

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E PATOLOGIA

ANA BEATRIZ SANTANA

PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS
DE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS ISOLADAS
EM SISTEMA DE TRATAMENTO DE ÁGUA NEGRA SIMULADA

SÃO CARLOS - SP
2023

ANA BEATRIZ SANTANA

PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS
DE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS ISOLADAS
EM SISTEMA DE TRATAMENTO DE ÁGUA NEGRA SIMULADA

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Federal de São
Carlos, para obtenção do título de Bacharel
em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Clovis Wesley
Oliveira de Souza
Coorientadora: Ana Paula Erbetta Sueitt

São Carlos - SP
2023

AGRADECIMENTOS

O desenvolvimento desse Trabalho de Conclusão de Curso requereu a ajuda e auxílio de várias pessoas e Instituições, então agradeço:

Ao Professor Orientador Clovis Wesley Oliveira de Souza, que se prontificou a sanar todas as dúvidas, direcionar e dar apoio, além de sempre acompanhar a elaboração do trabalho.

À Coorientadora Ana Paula Erbeta Sueitt, que guiou, acompanhou e auxiliou durante toda realização dos experimentos práticos e na elaboração teórica, também se prontificando a sanar todas as dúvidas e necessidades.

À toda equipe do Laboratório de Microbiologia e Parasitologia do Departamento de Morfologia e Patologia da UFSCar Campus São Carlos, que sempre se prontificaram para dar suporte e ajudar no que fosse necessário.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de Iniciação Científica e Reserva Técnica (Processo 2019/03061-7).

RESUMO

A descarga de esgotos domésticos sem tratamento adequado compromete a qualidade da água, gerando desequilíbrio nos corpos receptores e potencializando o aporte de microrganismos patogênicos e de cepas resistentes a antibióticos, acarretando um grande problema de saúde pública. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi: verificar a eficiência da remoção de coliformes totais, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus* spp., e detectar a presença de *Salmonella* spp. em diferentes etapas de um sistema de tratamento de água negra simulada; isolar e realizar a confirmação bioquímica das cepas bacterianas (exceto por coliformes totais); e traçar o perfil de resistência a antimicrobianos dos isolados. O sistema estudado, instalado na Estação de Tratamento de Esgoto Monjolinho, em São Carlos (SP), é composto pelo reator UASB (*upflow anaerobic sludge blanket*) seguido de um fotobiorreator tubular. Semanalmente, foram coletadas amostras nos estágios: água negra simulada (AN), efluente do reator UASB (RU) e efluente do fotobiorreator tubular (FT). Foram realizadas nove coletas no Experimento I (08/2018 a 10/2018) e oito no Experimento II (03/2019 a 06/2019). O resultado da contagem, feita por diluição seriada, indicou notável diminuição de carga microbiológica ao decorrer do sistema de tratamento: em relação a AN, a média de diminuição da carga em RU foi de 91,1%, e de 99,3% e 91,6% para FT, em relação à AN e RU, respectivamente. Colônias preditivas de *Salmonella* spp. foram detectadas em 6, 4 e 5 amostras de AN, RU e FT, respectivamente. A partir das colônias isoladas, foram feitos testes adicionais e antibiogramas dos confirmados: de *E. coli*, no qual os índices MAR (Múltipla Resistência a Antimicrobianos) dos grupos de AN, RU e FT chegaram a 0,16, e foi obtido uma porcentagem de 67% de amostras sensíveis a todos os antibióticos testados, tendo maiores índices de resistência para Ampicilina 10µg e Tetraciclina 30µg; de *Enterococcus* spp., em que os índices MAR não passaram de 0,11, com uma porcentagem de até 77% de amostras sensíveis a todos os antibióticos, tendo maior índice de resistência para Tetraciclina 30µg e Estreptomicina 300µg; e de *Salmonella* spp., que no Experimento I, dos isolados apenas uma amostra de RU apresentou resistência, e no Experimento II, RU e AN apresentaram um índice MAR de 0,20 e 0,05, respectivamente, com maior índice de resistência para Ampicilina 10µg e Tetraciclina 30µg. Logo, o reator UASB se mostrou um tratamento de água negra efetivo, resultando em uma menor carga microbiológica e menor resistência (com exceção do resultado de *Salmonella* spp.). O fotobiorreator, entretanto, além de diminuir a carga microbiológica, pode realizar reciclagem de nutrientes, que evitaria a

eutrofização dos corpos hídricos aos quais o efluente é destinado. Enfim, ainda é necessário realizar testes em maior escala para fundamentar e definir melhor a diminuição da carga a partir do efluente do UASB e principalmente investigar se a diferença de resistência entre o efluente do UASB e do fotobiorreator é expressiva.

