storage.
- Rearrangements in the wastewater bacterial community were induced by storage.
- Storage favoured *γ-Proteobacteria*, including *Betaproteobacteriales*, overgrowth.

## GRAPHICAL ABSTRACT



## ABSTRACT

Artigo submetido para a revista *Water Research*

The presence of antibiotic resistant-bacteria (ARB) and antibiotic resistance genes (ARG) in treated effluents of urban WasteWater Treatment Plants (WWTP) may represent a threat to the environment and public health. The continuous emission of ARB&ARG is thought to contribute for antibiotic resistance dissemination in the environment. Thus, the development of cost-effective technologies contributing to minimize loads of these contaminants in the final effluents of WWTP is important.

This study aimed at assessing the capacity of coagulation to reduce the ARB&ARG load in treated urban wastewater, as well as the impact of the process on the structure and diversity of the bacterial community. Coagulation performance was compared for aluminium sulphate, a synthetic substance and tannins, a biowaste. Samples were analysed immediately before and after the coagulation treatment, as well as after 3-days storage in the dark at room temperature, to assess possible reactivation events.

Both coagulants reduced the load of the prokaryotic organisms (16S rRNA gene copy number per ml of sample and total heterotrophic counts), including the analysed ARB (faecal coliforms resistant to amoxicillin or ciprofloxacin) up to 1-2 log immediately after the treatment. However, only aluminium sulphate was able to decrease the content of the analysed ARGs (*bla*<sub>TEM</sub> and *qnrS*). Yet, storage of the wastewater treated with this coagulant promoted the reactivation of *bla*<sub>TEM</sub> to values similar to those found before coagulation treatment. Storage of the wastewater treated with tannin led to the increase of the load of *qnrS* to levels higher than those found before treatment. In contrast, the load of *int11* was lower than that found in STWW, in all the treated waters independent of storage.

After storage, the bacterial communities differed from those observed in the pre-coagulation wastewater, characterized by an increment in *Gammaproteobacteria*. However, different genera were favoured by each coagulant. *Curvibacter*, *Undibacterium* and *Aquaspirillum* abundance increased in the aluminium treated stored wastewater. In contrast the abundance of *Aeromonas*, *Pseudomonas* and *Stenotrophomonas*, previously described as potential vectors of ARG dissemination, were the most abundant genera in the tannin treated stored wastewater. In summary, the overall performance of aluminium sulphate was better than that of tannins in the treatment of treated urban wastewater.

**Keywords:** Coagulation; ARB; ARG; bacterial communities; bacterial regrowth.

## 1. Introduction

The excessive and indiscriminate use of antibiotics in human and veterinary medicine, as well as in animal prophylaxis, metaphylaxis and growth promotion, has been pointed out to be directly related to the increase in bacterial antibiotic resistance (WHO, 2015; WHO 2017). The antibiotic resistance in pathogenic bacteria is associated with high rates of morbidity and mortality and is considered a global public health issue (Frieri et al., 2017). Wastewater Treatment Plants (WWTP) may have a major role in the dissemination of bacterial resistance and, consequently, impact on human and environmental health, as their effluents may act as sources of antibiotic resistant-bacteria (ARB) and antibiotic resistance genes (ARG) (Manaia et al, 2018). This fact may be related to the selective pressure created by the presence of pollutants in the wastewater, such as antibiotics, disinfectants and metals, which even at low concentrations may favour the acquisition and horizontal gene transference of ARGs (Karkman et al., 2017; Kumar et al., 2018).

WWTP use physical and biological processes to reduce the amount of coarse materials, suspended solids, organic matter, and inorganic nutrients, such as phosphorus, ammonia and nitrate (Mustapha et al., 2017). Although being able to reduce the total load of microorganisms of the sewage, the effluents of WWTP operating with a secondary treatment based on Conventional Activated Sludge (CAS) still contain a high number of bacterial cells, including ARB (Manaia et al., 2009; Novo and Manaia, 2010). Indeed, the final treated effluents of CAS processes may contain up to  $10^7$  CFU and  $10^{10}$  gene copies per 100 mL of ARB and ARGs, respectively (Manaia et al., 2016). In order to reduce the microbial loads of the treated effluents, some WWTPs rely on processes such as chlorination, ultraviolet radiation, ozonation, and membrane filtering (Lamba and Ahammad, 2017). However, the high energy and reagent costs involved are a significant limiting factor in their use (Rahman et al., 2016). Moreover, despite being effective on the removal of the microbial load, some of these disinfection processes did not prevent regrowth of ARB&ARG with the establishment of disturbed bacterial communities in stored treated wastewater (Becerra-Castro et al., 2016; Jia et al., 2015; Moreira et al., 2018). These findings point out the importance of investigating treatment technologies that, along with the improvement of physical, chemical and biological parameters, will assist in reducing the quantity of ARB&ARG in the final treated wastewater and promote a lower imbalance in the bacterial community.

The use of coagulation is a routine practice in both drinking and wastewater treatment plants (Sillanpää et al., 2018). Coagulation is a physicochemical process that reduces the repulsive potential of the colloidal double electrical layer through the use of a coagulating reagent, which promotes the aggregation of suspended solids and results in the formation of flocs that can be separated by decantation. This aggregation phenomenon includes various mechanisms such as charge neutralization, capture, adsorption and complexation with the coagulant's metallic ions into insoluble aggregates that easily settle (Henderson et al., 2006). Coagulation and flocculation are sensitive to factors such as type and nature of turbidity producing substances, turbidity levels, type and concentration of coagulant, pH, and the hydrodynamic factors that promote the contact among those colloids (Bratby, 2016; Carissimi and Rubio, 2015; Carissimi et al., 2018; Tebbutt, 1998). The commonly used chemical coagulants are aluminium sulphate ( $\text{Al}_2[\text{SO}_4]_3$ ), ferric chloride ( $\text{FeCl}_3$ ), ferric sulphate ( $\text{Fe}_2[\text{SO}_4]_3$ ), and polyaluminium chloride – PAC (Rana and Suresh, 2017). Green polymeric coagulants are alternative reagents, which act in a similar manner, causing the aggregation of the particles and enabling the solid-liquid separation of the suspended particles. Many organic substances are being studied and validated as potential coagulants/flocculants for the treatment of water, namely chitosan (extracted from crustacean exoskeletons), moringa (extracted from *Moringa oleifera* seeds), and tannins (extracted from bark and wood of trees like *Acacia*, *Castanea*, or *Schinopsis*), among others (Oladoja, 2015; Yin, 2010). Among the many possibilities, Brazil has available for commercial-scale water treatment the tannin extracted from the bark of the *Acacia mearnsii* tree. This is an organic-cationic polymer of low molecular weight of essentially vegetable origin, which promotes the aggregation of the particles and is used for water and wastewater treatment (Graham et al., 2008; Hameed et al., 2018; Justina et al., 2018).

The main goal of this work was to assess the potential of coagulation to remove ARB&ARG from the final effluents of a CAS process without disturbance of the bacterial community of the final treated stored water. Due to the availability of tannin from the bark of the *Acacia mearnsii* tree, the effectiveness of this green coagulant was compared to that of aluminium sulphate, a commonly used coagulant.

## 2. Material and methods

### 2.1. Sampling and experimental design

Wastewater samples were collected from an urban WWTP, located in Northern Portugal, after the secondary sedimentation of the CAS process. To assess the effect of coagulation on the chemical and biological composition of the treated wastewater, the collected samples were divided into four aliquots, out of which two were subjected to coagulation treatments with aluminium sulphate and tannin, respectively (herein named as Alu and Tan, respectively). The third aliquot was used as a control of the coagulation process (herein named as Control), which was subjected to the physical processes of agitation and decanting but without the addition of any coagulant. The fourth aliquot, corresponding to the freshly collected sample (herein named as STWW), was immediately analysed.

Because treatment may cause dramatic bacterial community rearrangements in the final effluents of urban WWTP, the changes in the chemical and biological composition of the wastewater induced by storage of the treated wastewater were also assessed. For that, the collected samples were divided into five aliquots. An aliquot of the collected wastewater was immediately stored for three days, under darkness at room temperature conditions (herein named as RSTWW) to evaluate the effect of storage *per se*. The two other aliquots of the collected sample were subjected to the coagulation treatments and further stored for 3 days (herein named as RAlu and RTan, respectively). The fourth and fifth aliquots corresponded to the STWW and Control, as previously described.

Three experimental replicates were assayed with independent water samples collected over the first semester of 2017. The samples were collected on the 10<sup>th</sup>, 24<sup>th</sup> January and 14<sup>th</sup> February and were used to assess the capacity of the coagulation treatments on the removal of the microbial load, including ARB&ARG, as well as on the composition and structure of the bacterial community immediately after the treatment (herein noted by 1-3). Those collected on the 14<sup>th</sup> March, 21<sup>st</sup> and 28<sup>th</sup> April were used to assess the effect of storage of the treated water on the same parameters (herein noted by 4-6).



## 2.2. Coagulation assays

Coagulation assays were carried out in a Jar test (JLT76; VELP Scientifica, Italy) apparatus with six stirred beakers of 1 L capacity, with controlled mixing speed. The beakers were filled with 0.5 L of wastewater. The coagulation procedure was based on previous reports (Beltrán-Heredia and Sánchez-Martín, 2009). Briefly, the assays were carried out at room temperature; the samples were immediately stirred at 100 rpm for 2 min, to homogenise the coagulant, and then at 40 rpm for 30 min, before settling for 1 h (Alu, Tan, RAlu, RTan). Simultaneously, the control of the coagulation step was performed, which was subjected to the same Jar test conditions, but without the addition of any coagulant (Control).

The amount of coagulant used per sample replica varied according to the colloids present in each freshly collected wastewater sample. Thus, the amount of aluminium sulphate ( $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3(14-18)\text{H}_2\text{O}$ , P.A.-A.C.S. Synth) or tannin (Tanfloc SG – Tanac, Brazil) used ranged between 220-350 mg/L or 50-80 mg/L, respectively.

All the wastewater samples were characterized for turbidity, colour, pH, conductivity and total organic carbon (TOC) (APHA, 2005). TOC was monitored using a Shimadzu TOC-5000A instrument (Shimadzu Scientific Instruments, Japan).

## 2.3. Enumeration of cultivable microorganisms

The total heterotrophs, faecal coliforms and amoxicillin or ciprofloxacin resistant-faecal coliforms were enumerated based on the membrane filtration method, as previously described (Moreira et al., 2016). Adequate volumes of samples or dilutions thereof were filtered through cellulose nitrate membranes (0.22  $\mu\text{m}$  porosity; Sartorius Stedim Biotech, Germany) and incubated on Plate Count Agar (PCA, Liofilchem) at 30 °C, 24 h for total heterotrophs and on Faecal Coliforms agar (m-FC, Difco), at 37 °C, 24 h for faecal coliforms. The prevalence of faecal coliforms ARB was assessed in m-FC supplemented with amoxicillin (AMX) (Fluka, 32 mg/L) or ciprofloxacin (CIP) (Applichem, 4 mg/L).

Faecal coliforms and their amoxicillin or ciprofloxacin resistant counterparts were assessed because this group of Enterobacteria i) is used worldwide as indicators of faecal contamination (APHA, 2005; ISO9308-1, 2000); ii) harbour high resistance prevalence for antibiotics, namely amoxicillin and ciprofloxacin (Ferreira da Silva, et al., 2007; Moreira et al., 2016; Vaz-Moreira et al., 2014); iii) harbour high genomic plasticity (Brunner and Karch,

2000; Vaz-Moreira et al., 2014), iv) are ubiquitous in particular, in human impacted environments. For these reasons, faecal coliforms are considered important tracers to assess the antibiotic resistance status of environmental samples (Vaz-Moreira et al., 2014).

## 2.4 DNA extraction

Volumes ranging from 100 to 700 mL of each sample were filtered through polycarbonate membranes (0.22 µm porosity; Whatman, UK). DNA was extracted using the commercial kit Power Soil® DNA Isolation (MO BIO Laboratories, Inc., USA). DNA extract's concentration was measured using the Qubit 3.0 Fluorometer (ThermoFisher Scientific, USA). A total of 21 DNA extracts, corresponding to 3 independent sampling dates and 7 conditions, were stored at -20 °C until further use.

## 2.5 Quantification of antibiotic resistance genes

Quantitative polymerase chain reaction (qPCR, StepOne™ Real-Time PCR System, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) was used to measure the abundance (per mL of sample) of the ARGs *bla<sub>TEM</sub>* and *qnrS* (encoding to resistance beta-lactams and quinolones, respectively) and class 1 integron - integrase (*intI1*). The selection of these genes was based on their prevalence in wastewater samples (Moreira, et al., 2016; Sousa, et al., 2016). The 16S rRNA gene was also quantified in order to evaluate the total bacterial abundance. The list of primers and protocols used, based on SYBR Green detection, have been described before (Narciso-da-Rocha et al. 2018) (Table S1).

## 2.6 Bacterial community analysis

The same DNA extracts were used for the bacterial community analysis, except for Tan1 sample due to DNA scarcity (< 200 ng DNA). Briefly, each replicate DNA extract was submitted to pair-end sequence analyses with MiSeq® V3 chemistry, according to manufacturer's instructions (Illumina, San Diego, CA, USA) at GenoInseq (Cantanhede, Portugal). For each replica, DNA was amplified for the hypervariable V3-V4 region with specific primers (Bakt\_341F 5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3' and Bakt\_805R 5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3') (Herlemann et al., 2011; Klindworth et al., 2013) and further re-amplified in a limited-cycle PCR reaction to add sequencing adapters and dual indexes, according to manufacturer's instructions. Following quantification with fluorimetry

with PicoGreen dsDNA quantitation kit (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, California, USA), the obtained amplicons were pooled at equimolar concentrations and sequenced.

Demultiplexed paired end reads were analysed using QIIME2 (Version 2-2018.4; <https://qiime2.org/>). The forward and reverse reads were truncated at their 3' end, at their 254 and 195 sequencing positions, respectively. Sequences were grouped into features based on 100% sequence similarity, further referred to as ASV (amplicon sequence variants), using DADA2. MAFFT was used to perform multiple *de novo* sequence alignments of the representative sequences. FastTree was used to generate unrooted and rooted trees further used in the phylogenetic diversity analysis. For taxonomic assignment, a Naïve-Bayes classifier was trained on the SILVA database release 132 (Quast et al., 2013) (99% Operational Taxonomic Units). It is important to note that this database has recently been updated and important, yet not consensual, taxonomic re-classifications were performed. These re-classifications included the transference of i) the class *Betaproteobacteria* to a new order of the class *Gammaproteobacteria* (*Betaproteobacteriales*) (Parks et al., 2018); ii) the class *Epsilonproteobacteria* to the new phylum *Epsilonbacteraeota* (Parks et al., 2018; Waite et al., 2017). These re-classifications were based on the Genome Taxonomy Database (<http://gtdb.ecogenomic.org/>) (Parks et al., 2018), where a genome based phylogeny is inferred, aiming to overcome the occurrence of polyphyletic groups (e.g., *Proteobacteria*) and standardize ranks based on relative evolutionary divergence.

After applying the trained classifier to the representative sequences to assign taxonomy, chloroplast, mitochondria as well as unclassified at the kingdom level (not Bacteria or Archaea) derived sequences were removed from the dataset. In total, 1 137 594 Illumina sequence reads were obtained (ranging from 31488 to 103532 in the different samples), of which 943 168 reads remained after quality filtering. The replica RTan5 was excluded from the analysis, as only ~2000 sequences were retained after quality filtering. The feature table was rarefied to an even sequencing depth of 32933 sequencing reads, representing 66.38% of the total sequences post quality control. Overall, 2734 amplicon sequence variants (ASVs) were identified.

Alpha diversity metrics including Shannon index ( $H$ ), phylogenetic diversity (PD) whole tree, number of ASVs and evenness index ( $E'$ ) were calculated after normalization according to smallest library (32933 sequences) (Faith, 1992; Pielou, 1966; Shannon and Weaver, 1963). Beta diversity was assessed using the weighted UniFrac metric (Lozupone

and Knight, 2005) and the dissimilarities among samples were depicted by the Principal Coordinate Analysis (PCoA) biplot.

## 2.7 Data Analysis

Physicochemical parameters, microbial counts and qPCR data were compared using two-sample statistical test (*t*-test). All these analyses were performed using the BioEstat software (version 5.0).

The permutation multivariate analysis of variance (PERMANOVA) based on weighted-unifrac similarities was performed within QIIME2, to evaluate if the bacterial communities were grouped by sample, and if there were statistically different groups within the analysed bacterial communities. Moreover, the differences on the relative abundance of a given bacterial group from each sample (Alu, Tan, RSTWW, RAlu and RTan) in comparison to the untreated control (STWW) was achieved using a pairwise *t*-test with the Storey FDR correction for multiple comparisons as implemented in the STAMP software v.2.1.3 (Parks et al., 2014).

## 2.8 Data Availability

Demultiplexed sequences and metadata from all the analysed samples are available from the Sequence Read Archives (SRA) under accession number PRJPRJNA509231 (SAMN10574495; SAMN10574496; SAMN10574497; SAMN10574498; SAMN10574499; SAMN10574500; SAMN10574501; SAMN10574502; SAMN10574503; SAMN10574504; SAMN10574505; SAMN10574506; SAMN10574507; SAMN10574508; SAMN10574509; SAMN10574510; SAMN10574511; SAMN10574512 and SAMN10574513).

## 3. Results and discussion

### 3.1 Turbidity and organic carbon removal

Both coagulation processes permitted to decrease the turbidity and colour of the initial samples (STWW) (Table 1). The aluminium sulphate was able to remove over 94% of the turbidity registered for the STWW samples, even after storage of the treated water (Alu and

RAlu). Aluminium sulphate allowed also an average colour reduction of 88.1% immediately after coagulation (Alu) and 75.3% after storage of the treated water (RAlu). The values of turbidity and colour of the samples treated with tannin were slightly higher and less homogeneous than those treated with aluminium sulphate. Indeed, tannin removed about 89.0% of the turbidity and 73.6% of the colour registered for the STWW immediately after coagulation (Tan) and 78.7% of the turbidity and 56.2% of the colour after storage (RTan).

Considering that the coagulation process contributes to the reduction of natural organic matter (Henderson et al., 2006), this study also assessed the capacity of the tested coagulants to reduce the TOC content of the analysed samples. Aluminium sulphate and tannin were, respectively, able to remove up to 50.0% and 35.0% of the TOC registered in the initial samples (STWW) immediately after coagulation (Alu and Tan) and after treated water storage (RAlu and RTan). Noteworthy, TOC reduction up to 29.0% was registered for the stored untreated control wastewater samples (RSTWW).

In contrast, none of the coagulants led to observable alterations in the conductivity in the treated wastewater, which varied between 710 and 812  $\mu\text{s}/\text{cm}$ . pH varied between 6.60 and 7.43, differing statistically only in the Alu and RAlu samples, as compared to STWW. This was an expected result, because aluminium sulphate is a strong conjugate acid, and reduces the pH of the medium.

When considering the turbidity, colour and total organic carbon of the final treated water samples, we can conclude that aluminium sulphate was on average more efficient than tannin. However, higher doses of aluminium sulphate (about 4 times higher, on average) were used than tannin.

### 3.2. Cultivable bacterial removal and reactivation

To assess if the coagulation process by aluminium sulphate and tannin could promote the aggregation of microbial cells and their further removal through sedimentation of the resulting sludge-cultivable bacterial load from the STWW was assessed through the enumeration of the total heterotrophic bacteria as well as the faecal coliforms and their amoxicillin or ciprofloxacin resistant counterparts (Fig 1a). The performance of both coagulants on the bacterial removal was similar, being able to remove approximately 2-log units of each of the analysed bacterial groups from the initial STWW (Fig 1a). Similar

removal values (1 to 2-log units) were observed in other coagulation studies carried out with surface water (Ali et al., 2008; Ho et al., 2012; Sánchez-Martín et al., 2010).

Despite the capacity of both coagulants to reduce loads of the analysed cultivable groups immediately after the treatment, further assays were carried out to assess the regrowth capacity after the application of the coagulation process. Indeed, bacterial reactivation during storage of treated water has been widely reported regardless of the type of water and the treatment process (Fiorentino et al., 2018; Giannakis et al., 2016; Giannakis et al., 2018; Malvestiti and Dantas, 2018; Moreira et al., 2016., Moreira et al., 2018; Sousa et al., 2016) being influenced by parameters such as temperature and availability of carbon and energy sources (Giannakis et al., 2014; Ubomba-Jaswa et al., 2009; Zhao et al., 2014).

Storage of the initial STWW for 3 days at room temperature (RSTWW) did not change the load of the analysed cultivable bacterial groups, except for amoxicillin resistant-faecal coliforms, which in average was 0.7 log lower than in STWW. In contrast, during storage of samples treated with aluminium sulphate (RAlu) was observed a decrease on the microbial load, particularly on ciprofloxacin resistant-faecal coliforms (Fig 1b), with log reductions up to 4.5. Inversely, during storage of samples treated with tannin (RTan) was observed the regrowth of all the analysed cultivable bacterial groups, particularly of the total heterotrophic bacteria, which concentration was significantly higher ( $p < 0.01$ ) in RTan than in STWW (Fig 1b). The ability of bacteria to utilise the organic compounds of this natural coagulant may explain the regrowth of the cultivable populations during storage of the tannin treated samples (RTan).

### 3.3. Effect of coagulation on ARGs and bacterial community composition

Given the limitation of the culture-based methods to recover the wide diversity of bacteria inhabiting the STWW, as well as the difficulties on the recovery of stressed cells after the treatments, the analyses of total DNA based on quantitative PCR was used to assess the efficacy of the tested coagulants on the removal of the bacterial population from the STWW. As observed for the cultivable populations, both coagulants were able to reduce the load of the prokaryotic organisms immediately after the treatment, as assessed by the number of copies of the 16S rRNA gene per millilitre of sample, which was approximately 1 log unit lower in the treated water (Alu and Tan) than in the initial STWW (Fig 2a). Similar results were observed for the gene *intl1*, a proxy for anthropogenic pollution (Gillings et al., 2015).

Indeed, *intl1* has been linked to multidrug-resistance and horizontal gene transference in a wide diversity of bacteria (Gillings et al., 2015). However, when analysing the ARG *bla<sub>TEM</sub>* and *qnrS*, respectively encoding for beta-lactams and plasmid-mediated quinolone resistance, only coagulation with aluminium sulphate promoted a significant removal of these ARGs (approximately 1 log reduction) from the initial STWW (Alu, Fig 2a).

During storage of samples treated with aluminium sulphate was observed a decrease on the load of all analysed genes (ranging from 0.5-1.4 log reduction), except of *bla<sub>TEM</sub>*, which copy number was not significantly different from that found in STWW. In contrast, during storage of samples treated with tannin reactivation of *qnrS* to levels ~0.7 log higher than those found in STWW (Fig 2b) was observed. In contrast to our findings, a coagulation process carried out with Fe-based coagulants led to 0.5-log to 3.1-log reductions of different classes of ARGs (Li et al., 2017), suggesting a better performance of this type of coagulants than those herein studied. Nevertheless, the effect of storage on the Fe-based coagulants treated water was not assessed (Li et al., 2017).