PALAVRAS-CHAVE: tratamento de efluentes; fotobiorreator tubular; cepas multidroga-resistentes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fluxograma das etapas realizadas no presente estudo	15
Figura 2 - Modelo esquemático da instalação experimental para tratamento de água negra simulada	16
Figura 3 - Compartimentos do sistema de tratamento analisados no trabalho	17
Figura 4 - Ilustração representativa da análise microbiológica para detecção de <i>Salmonella</i> spp.	18
Figura 5 - Ilustração representativa da análise microbiológica para contagem de unidades formadoras de colônias	19
Figura 6 - Ilustração representativa da realização do Antibiograma	24
Figura 7 - Concentração em log UFC/mL de coliformes totais (CT), coliformes fecais – <i>E. coli</i> (CF) e <i>Enterococcus</i> spp. (ENT) em amostras de sistema de tratamento de água negra simulada	27
Figura 8 - Concentração média (log UFC/mL) de coliformes totais (CT), coliformes fecais – <i>E. coli</i> (CF) e <i>Enterococcus</i> spp. (ENT) em nove amostras de sistema de tratamento de água negra simulada	27
Figura 9 - Concentração em log UFC/mL de coliformes totais (CT), coliformes fecais – <i>E. coli</i> (CF) e <i>Enterococcus</i> spp. (ENT) em amostras de sistema de tratamento de água negra simulada	28
Figura 10 - Concentração média (log UFC/mL) de coliformes totais (CT), coliformes fecais – <i>E. coli</i> (CF) e <i>Enterococcus</i> spp. (ENT) em oito amostras de sistema de tratamento de água negra simulada	29
Figura 11 - Representação ilustrativa com a porcentagem de resistência a cada antimicrobiano em relação às amostras dos conjuntos AN (ANa e ANb), RU (RUa e RUB), FT (FTa e FTb) conforme a legenda de cores	37
Figura 12 - Representação ilustrativa da resistência a antimicrobianos de amostras de <i>Escherichia coli</i> do conjunto ANa, RUa, FTa, ANb, RUB e FTb, conforme legenda.	38
Figura 13 - Representação ilustrativa com a porcentagem de resistência a cada antimicrobiano em relação às amostras dos conjuntos AN (ANa e ANb), RU (RUa e RUB), FT (FTa e FTb) conforme a legenda de cores	39
Figura 14 - Representação ilustrativa da resistência a antimicrobianos de amostras de <i>Enterococcus</i> spp. do conjunto ANa, RUa, FTa, ANb, RUB e FTb, conforme legenda.	40

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 OBJETIVOS	10
2.1 OBJETIVO GERAL	10
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
3 EMBASAMENTO TEÓRICO	11
3.1 DESPEJO DE ESGOTO E SAÚDE PÚBLICA	11
3.2 ÁGUA NEGRA	11
3.3 PRESENÇA DE PATÓGENOS E RESISTÊNCIA À ANTIMICROBIANOS EM ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DE EFLUENTES	12
4 METODOLOGIA	15
4.1 INSTALAÇÃO EXPERIMENTAL	16
4.2 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA	17
4.2.1 Amostragem e preparo do material para análise	18
4.2.2 Contagem de coliformes totais e isolamento de <i>Escherichia coli</i>	19
4.2.3 Contagem e isolamento de <i>Staphylococcus aureus</i>	20
4.2.4 Contagem e isolamento de <i>Enterococcus spp.</i>	20
4.2.5 Detecção e isolamento de <i>Salmonella spp.</i>	20
4.3 TESTES ADICIONAIS	21
4.3.1 Coloração de Gram	21
4.3.2 Teste de indol	21
4.3.3 Teste de citrato	22
4.3.4 Teste de DNase	22
4.3.5 Teste de coagulase	22
4.3.6 Teste PYR	22
4.3.7 Teste de soro anti- <i>Salmonella</i>	23
4.4 ANTIBIOGRAMA	23
4.5 CONTROLE DE QUALIDADE	25
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	26
5.1 COMPARAÇÃO ENTRE A OCORRÊNCIA E REMOÇÃO DE BACTÉRIAS NOS DOIS EXPERIMENTOS	26
5.1.1 Experimento I	26
5.1.2 Experimento II	28
5.1.3 Considerações e discussões sobre a ocorrência e remoção de bactérias nos dois experimentos realizados	29
5.2 MICRORGANISMOS ISOLADOS	31
5.2.1 <i>Escherichia coli</i>	31
5.2.2 <i>Enterococcus spp.</i>	32
5.2.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	33
5.2.4 <i>Salmonella spp.</i>	34