Water treatment processes, such as those based on advanced oxidation processes, have been described as promoting disturbance of the bacterial communities, which in part are due to differential regrowth capacity of distinct bacterial groups (Becerra-Castro et al., 2016, Moreira et al., 2018). In this context, the effect of the analysed coagulants on the bacterial communities of the treated water was also assessed in this study. As expected, the bacterial community of the initial STWW was diverse, comprising members of 32 phyla, being *Proteobacteria* (33-47 %) and *Bacteroidetes* (26-31 %) the most abundant, in accordance with previous reports (Becerra-Castro et al., 2016). Also bacteria affiliated to *Epsilonbacteraeota* (17-14 %) and *Firmicutes* (3-4 %), were among the most abundant phyla found in STWW (Fig 3a and 4a).

According to the PCoA biplot (Fig 5), rearrangements in the bacterial communities, in particular for RAlu, RTan, RSTWW in comparison to the initial STWW samples (replica 4, 5 and 6, Fig 5) were observed. These differences were also suggested by the PERMANOVA analysis (PERMANOVA pseudo-F = 3.86, P = 0.001). In fact, in all the stored wastewater samples the abundance of members affiliated to *Epsilonbacteraeota* decreased ( $p < 0.05$ ) in comparison to the initial STWW (Fig 4a). Yet, distinct rearrangements were observed regarding the abundance of other groups, particularly *Bacteroidetes* and *Proteobacteria*. In RAlu and RSTWW the abundance of *Bacteroidetes*, respectively decreased and increased ( $p < 0.05$ ) in comparison to STWW. Although not significant due to high variation between

replicas, in RAlu and particularly in RTan samples not only *Alpha*- but mainly *Gammaproteobacteria*, including those of the order *Betaproteobacteriales*, increased, in comparison to STWW (Fig. S1).

Whereas in RSTWW only the members affiliated to class *Alphaproteobacteria* increased ( $p < 0.05$ ) in comparison to STWW. The absence of a common trend in the rearrangements occurring in the bacterial community following the storage of the analysed samples was also observed in their alpha diversity values (Table 2). Where the only clear difference was observed in the phylogenetic diversity (PD) values (Table 2), being the lowest value observed for RTan samples. In fact, this loss of phylogenetic diversity agrees with the increase in the abundance of members affiliated to *Proteobacteria*, which members represented more than 70 % in RTan samples (Fig 4). Moreover, in these samples more than 53 % of the total relative abundance of bacteria was given by the abundance of organisms affiliated to ten different genera of *Gammaproteobacteria* (Fig. 4b). Among those, with higher abundance ( $p < 0.05$ ) than in STWW were affiliated to *Aeromonas* spp. (16 %), *Pseudomonas* spp. (6 %) and *Stenotrophomonas* spp. (2 %). All these genera include species with the potential to acquire resistance genes (Vaz-Moreira et al., 2014). Moreover, the increase in the abundance of *Aeromonas* spp. in the RTan samples might be related with the increase of the *qnrS* load registered following storage (Fig 2b), as this gene has been detected in both surface and wastewater aeromonads isolates (Varela et al., 2016). In addition, these aeromonads might have contributed to the increase in all cultivable groups observed in RTAn samples, as aeromonads isolates have been recovered from different culture media, in particular, in those used in this study (PCA, and mFC agar) (Figueira et al., 2011).

In contrast, in RAlu samples the most abundant genera in comparison with the STWW ( $p < 0.05$ ) were *Curvibacter* (11 %), *Undibacterium* (6 %) and *Aquaspirillum* (4%), all belonging to the order *Betaproteobacteriales*. These organisms are ubiquitous in water environments (Vaz-Moreira et al., 2014, Jia et al., 2015, Kampfer et al., 2007). Interestingly, the genus *Curvibacter* includes members thriving in a nuclear fuel storage pond, which are resistant to  $\text{Co}^{2+}$  (Dekker et al., 2014). Also, *Undibacterium* members tolerant to arsenic (As) have been isolated from contaminated ground water samples (Ghosh and Sar, 2013). Thus, the ability of these organisms to resist and live in metal enriched/contaminated water might explain their increment in the stored wastewater previously treated with aluminium sulphate (RAlu).



The results obtained, demonstrate that storage of wastewater following a coagulation treatment with aluminium sulphate or tannin favour the overgrowth of proteobacteria, in particular, *Gammaproteobacteria*, including *Betaproteobacteriales*. Increments in proteobacterial members have also been reported in wastewater under treatments coupling biological and photocatalysis or ozonation treatments (Chen et al., 2013; Esplugas et al., 2013). Moreover, increment in *Beta*- or *Gammaproteobacteria*, in particular, pseudomonads, as well as ARGs have also been reported for wastewater stored following photolysis, ozonation, photocatalytic ozonation (Becerra-Castro et al., 2016, Moreira et al., 2018) or different solar driven advanced oxidation processes (Moreira et al., 2018) as well as for drinking water following chlorination treatment (Jia et al., 2015). These observations suggest that *Gammaproteobacteria*, including *Betaproteobacteriales*, have a higher capacity to regrow or are less effectively inactivated or removed during the treatments than the other bacterial community members. Nevertheless, the present study indicated that the most abundant gammaproteobacterial genera were dependent on the coagulant used. Most important those favoured following treatment with tannin were potentially more critical regarding antibiotic resistance dissemination.

#### 4. Conclusions

- Coagulation with both aluminium sulphate and tannin decreased the turbidity and colour of the secondary treated urban wastewater, although aluminium sulphate showed an overall better removal efficiency.
- Both coagulants reduced the load of prokaryotic organisms, including the analysed ARB immediately after the treatment in 2-log units. However, following storage of the treated wastewater with tannin this reduction was attenuated, with regrowth of these organisms to values similar to those found in the initial STWW.
- Both coagulants reduced the load of *intl1*, even upon storage of the treated wastewater. In contrast, only aluminium sulphate reduced the load genes *bla<sub>TEM</sub>* and *qnrS* immediately after treatment. Yet, storage of the wastewater treated with this coagulant promoted the reactivation of *bla<sub>TEM</sub>* to values similar to those found in the initial STWW. Storage of the wastewater treated with tannin led to the increase of the load of *qnrS* to levels higher than those in the initial STWW.

- The storage of coagulation treated wastewater created the opportunity for rearrangements in the bacterial communities. Irrespectively of the coagulant, stored treated wastewater contained a higher relative abundance of *Gammaproteobacteria*, including *Betaproteobacteriales*, than the initial STWW.
- Within *Gammaproteobacteria*, *Curvibacter*, *Undibacterium* and *Aquaspirillum* (*Betaproteobacteriales*) prevailed in the aluminium treated stored wastewater. Whereas *Aeromonas* (*Aeromonadales*), *Pseudomonas* (*Pseudomonadales*) and *Stenotrophomonas* (*Xanthomonadales*), ubiquitous bacteria previously described as potential vectors of ARG dissemination, were the most abundant genera in the tannin treated stored wastewater when compared to the initial STWW.

#### Acknowledgements

This work was financially supported by: project UID/EQU/00511/2019 - Laboratory for Process Engineering, Environment, Biotechnology and Energy – LEPABE funded by national funds through FCT/MCTES (PIDDAC); project “LEPABE-2-ECO-INNOVATION” – NORTE-01-0145-FEDER-000005, funded by Norte Portugal Regional Operational Programme (NORTE 2020), under PORTUGAL 2020 Partnership Agreement, through the European Regional Development Fund (ERDF), and project Associate Laboratory LSRE-LCM-UID/EQU/50020/2019 - funded by national funds through FCT/MCTES (PIDDAC). Moreover, NFFM acknowledge financial support from FCT grant PD/BD/114318/2016 and we acknowledge support of Erasmus + IBRASIL Programme of the European Union. CMM and TF acknowledge the National Funds from FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia through project WaterJPI/0001/2013 STARE – “Stopping Antibiotic Resistance Evolution” and UID/Multi/50016/2013.

## References

- Ali, G. H., Hegazy, B. E., Hanan, A. F., Rehab, M. E., 2008. Comparative study on natural products used for pollutants removal from water. *Journal of Applied Sciences Research*, 5 (8), 1020-1029.
- APHA., 2005. Standard methods for the examination of water and wastewater American Public Health Association, Washington, DC, USA.
- Becerra-Castro, C., Macedo, G., Silva, A. M. T., Manaia, C. M., Nunes, O. C., 2016. Proteobacteria become predominant during regrowth after water disinfection. *Science of The Total Environment*, 573, 313-323.
- Beltrán-Heredia, J., Sánchez-Martín, J., 2009. Municipal wastewater treatment by modified tannin flocculant agent. *Desalination*, 249, 353-358.
- Bratby, J., 2016. Coagulation and flocculation in water and wastewater treatment. Third edition, 538p.
- Brunder, W., Karch, H., 2000. Genome plasticity in *Enterobacteriaceae*. *International Journal of Medical Microbiology*, 290, 153-165.
- Carissimi, E., Rubio, J., 2015. Polymer-bridging flocculation performance using turbulent pipe flow. *Minerals Engineering*, 70, 20-25.
- Carissimi, E., Sanagiotto, D. S., Schettini, E. B. C., Rubio, J., 2018. Revisiting coiled flocculator performance for particle aggregation. *Water Environment Research*, 90 (4), 322-328.
- Chen, C. Y., Kuo, J. T., Yang, H. A., Chung, Y. C., 2013. A coupled biological and photocatalysis pretreatment system for the removal of crystal violet from wastewater. *Chemosphere*, 92, 695-701.
- Dekker, L., Osborne, T. H., Santini, J. M., 2014. Isolation and identification of cobalt- and caesium-resistant bacteria from a nuclear fuel storage pond. *FEMS Microbiol Letters*, 359, 81-4.
- Esplugas, M., González, O., Sans, C., 2013. Bacterial community characterization of a sequencing batch reactor treating pre-ozonized sulfamethoxazole in water. *Environmental Technology*, 34, 1583-1591.
- Faith, D. P., 1992. Conservation evaluation and phylogenetic diversity. *Biol Conservation*, 61, 1-10.
- Ferreira Da Silva, M., Vaz-Moreira, I., Gonzalez-Pajuelo, M., Nunes, O. C., Manaia, C. M., 2007. Antimicrobial resistance patterns in *Enterobacteriaceae* isolated from a urban wastewater treatment plant. *FEMS Microbiology Ecology*, 60, 166-176.

- Figueira, V., Vaz-Moreira, I., Silva, M., Manaia, C. M., 2011. Diversity and antibiotic resistance of *Aeromonas spp.* in drinking and waste water treatment plants. *Water Research*, 45, 5599-611.
- Fiorentino, A., Ferro, G., Alferez, M. C., Polo-Lopez, M. I., Fernandez-Ibanez, P., Rizzo, L., 2015. Inactivation and regrowth of multidrug resistant bacteria in urban wastewater after disinfection by solar-driven and chlorination processes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, 148, 43-50.
- Frieri, M., Kumar, K., Boutin, A., 2017. Antibiotic resistance. *Journal of Infection and Public Health*, 10, 369-378.
- Ghosh, S., Sar, P., 2013. Identification and characterization of metabolic properties of bacterial populations recovered from arsenic contaminated ground water of North East India (Assam). *Water Research*, 47, 6992-7005.
- Giannakis, S., Merino Gamo, A. I., Darakas, E., Escalas-Cañellas, A., Pulgarin, C. 2014. Monitoring the post-irradiation *E. coli* survival patterns in environmental water matrices: Implications in handling solar disinfected wastewater. *Chemical Engineering Journal*, 253, 366-376.
- Giannakis, S., Voumard, M., Grandjean, D., Magnet, A., De Alencastro, L. F., Pulgarin, C., 2016. Micropollutant degradation, bacterial inactivation and regrowth risk in wastewater effluents: Influence of the secondary (pre)treatment on the efficiency of advanced oxidation processes. *Water Research*, 102, 505-515.
- Giannakis S., Watts, S., Rtimi, S., Pulgari, C., 2018. Solar light and the photo-Fenton process against antibiotic resistant bacteria in wastewater: A kinetic study with a Streptomycin-resistant strain. *Catalysis Today*, 313, 86-93.
- Gillings, M. R., Gaze, W. H., Pruden, A., Smalla, K., Tiedje, J. M., Zhu, Y. G., 2015. Using the class 1 integron-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution. *ISME Journal*, 9, 1269-79.
- Graham, N., Gang, F., Fowler, G., Watts, M., 2008. Characterisation and coagulation performance of a tannin-based cationic polymer. A preliminary assessment. *Colloid and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 327, 9-16.
- Hameed, Y. T., Idris, A., Hussain, S. A., Abdullah, N., Man, H. C., Suja, F., 2018. A tannin-based agent for coagulation and flocculation of municipal wastewater as a pretreatment for biofilm process. *Journal of Cleaner Production*, 182, 198-205.
- Henderson, R., Sharp, E., Jarvis, P., Parsons, S., Jefferson, B., 2006. Identifying the linkage between particle characteristics and understanding coagulation performance. *Water Science and Technology Water Supply*, 6 (1), 31-38.
- Herlemann, D. P., Labrenz, M., Jurgens, K., Bertilsson, S., Waniek, J. J., Andersson, A. F., 2011. Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. *ISME Journal*, 5, 1571-9.

- Ho, L., Braun, K., Fabris, R., Hoefel, D., Morran, J., Monis, P., Drikas, M., 2012. Comparison of drinking water treatment process streams for optimal bacteriological water quality. *Water Research*, 46, 3934-3942.
- ISO 9308-1, 2000. Water quality. Detection and enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria. Part 1: Membrane filtration method. International Organization for Standardization.
- Jia, S., Shi, P., Hu, Q., Li, B., Zhang, T., Zhang, X. X., 2015. Bacterial community shift drives antibiotic resistance promotion during drinking water chlorination. *Environmental Science and Technology*, 49, 12271-9.
- Justina, M. D., Muniz, B. R. B., Broring, M. M., Costa, V. J., Skoronski, E., 2018. Using vegetable tannin and polyaluminium chloride as coagulants for dairy wastewater treatment: A comparative study *Journal of Water Process Engineering*, 25, 173-181.
- Kampfer, P., Rossello-Mora, R., Hermansson, M., Persson, F., Huber, B., Falsen, E., Busse, H. J., 2007. *Undibacterium pigrum* gen. nov., sp. nov., isolated from drinking water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 1510-5.
- Karkman, K., Do, T. T., Walsh, F., Virta, M. P. J., 2017. Antibiotic-resistance genes in wastewater. *Trends in Microbiology*, 9.
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., Glockner, F. O., 2013. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, 41, e1.
- Kumar, A., Pal, D., 2018. Antibiotic resistance and wastewater; correlation, impact and critical human health challenges. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 6, 52-58.
- Lamba, M., Ahammad, S. Z., 2017. Performance comparison of secondary and tertiary treatment systems for treating antibiotic resistance. *Water Research*, 127, 172-182.
- Li, N., Sheng, G., Lu, Y., Zeng, R. J., Yu, H., 2017. Removal of antibiotic resistance genes from wastewater treatment plant effluent by coagulation. *Water Research*, 111, 204-212.
- Lozupone, C., Knight, R., 2005. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 8228-8235.
- Malvestiti, J. A., Dantas, R. F., 2018. Disinfection of secondary effluents by O<sub>3</sub>, O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Influence of carbonate, nitrate, industrial contaminants and regrowth. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 6 (1), 560-567.
- Manaia, C. M., Macedo, G., Fatta-Kassinos, D., Nunes, O. C., 2016. Antibiotic resistance in urban aquatic environments: can it be controlled? *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100, 1543-57
- Manaia, C. M., Novo, A., Coelho, B., Nunes, O. C., 2009. Ciprofloxacin resistance in domestic wastewater treatment plants. *Water, Air, and Soil Pollution*, 208, 335-343.

- Manaia, C. M., Rocha, J., Scaccia, N., Marano, R., Radu, E., Biancullo, F., Cerqueira, F., Fortunato, G., Iakovides, I. C., Zammit, I., Kampouris, I., Vaz-Moreira, I., Nunes, O. C., 2018. Antibiotic resistance in wastewater treatment plants: tackling the black box. *Environment International*, 115, 312-324.
- Moreira, N. F., Sousa, J. M., Macedo, G., Ribeiro, A. R., Barreiros, L., Pedrosa, M., Faria, J. L., Pereira, M. F., Castro-Silva, S., Segundo, M. A., Manaia, C. M., Nunes, O. C., Silva, A. M., 2016. Photocatalytic ozonation of urban wastewater and surface water using immobilized TiO<sub>2</sub> with LEDs: Micropollutants, antibiotic resistance genes and estrogenic activity. *Water Research*, 94, 10-22.
- Moreira, N. F. F., Narciso-Da-Rocha, C., Polo-Lopez, M. I., Pastrana-Martinez, L. M., Faria, J. L., Manaia, C. M., Fernandez-Ibanez, P., Nunes, O. C., Silva, A. M. T., 2018. Solar treatment (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub>-P25 and GO-TiO<sub>2</sub> photocatalysis, photo-Fenton) of organic micropollutants, human pathogen indicators, antibiotic resistant bacteria and related genes in urban wastewater. *Water Research*, 135, 195-206.
- Mustapha, M. A., Manan, Z. A., Alwi, S. R. W., 2017. A new quantitative overall environmental performance indicator for a wastewater treatment plant. *Journal of Cleaner Production*, 167, 815- 823.
- Narciso-Da-Rocha, C., Vaz-Moreira, I., Manaia, C. M., 2014. Genotypic diversity and antibiotic resistance in *Sphingomonadaceae* isolated from hospital tap water. *Science of The Total Environment*, 466-467, 127-35.
- Novo, A., Manaia, C. M., 2010. Factors influencing antibiotic resistance burden in municipal wastewater treatment plants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87, 1157-66.
- Oladoja, N. A., 2015. Headway on natural polymeric coagulants in water and wastewater treatment operations. *Journal of Water Process Engineering*, 6, 174-192.
- Parks, D. H., Chuvochina, M., Waite, D. W., Rinke, C., Skarshewski, A., Chaumeil, P.-A., Hugenholtz, P., 2018. A proposal for a standardized bacterial taxonomy based on genome phylogeny. DOI: 10.1101/256800
- Parks, D. H., Tyson, G. W., Hugenholtz, P., Beiko, R. G., 2014. STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics*, 30, 3123-4.
- Pielou, E. C., 1966. The measurement of diversity in different types of biological collections. *Journal of Theoretical Biology*, 13, 131-144.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glockner, F. O., 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 41, D590-6.
- Rahman, S. M., Eckelman, M. J., Onnis-Hayden, A. Z., 2016. Life-cycle assessment of advanced nutrient removal technologies for wastewater treatment. *Environmental Science and Technology*, 50 (6), 3020-3030.
- Rana, S., Suresh, S., 2017. Comparison of different coagulants for reduction of COD from textile industry wastewater. *Material today Proceedings*, 4, 567-574.

- Sánchez-Martín, J., González-Velasco, M., Beltrán-Heredia, J., 2009. *Acacia mearnsii* de Wild tannin-based flocculant in surface water treatment. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 29, 119-135.
- Shannon, C. E., Weaver, W., 1963. *The mathematical theory of communication*, Urbana, University of Illinois Press.
- Sillanpää, M., Ncibi, M. C., Matilainen, A., Vepsäläinen, M., 2018. Removal of natural organic matter in drinking water treatment by coagulation: A comprehensive review. *Chemosphere*, 190, 54-71.
- Sousa, J. M., Macedo, G., Pedrosa, M., Becerra-Castro, C., Castro-Silva, S., Pereira, M. F., Silva, A. M., Nunes, O. C., Manaia, C. M., 2016. Ozonation and UV<sub>254nm</sub> radiation for the removal of microorganisms and antibiotic resistance genes from urban wastewater. *Journal of Hazardous Materials*, 323, 434-441.
- Tebbutt, T. H. Y., 1998. *Principles of water quality control*, fourth ed. Pergamon Press Ltd, Oxford, England, 10-157.
- Ubomba-Jaswa, E., Navntoft, C., Polo-López, M. I., Fernandez-Ibáñez, P., McGuigan, K. G., 2009. Solar disinfection of drinking water (SODIS): An investigation of the effect of UV-A dose on inactivation efficiency. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 8, 587-595.
- Varela, A.R., Nunes, O.C., Manaia, C.M., 2016. Quinolone resistant *Aeromonas* spp. as carriers and potential tracers of acquired antibiotic resistance in hospital and municipal wastewater. *Science of The Total Environment*, 15, 665-71.
- Vaz-Moreira, I., Nunes, O. C., Manaia, C. M., 2014. Bacterial diversity and antibiotic resistance in water habitats: searching the links with the human microbiome. *FEMS Microbiol Reviews*, 38, 761-78.
- Waite, D. W., Vanwonderghem, I., Rinke, C., Parks, D. H., Zhang, Y., Takai, K., Sievert, S. M., Simon, J., Campbell, B. J., Hanson, T. E., Woyke, T., Klotz, M. G., Hugenholtz, P., 2017. Comparative genomic analysis of the class *Epsilonproteobacteria* and proposed reclassification to *Epsilonbacteraeota* (phyl. nov.). *Frontiers in Microbiology*, 8, 682.
- WHO, 2015. *Global Action Plan on Antimicrobial Resistance*.
- WHO, 2017. *Guidelines on use of medically important antimicrobials in food-producing animals*.
- Yin, C., 2010. Emerging usage of plant-based coagulants for water and wastewater treatment. *Process Biochemistry*, 45, 1437-1444.
- Zhao, X., Hu, H. Y., Yu, T., Su, C., Jiang, H., Liu, S., 2014. Effect of different molecular weight organic components on the increase of microbial growth potential of secondary effluent by ozonation. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 26, 2190-7.

**Table 1** Physicochemical properties of the analysed samples. Values are means  $\pm$  standard deviation (n = 3).

Sample	Turbidity (NTU)	Colour (CU)	TOC (mg/L)	pH	Conductivity ( $\mu$ s/cm)
STWW	18.3 $\pm$ 5.7	145.7 $\pm$ 70.4	41.4 $\pm$ 24.8	7.3 $\pm$ 0.2	703.0 $\pm$ 247.9
Control	11.0 $\pm$ 4.2	119.9 $\pm$ 40.6	31.2 $\pm$ 11.9	7.3 $\pm$ 0.3	658.3 $\pm$ 218.4
Alu	1.6 $\pm$ 1.4 **	23.6 $\pm$ 14.3 *	20.5 $\pm$ 17.2	6.6 $\pm$ 0.1 **	727.6 $\pm$ 228.1
Tan	1.8 $\pm$ 0.3 *	36.8 $\pm$ 6.2	26.5 $\pm$ 17.3	7.5 $\pm$ 0.09	693.6 $\pm$ 230.6
<b>Regrowth</b>					
STWW	25.0 $\pm$ 0.9	148.6 $\pm$ 45.2	26.1 $\pm$ 5.4	7.4 $\pm$ 0.09	765.7 $\pm$ 38.8
Control	13.8 $\pm$ 3.2 **	145.5 $\pm$ 37.0	22.9 $\pm$ 5.2	7.3 $\pm$ 0.3	762.1 $\pm$ 34.5
RSTWW	15.7 $\pm$ 3.2 **	96.9 $\pm$ 6.1	18.1 $\pm$ 1.9 *	7.4 $\pm$ 0.1	765.0 $\pm$ 71.8
RAlu	1.0 $\pm$ 0.5 **	35.4 $\pm$ 19.2 **	12.3 $\pm$ 1.0 **	6.6 $\pm$ 0.3 **	812.0 $\pm$ 55.0
RTan	6.0 $\pm$ 2.7 **	58.8 $\pm$ 14.1 *	16.2 $\pm$ 3.3 *	7.4 $\pm$ 0.1	766.0 $\pm$ 61.6

Regrowth was evaluated with the samples collected at the 14<sup>th</sup> March, 21<sup>st</sup> and 28<sup>th</sup> April (STWW, RSTWW, RAlu and RTan);

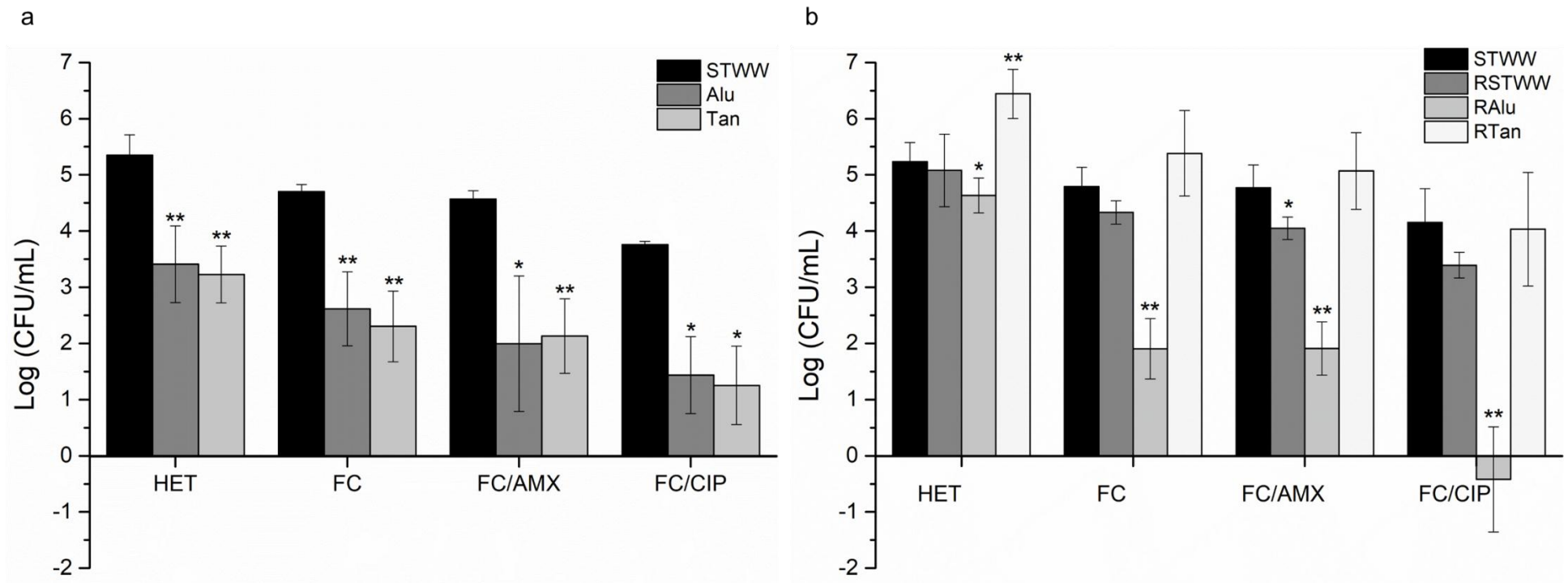
Values are the average of three independent assays. Asterisks indicate a significant difference (\* p<0.05; \*\*p<0.01;) in relation to the STWW samples, assessed by t-test



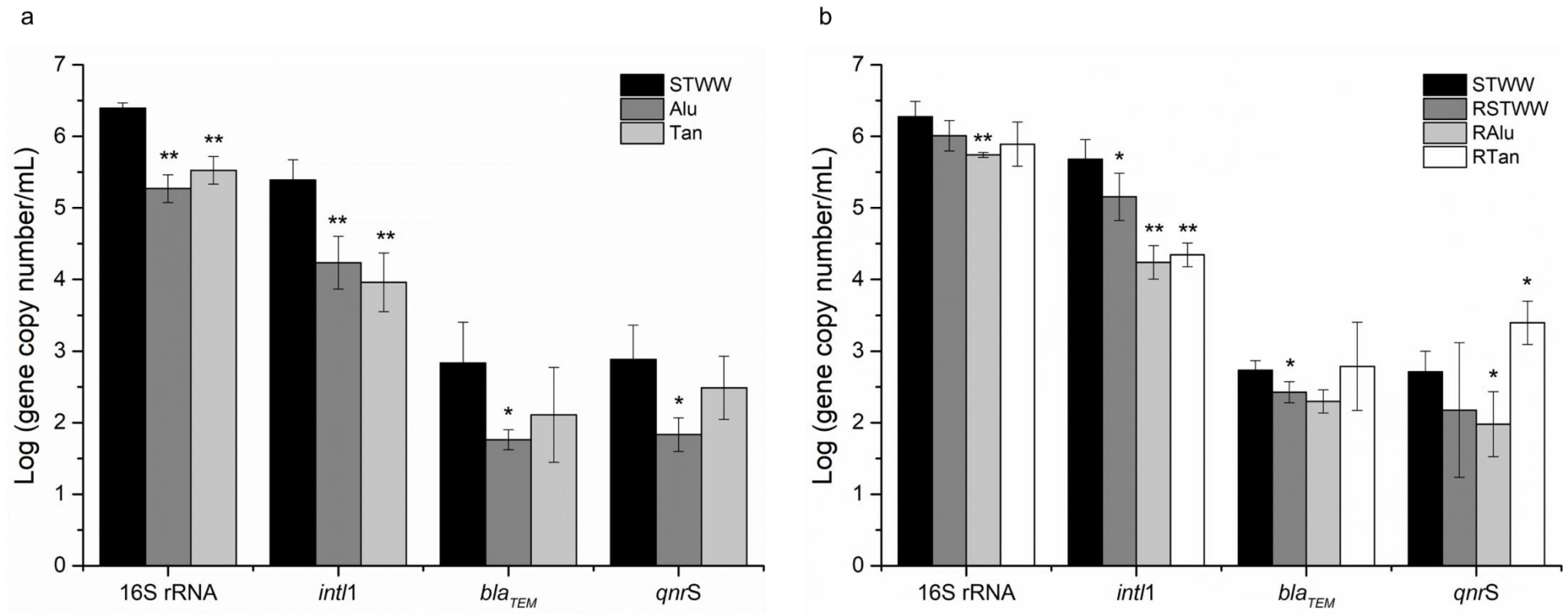
**Table 2** Alpha diversity indices of the analysed samples. Values are means  $\pm$  standard deviation (n = 3 and n=2\*).

Sample	Pielou ( <i>E'</i> )	PD	Observed ASVs	Shannon diversity ( <i>H</i> )
STWW	0.70 $\pm$ 0.02	43.67 $\pm$ 0.39	545 $\pm$ 41	6.40 $\pm$ 0.10
Alu	0.69 $\pm$ 0.04	48.64 $\pm$ 0.91	568 $\pm$ 30	6.28 $\pm$ 0.46
Tan*	0.60	55.46	705	5.66
Regrowth				
STWW	0.70 $\pm$ 0.02	49.22 $\pm$ 5.51	527 $\pm$ 40	6.30 $\pm$ 0.22
RSTWW	0.69 $\pm$ 0.01	37.45 $\pm$ 3.65	376 $\pm$ 2	5.88 $\pm$ 0.13
RAlu	0.73 $\pm$ 0.02	33.57 $\pm$ 3.37	380 $\pm$ 43	6.22 $\pm$ 0.32
RTan*	0.76	21.79	320	6.35

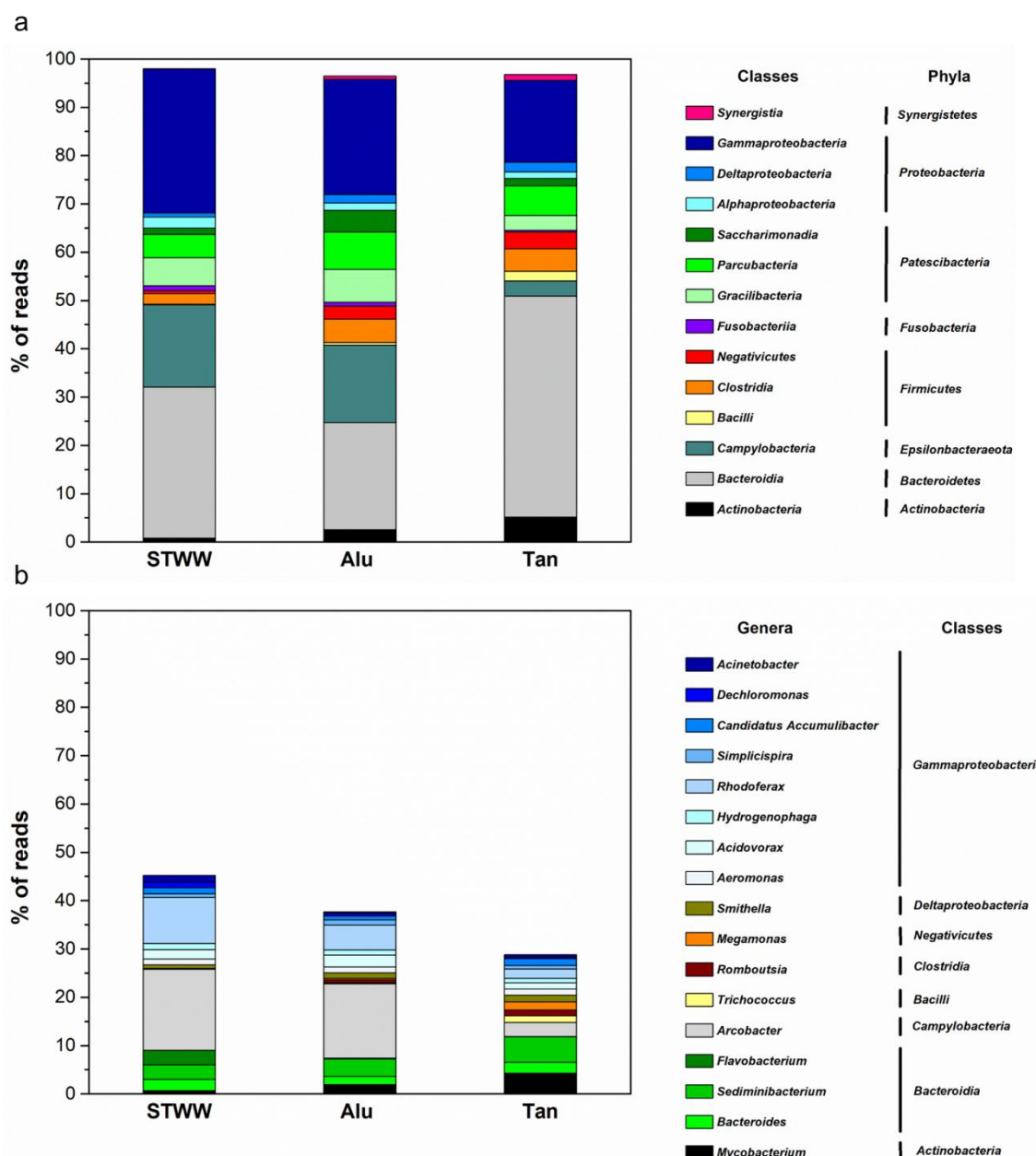
Regrowth was evaluated with the samples collected at the 14<sup>th</sup> March, 21<sup>st</sup> and 28<sup>th</sup> April (STWW, RSTWW, RAlu and RTan).



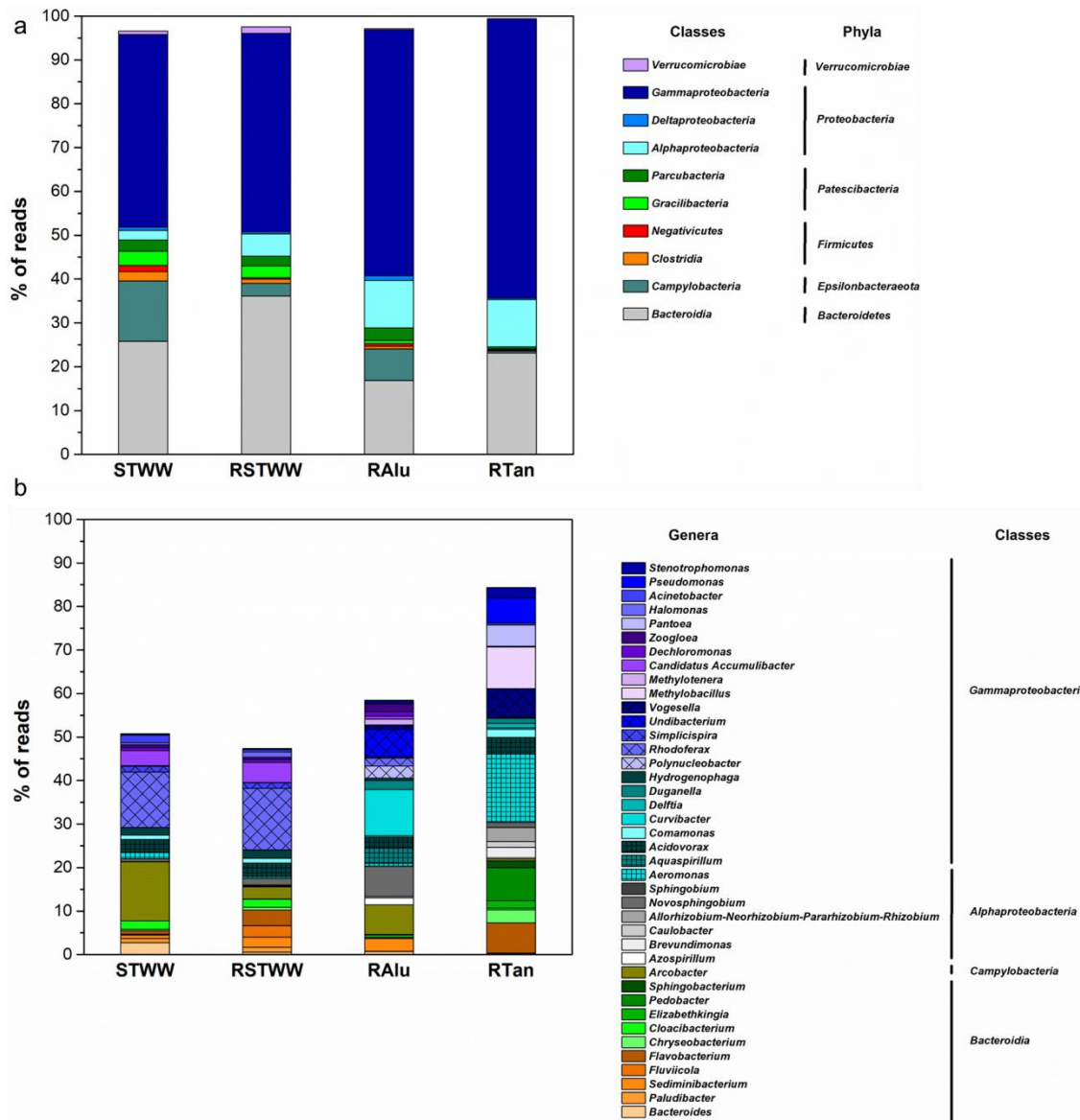
**Figure 1.** Total heterotrophs (HET) and faecal coliforms (FC) and their antibiotic resistant counterparts (FC/AMX, FC/CIP) in Secondary Treated Wastewater (STWW) and in treated STWW using aluminium sulphate (Alu) or tannin (Tan) as coagulants, immediately after treatment (samples collected at the 10<sup>th</sup>, 24<sup>th</sup> January and 14<sup>th</sup> February) (a) or after storage for 3 d at room temperature without previous treatment (RSTWW) and following treatment with coagulants (RAlu and RTan) (samples collected at the 14<sup>th</sup> March, 21<sup>st</sup> and 28<sup>th</sup> April) (b). Values are the average of three independent assays. Error bars represent standard deviations. Asterisks indicate a significant difference (\*  $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ;) in relation to the STWW samples, assessed by t-test.



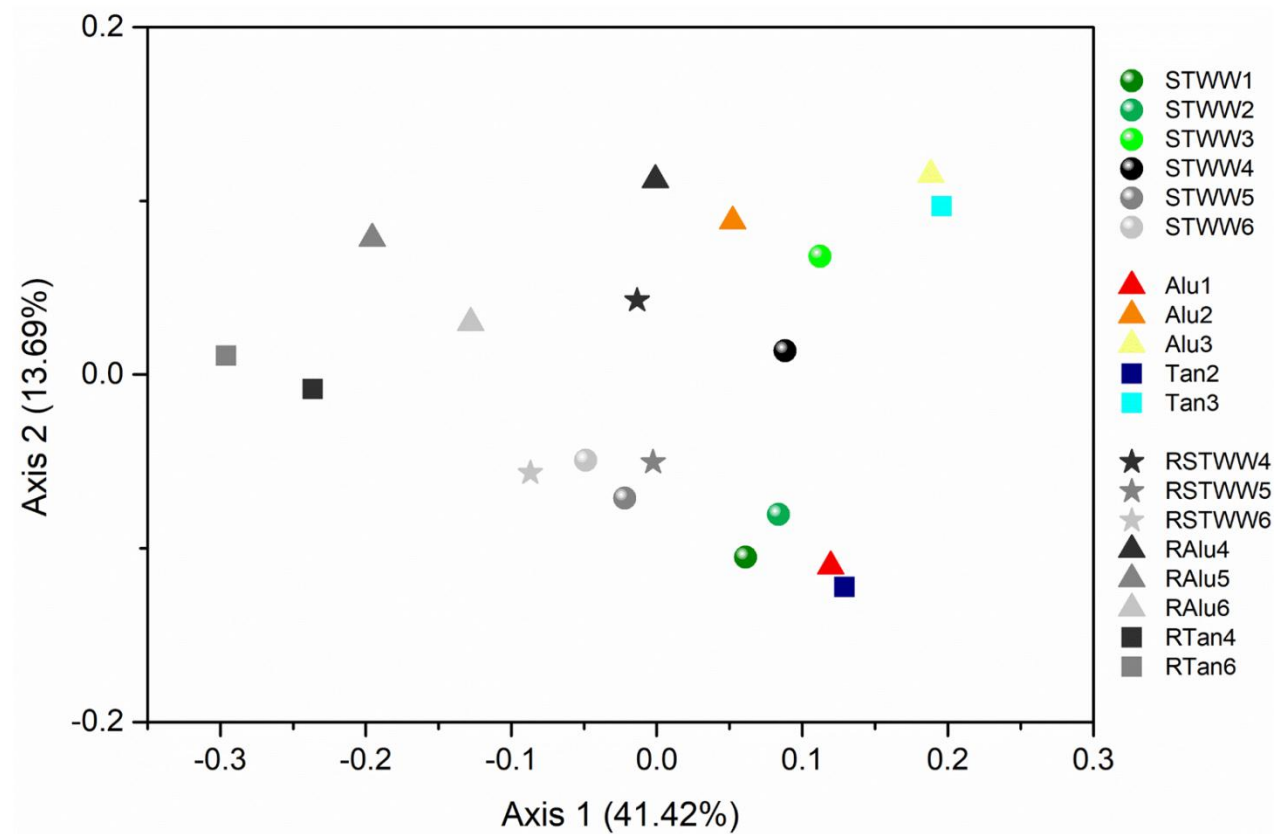
**Figure 2.** Abundance of the genes 16S rRNA, *int11*, *bla<sub>TEM</sub>* and *qnrS* in the Secondary Treatment Wastewater (STWW) and in treated STWW using aluminium sulphate (Alu) or tannin (Tan) as coagulants, immediately after treatment (samples collected at the 10<sup>th</sup>, 24<sup>th</sup> January and 14<sup>th</sup> February) (a), or after storage for 3 d at room temperature without previous treatment (RSTWW) and following treatment with coagulants (RAlu and RTan) (samples collected at the 14<sup>th</sup> March, 21<sup>st</sup> and 28<sup>th</sup> April) (b). Values are the average of three independent assays. Error bars represent standard deviations. Asterisks indicate a significant difference (\* p<0.05; \*\*p<0.01;) in relation to the STWW samples, assessed by t-test



**Figure 3.** Relative abundance of (a) classes and (b) genera, in the initial STWW samples and in the samples after the coagulation treatments (Alu, Tan). Values are the average of three independent assays, collected in 10<sup>th</sup>, 24<sup>th</sup> January and 14<sup>th</sup> February, except for Tan samples (n=2, 24<sup>th</sup> January and 14<sup>th</sup> February, respectively). Only those classes and genera with a relative abundance (> 1%) in at least one of the samples are presented.



**Figure 4.** Relative abundance of (a) classes and (b) genera in the initial STWW samples and treated wastewater samples following storage at room temperature conditions (RSTWW, RAlu and RTan). Values are the average of three independent assays, collected in 14<sup>th</sup> March, 21<sup>st</sup> and 28<sup>th</sup> April, except for RTan samples (n=2, 14<sup>th</sup> March and 28<sup>th</sup> April, respectively). Only those classes and genera with a relative abundance (> 1%) in at least one of the samples are presented.

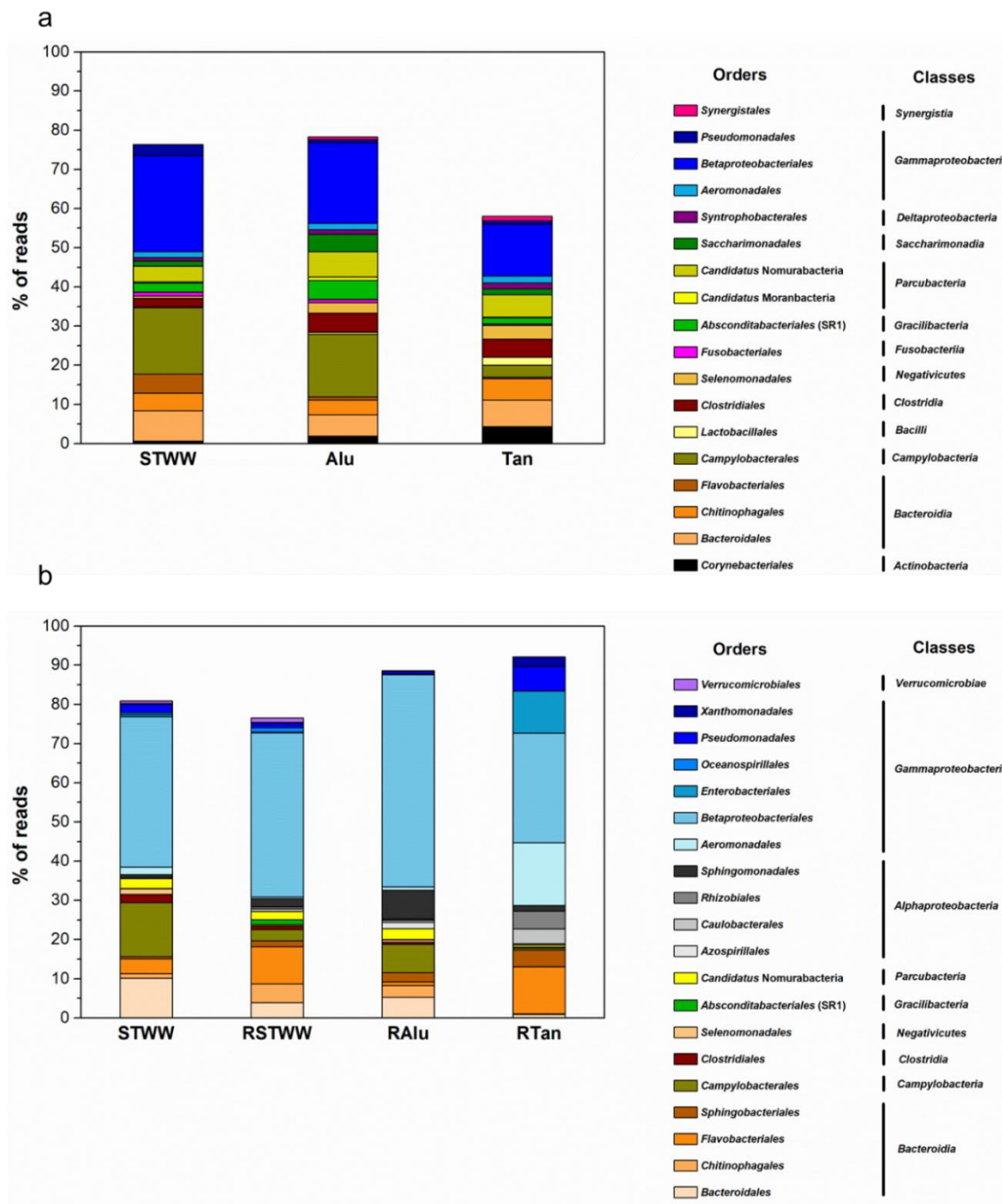


**Figure 5.** Biplot of principal coordinates analysis (PCoA) based on weighted-unifrac distances of the initial STWW, wastewater samples after coagulation treatments (Alu, Tan) and treated wastewater samples following storage (RSTWW, RAlu, RTan). The numbers of the samples refer to the date of sampling: 1-3, 10<sup>th</sup>, 24<sup>th</sup> January and 14<sup>th</sup> February, respectively; 3-6, 14<sup>th</sup> March, 21<sup>st</sup> and 28<sup>th</sup> April, respectively

Supplementary Information

**Table S1.** Target genes and conditions used in the qPCR assays.

Target gene	Primers (sequence) Reference	Conditions	Efficiency (%)	Reference
16S rRNA	1114F (CGGCAACGAGCGCAACCC)	95 °C for 10 min (1 cycle)	100	(Denman and McSweeney 2006)
	1275R (CCATTGTAGCACGTGTGTAGCC) <i>Escherichia coli</i> - ATCC 25922	95 °C for 15 s, 55 °C for 20 s and 72 °C for 10 s (35 cycles)		
<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> -F (TTCCTGTTTTTGCTCACCCAG)	95 °C for 10 min (1 cycle)	96	(Bibbal et al. 2007)
	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> -R (CTCAAGGATCTTACCGCTGTTG) <i>Escherichia coli</i> - A2FCC14	95 °C for 15 s, 60 °C for 30 s and 72 °C for 10 s (40 cycles)		
<i>intI1</i>	<i>intI1</i> -F (CCTCCCGCACGATGATC)	95 °C for 10 min (1 cycle)	94	(Goldstein et al. 2001)
	<i>intI1</i> -R (TCCACGCATCGTCAGGC) <i>Escherichia coli</i> - A2FCC14	95 °C for 15 s, 55 °C for 30 s and 72 °C for 10 s (40 cycles)		
<i>qnrS</i>	<i>qnrS</i> rtF11 (GACGTGCTAACTTGCGTGAT)	95 °C for 5 min (1 cycle)	95	(Marti and Balcázar 2013)
	<i>qnrS</i> rtR11 (TGGCATTGTTGGAAACTTG) <i>Enterobacter cloacae</i> - S1+	95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min (40 cycles)		



**Fig. S1.** Relative abundance of orders (a) in the initial STWW samples and in the samples after the coagulation treatments (Alu, Tan) and (b) in the initial STWW samples and treated wastewater samples following storage at room temperature conditions (RSTWW, RAlu and RTan). Only those orders with a relative abundance (> 1%) in at least one of the samples are presented. a) Values are the average of three independent assays, collected in 10<sup>th</sup>, 24<sup>th</sup> January and 14<sup>th</sup> February, except for Tan samples (n=2, 24<sup>th</sup> January and 14<sup>th</sup> February, respectively) and b) Values are the average of three independent assays, collected in 14<sup>th</sup> March, 21<sup>st</sup> and 28<sup>th</sup> April, except for RTan samples (n=2, 14<sup>th</sup> March and 28<sup>th</sup> April, respectively)



## References

- Bibbal, D., Dupouy, V., Ferré, J. P., Toutain, P. L., Fayet, O., Prère, M. F., Bousquet-Mélou, A., 2007. Impact of three ampicillin dosage regimens on selection of ampicillin resistance in *Enterobacteriaceae* and excretion of *bla*<sub>TEM</sub> genes in swine feces. *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (15), 4785-4790.
- Denman, S. E., McSweeney, C. S., 2006. Development of a real – time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen. *FEMS Microbiology Ecology*, 58 (3), 572-582.
- Goldstein, C., Lee, M. D., Sanchez, S., Hudson, C., Phillips, B., Register, B., Grady, M., Liebert, C., Summers, A. O., White, D. G., Maurer, J. J., 2001. Incidence of class 1 and 2 integrases in clinical and commensal bacteria from livestock, companion animals, and exotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45 (3), 723-726.
- Marti, E., Balcázar, J. L., 2013. Real – time PCR assays for quantification of *qnr* genes in environmental water samples and chicken feces. *Applied and Environmental Microbiology*, 79 (5), 1743-174

#### 4. DISCUSSÃO

A difusão da resistência bacteriana é amplamente relatada em escala global, representando sérios riscos à saúde humana e ao meio ambiente, conforme reportado pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2014). As águas residuais são consideradas importantes fontes de contaminação de ARB e ARG no meio ambiente e, portanto, o monitoramento e o desenvolvimento de tecnologias eficazes na remoção destes micro-organismos são fundamentais para diminuir o impacto nos ecossistemas, especialmente no meio aquático (Proia et al., 2018). A excreção de antibióticos incompletamente metabolizados por humanos e animais é a principal fonte de contaminação destes medicamentos no meio ambiente (Kumar e Pal, 2017).

Como demonstrado nos artigos apresentados nas seções 1 e 2, a literatura apresenta inúmeros estudos sobre a remoção de ARB e ARG em águas residuais, principalmente baseados em radiação ultravioleta, ozonização e cloração (Moreira et al., 2018., Sousa et al., 2017., Zhang et al., 2019), sendo as pesquisas sobre coagulação ainda muito escassas (Li et al., 2017). Entretanto nenhum estudo havia sido realizado com os coagulantes, sulfato de alumínio e tanino, para a remoção de resistência bacteriana.

Dessa forma essa tese de doutorado propôs auxiliar na compreensão da resistência bacteriana em estações de tratamento de águas residuais e servir como subsídio para a investigação de novas tecnologias que possam contribuir para a solução dessa problemática. Também foi proposto um método inovador para a remoção de ARB e ARG em águas residuais de uma ETARU a partir de ensaios de coagulação com sulfato de alumínio e tanino.

Embora inúmeros trabalhos apontem para a toxicidade do sulfato de alumínio (Bondy, 2016., Guillmore et al., 2016) e ocorra a crescente substituição deste por coagulantes orgânicos (Beltrán-Heredia e Sánchez-Martín, 2009., Oladoja, 2015., Yin, 2010). Neste estudo, o sulfato de alumínio foi mais eficaz na remoção de sólidos suspensos, bactérias resistentes a antibióticos, e genes de resistência a antibióticos do que o tanino. Outro resultado importante é que a reativação dos micro-organismos que estavam em estado de dormência, após período de armazenamento, já anteriormente relatada na literatura (Becerra-Castro et al., 2016; Moreira et al., 2018; Sousa et al., 2016), foi maior após o tratamento com tanino, do que nas amostras tratadas com sulfato de alumínio. O que sugere que por se tratar de um coagulante orgânico, o tanino possa disponibilizar outra fonte metabólica para os micro-organismos, contribuindo para o crescimento microbiano.

Esse estudo também buscou avaliar se a coagulação poderia levar a alterações na estrutura da comunidade microbiana, o que foi confirmado pela análise metagenômica. A análise das águas residuais tratadas após armazenamento gerou a oportunidade de rearranjos na comunidade bacteriana em ambos os coagulantes utilizados. Resultando em uma abundância relativa mais alta de *Gammaproteobacteria*, incluindo *Betaproteobacteriales* do que no efluente não tratado com coagulantes. No efluente armazenado após o tratamento com sulfato de alumínio houve a prevalência de: *Gammaproteobacteria*, *Curvibacter*, *Undibacterium* e *Aquaspirillum* (*Betaproteobacteriales*). Enquanto que nas amostras armazenadas após o tratamento com tanino houve um aumento, de *Aeromonas* (*Aeromonadales*), *Pseudomonas* (*Pseudomonadales*) e *Stenotrophomonas* (*Xanthomonadales*), que são bactérias previamente descritas como potenciais vetores de disseminação de genes de resistência a antibióticos (Vaz-Moreira et al., 2014).

Estes achados foram fundamentais para o entendimento dos efeitos da coagulação com sulfato de alumínio e tanino nas bactérias resistentes a amoxicilina e ciprofloxacina, assim como nos genes 16S rRNA, *intl1*, e nos genes de resistência *bla<sub>TEM</sub>* e *qnrS*, em águas residuais urbanas. Considerando os resultados obtidos nesta pesquisa, não é recomendado o uso do tanino para o tratamento de águas que apresentem cargas significativas de bactérias resistentes e genes de resistência a antibióticos, como efluentes urbanos e hospitalares, pois os resultados obtidos nesse estudo sugerem o aumento de ARB e ARG após o armazenamento dos efluentes tratados com tanino. Levando em consideração os prejuízos ambientais advindos da toxicidade do sulfato de alumínio presente no lodo após o tratamento, e a consequente restrição na disposição final desse resíduo, os benefícios provenientes de uma efetiva remoção de ARB e ARG nas águas residuais poderiam se sobressair aos custos do tratamento do lodo contaminado com sulfato de alumínio. Pois a presença de elevadas cargas de ARB e ARG nos efluentes contribui para a disseminação da resistência bacteriana nos corpos hídricos, que possui maior impacto de propagação do que o confinamento no lodo.

Os resultados encontrados fornecem uma importante base para pesquisas futuras de remoção de ARB e ARG em ETARU, demonstrando o possível uso de coagulantes, especialmente considerando a grande variedade de reagentes potenciais que ainda podem ser testados, bem como, a possibilidade de combinação com outras técnicas. O que pode vir a trazer grandes contribuições na busca por um tratamento eficaz na remoção da resistência bacteriana das águas residuais e consequentemente nos corpos hídricos receptores.

## 5. CONCLUSÃO

O crescente aumento da resistência bacteriana e as implicações desta problemática na saúde pública e ambiental são considerados um dos grandes desafios da atualidade. Nesse contexto, a correlação existente entre as bactérias e genes de resistência a antibióticos, e as estações de tratamento de águas residuais é considerado um ponto crítico para a disseminação da resistência bacteriana. O tratamento secundário, especialmente o tratamento por lodo ativado, onde ocorre à recirculação do lodo e pressão seletiva para a adaptação dos micro-organismos é considerado um agravante para o incremento de bactérias e genes de resistência nos efluentes das plantas de tratamento de águas residuais. O que conseqüentemente leva a descarga desses micro-organismos no meio ambiente e contribui para a contaminação aquática.

A capacidade de remover bactérias e genes de resistência em efluentes urbanos através da coagulação com sulfato de alumínio e tanino foi testada por meio da avaliação da quantificação de micro-organismos cultiváveis, da quantificação de genes de resistência e da análise de comunidade. Os resultados demonstraram que ambos os coagulantes reduziram a carga microbiana, incluindo as bactérias resistentes a antibióticos em unidades de 2 log. Quanto aos genes avaliados, ambos os coagulantes reduziram a carga de *int11*, entretanto apenas o sulfato de alumínio reduziu a carga dos genes de resistência *bla<sub>TEM</sub>* e *qnrS*.

A reativação dos micro-organismos após período de armazenamento também foi avaliada. Nas amostras tratadas com tanino ocorreu o recrescimento dos micro-organismos para valores semelhantes aos encontrados nas amostras iniciais. Quanto aos genes analisados, o armazenamento das águas residuais tratadas com sulfato de alumínio promoveu a reativação do *bla<sub>TEM</sub>* para valores semelhantes aos encontrados na amostra inicial. Já nas amostras armazenadas após o tratamento com tanino ocorreu um incremento da carga de *qnrS* para níveis superiores aos encontrados no efluente inicial.

Os efeitos da coagulação na comunidade microbiana foram avaliados, o armazenamento das águas residuais tratadas com sulfato de alumínio e tanino criou oportunidade para rearranjos na comunidade microbiana. Ocasionalmente uma abundância relativa mais alta de *Gammaproteobacteria*, incluindo *Betaproteobacteriales* em relação às amostras iniciais não coaguladas. Entretanto ocorreu uma diferença entre os coagulantes estudados. Nas amostras tratadas com sulfato de alumínio prevaleceram as *Curvibacter*, *Undibacterium* e *Aquaspirillum*. Enquanto que nas amostras tratadas com tanino os gêneros *Aeromonas*, *Pseudomonas* e *Stenotrophomonas* foram mais abundantes. Cabe salientar que os

gêneros prevalentes nas amostras tratadas com tanino são bactérias previamente descritas como potenciais vetores de disseminação de genes de resistência a antibióticos.

Portanto, considerando os resultados obtidos nesse estudo o sulfato de alumínio apresentou resultados mais promissores na remoção de bactérias e genes de resistência a antibióticos em comparação ao tanino. No entanto, o estudo de outros coagulantes, assim como a combinação da coagulação com métodos de desinfecção são necessários para uma maior compreensão do potencial da coagulação na remoção de ARB e ARG em efluentes.

## REFERÊNCIAS

- BECERRA-CASTRO, C., MACEDO, G., SILVA, A. M. T., MANAIA, C. M., NUNES, O. C., (2016). Proteobacteria become predominant during regrowth after water disinfection. **Science of The Total Environment**, 573, p. 313-323.
- BELTRÁN-HEREDIA, J., SÁNCHEZ-MARTÍN, J., (2009). Municipal wastewater treatment by modified tannin flocculant agent. **Desalination**, 249, p. 353-358.
- BONDY, S. C. (2016). Low levels of aluminum can lead to behavioral and morphological changes associated with Alzheimer's disease and age-related neurodegeneration. **NeuroToxicology**. V. 54, p. 222-229.
- CHOY, S.Y., PRASAD, K.M., WU, T.Y., RAGHUNANDAN, M.E., RAMANAN, R.N.S. (2014). Utilization of plant-based natural coagulants as future alternatives towards sustainable water clarification. **Journal of Environmental Sciences**. V. 26, p. 2178-289.
- CYTRYN, E., (2013). The soil resistome: the anthropogenic, the native, and the unknown. **Soil Biol. Biochem.** 63, p. 18-23.
- DAVIS, M. (2017). Tratamento de águas para abastecimento e residuárias: princípios e práticas. **Elsevier**, 1ª ed, Rio de Janeiro, p. 801.
- DI BERNARDO, L., SABOGAL PAZ, L. P. (2008). Seleção de Tecnologias de Tratamento da Água. São Carlos: editora **LDIBE LTDA**, v. 1, p. 878.
- EEA (2017). Urban waste water treatment map. (WWW Document).
- FIOCRUZ (2017). Resistência bacteriana aos antibióticos: o que você deve saber e como prevenir/ Elaborado por Caio Augusto Martins Aires e Marise Dutra Asensi. Rio de Janeiro: IOC/Fiocruz, p. 15.
- GILLMORE, M. L., GOLDING, L. A., ANGEL, B. M., ADAMS, M. S. (2016). Toxicity of dissolved and precipitated aluminium to marine diatoms. **Aquatic Toxicology**. V. 174, p. 82-91.
- GRAHAM, N., GANG, F., FOWLER, G., WATTS, M. (2008). Characterisation and coagulation performance of a tannin-based cationic polymer. A preliminary assessment. **Colloid and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 327, p. 9-16.
- GUERRERO, P. P., SÁNCHEZ, F. G., SABORIDO, D. G., LOZANO, I. G. (2014). Infecciones por enterobacterias. **Medicine**, (11) 55, p. 3276-82.
- HENZE, M., VAN LOOSDRECHT, M. C. M., EKAMA, G. A., BRDJANOVIC, D., (2008). Biological wastewater treatment: principles, modelling and design. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 511.

JIA, S., SHI, P., HU, Q., LI, B., ZHANG, T., ZHANG, X. X., (2015). Bacterial community shift drives antibiotic resistance promotion during drinking water chlorination. **Environmental Science and Technology**, 49, 12271-9.

KUMAR, A., PAL, D. (2017). Antibiotic resistance and wastewater: correlation, impact and critical human health challenges. **Journal of Environmental Chemical Engineering** 6, p. 52-58.

LAMBA, M., AHAMMAD, S. Z., (2017). Performance comparison of secondary and tertiary treatment systems for treating antibiotic resistance. **Water Research**, 127, 172-182.

LE, T., NG, C., TRAN, N. H., CHEN, H., GIN, K. Y. (2018). Removal of antibiotic residues, antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes in municipal wastewater by membrane bioreactor systems. **Water Research** 145, p. 498-508.

LI, N., SHENG, G., LU, Y., ZENG, R. J., YU, H., (2017). Removal of antibiotic resistance genes from wastewater treatment plant effluent by coagulation. **Water Research** 111, p. 204-212.

MA, L. P., LI, B., ZHANG, T. (2014). Abundant rifampin resistance genes and significant correlations of antibiotic resistance genes and plasmids in various environments revealed by metagenomic analysis. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 98, 5195-204.

MANAIA, C. M., Rocha, J., Scaccia, N., Marano, R., Radu, E., Biancullo, F., Cerqueira, F., Fortunato, G., Iakovides, I. C., Zammit, I., Kampouris, I., Vaz-Moreira, I., Nunes, O. C. (2018). Antibiotic resistance in wastewater treatment plants: tackling the black box. **Environment International**, 115, p. 312-324.

METCALF, L.; Eddy, H. (2013). **Wastewater Engineering: Treatment and Reuse**. 5 ed. Revisado por George Tchobanoglous, Franklin L. Burton, H. David Stensel. McGrawhill, New York, p. 1819.

MOREIRA, N. F. F., SOUZA, J. M., MACEDO, G., RIBEIRO, A. R., BARREIROS, L., PEDROSA, M., FARIA, J. L., PEREIRA, M. F. R., CASTRO-SILVA, S., SEGUNDO, M. A., MANAIA, C. M., NUNES, O. C., SILVA, A. M. T. (2016). Photocatalytic ozonation of urban wastewater and surface water using immobilized TiO<sub>2</sub> with LEDs: Micropollutants, antibiotic resistance genes and estrogenic activity. **Water Research**, v. 94, p. 10-22.

MOREIRA, N. F. F., NARCISO-DA-ROCHA, C., POLO-LOPEZ, M. I., PASTRANA-MARTINEZ, L. M., FARIA, J. L., MANAIA, C. M., FERNANDEZ-IBANEZ, P., NUNES, O. C., SILVA, A. M. T. (2018). Solar treatment (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub>-P25 and GO-TiO<sub>2</sub> photocatalysis, photo-Fenton) of organic micropollutants, human pathogen indicators, antibiotic resistant bacteria and related genes in urban wastewater. **Water Research**, 135, p. 195-206.

MOSQUITO, S. et al., (2011). Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. **Rev Peru Med Exp Salud Publica**, Lima, 28, n. 4, p. 648-656.

NARCISO-DA-ROCHA, C., VARELA, A.R., SCHWARTZ, T., NUNES, O.C., MANAIA, C.M., 2014. *bla*<sub>TEM</sub> and *vanA* as indicator genes of antibiotic resistance contamination in a hospital-urban wastewater treatment plant system. **J. Glob. Antimicrob. Resist.** 2 (4), p. 309-315.

OLADOJA, N. A. (2015). Headway on natural polymeric coagulants in water and wastewater treatment operations. **Journal of Water Process Engineering**. v. 6, p. 174-192.

PITUCO, M. M. (2017). Sustentabilidade Ambiental de um Sistema de Tratamento de Águas Residuais Urbanas: Uma avaliação do Ciclo de Vida. **Dissertação de mestrado** apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança, Bragança – PT, p. 115.

PROIA, L., ANZIL, A., SUBIRATS, J., BORREGO, C., FARRÈ, M., LLORCA, M., BALCÁZAR, J. L., SERVAIS, P. (2018). Antibiotic resistance in urban and hospital wastewaters and their impact on a receiving freshwater ecosystem. **Chemosphere**, 206, p. 70-82.

SILLANPÄÄ, M., NCIBI, M. C., MATILAINEN, A., VEPSÄLÄINEN, M. (2018). Removal of natural organic matter in drinking water treatment by coagulation: A comprehensive review. **Chemosphere**, 190, 54-71.

SILVA, M. F., VAZ-MOREIRA, I., GONZALES-PAJUELO, M., NUNES, O. C., MANAIA, C. M. (2007). Antimicrobial resistance patterns in *Enterobacteriaceae* isolated from an urban wastewater treatment plant. **FEMS Microbiol. Ecol**, v.60, p. 166-176.

SOUSA, M. J., MACEDO, G., PEDROSA, M., BECERRA-CASTRO, C., CASTRO-SILVA, S., PEREIRA, M. F. R., SILVA, A. M. T., NUNES, O. C., MANAIA, C. M. (2016). Ozonation and UV<sub>254nm</sub> radiation for the removal of microorganisms and antibiotic resistance genes from urban wastewater. **Journal of Hazardous Materials**, 323, p. 434-441.

Trata Brasil, (2018). **Ranking do Saneamento Instituto Trata Brasil**. Disponível em: <http://www.tratabrasil.org.br/images/estudos/itb/ranking-2018/realatorio-completo.pdf>. São Paulo, p. 118.

VAZ-MOREIRA, I., NUNES, O. C., MANAIA, C. M. (2014). Bacterial diversity and antibiotic resistance in water habitats: searching the links with the human microbiome. **FEMS Microbiol Reviews**, 38, p. 761-78.

WEF. (2007). Operation of Municipal Wastewater Treatment Plants. Water Environment Federation, Ed. 6th ed. McGraw Hill Professional. p. 1981.

WHO (2014). Antimicrobial Resistance: global report on surveillance. **World Health Organization**.

WWF BRASIL (2019). World Wide Fund for Nature. Mudanças climáticas. Disponível em: <https://www.wwf.org.br>.

YIN, CHUNG-YANG (2010). Emerging usage of plant-based coagulants for water and wastewater treatment. **Process Biochemistry**, 45, p. 1437-1444.



ZHANG, T., HU, Y., JIANG, L., YAO, S., LIN, K., ZHOU, Y., CUI, C. (2019). Removal of antibiotic resistance genes and control of horizontal transfer risk by UV, chlorination and UV/chlorination treatments of drinking water. **Chemical Engineering Journal** 358,p. 589-597.