5.2.5 Considerações e discussões sobre os microrganismos isolados	35
5.3 ANTIBIOGRAMAS	36
5.3.1 Antibiograma de <i>Escherichia coli</i>	36
5.3.2 Antibiograma de <i>Enterococcus</i> spp.	38
5.3.3 Antibiograma de <i>Salmonella</i> spp.	40
5.3.4 Considerações e discussões sobre os antibiogramas	41
6 CONCLUSÕES	45
REFERÊNCIAS	47

1 INTRODUÇÃO

De acordo com dados do Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento (SNIS, 2016), no Brasil, a porcentagem coletada de esgoto é de apenas 51,9%, sendo que disso, apenas 74,9% é tratado. Assim, é possível constatar-se que o Brasil se apresenta em uma situação preocupante quanto ao destino do esgoto produzido, demandando grande necessidade de sistemas de tratamento. Esse cenário traz implicações para o estado epidemiológico do país, pois, de acordo com o IBGE (2010) a cada 100.000 habitantes, 325,4 internações são causadas por doenças relacionadas ao saneamento ambiental inadequado.

Visando a proteção dos corpos hídricos receptores bem como da saúde pública, a legislação brasileira quanto ao tratamento e lançamento de esgotos (Resolução CONAMA nº 357/2005 e Resolução CONAMA nº 430/2011), exige que haja remoção de sólidos, matéria orgânica e patógenos, especialmente os do grupo coliforme antes que o esgoto seja lançado nos ecossistemas aquáticos.

Os reatores UASB (reator anaeróbio de fluxo ascendente, do inglês, *upflow anaerobic sludge blanket*) são muito utilizados para a remoção de carga orgânica nos esgotos e baseiam-se na utilização da digestão anaeróbia por bactérias para degradar a matéria orgânica presente nas águas residuárias. O afluente entra no reator e segue um fluxo ascendente, percorrendo primeiramente um leito de lodo, onde há abundante biomassa ativa, depois passa por uma manta de lodo, que se refere também à biomassa ativa, porém em menor quantidade, e por fim passa por um separador de três fases, no qual há a separação do lodo, do líquido e do biogás produzido no processamento (CAMPOS *et al.*, 2006).

Ainda que a utilização de reatores UASB seja amplamente difundida como forma de atender às exigências da legislação, os efluentes secundários produzidos por esse tipo de tratamento ainda apresentam altas concentrações de nutrientes, especialmente nitrogênio (N) e fósforo (P), sob a forma de NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- e PO_4^{3-} , os quais são identificados como a principal causa que leva à eutrofização dos ecossistemas aquáticos. Além disso, uma variedade significativa de patógenos está presente nesse tipo de efluente. Portanto, é prioritário que os efluentes secundários recebam um pós-tratamento adequado e eficiente antes de serem lançados nos corpos d'água, de forma a não representarem uma ameaça constante aos recursos hídricos disponíveis (ASLAN & KAPDAN, 2006; GONZÁLEZ *et al.*, 2008; de-BASHAN & BASHAN, 2010; RUIZ-MARIN *et al.*, 2010).

Em relação ao tratamento terciário de efluentes, os novos projetos de saneamento têm se preocupado em não somente tratar os resíduos produzidos como também reaproveitar a água e os nutrientes presentes nos esgotos. Dessa forma, o tratamento de efluentes serviria tanto para diminuir a contaminação de mananciais, quanto para devolver outros recursos para o meio ambiente (ANGENENT *et al.*, 2004; GALBIATI, 2009; PINHEIRO, 2013; VERSTRAETE *et al.*, 2009).

Um dos possíveis pós-tratamentos para os efluentes dos reatores UASB são os fotobiorreatores (FBRs) para o cultivo de microalgas (FERRER, 2017; ISOLDI *et al.*, 2005; MEZZARI *et al.*, 2013; RAZZAK *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2014). Esses reatores podem ser abertos ou fechados, e iluminados natural ou artificialmente. Nesses sistemas, o nitrogênio e o fósforo necessários ao crescimento da biomassa algal são fornecidos pelo efluente a ser tratado. Uma das maiores vantagens é a produção de biomassa algal com baixo custo, que pode ser utilizada posteriormente, além da remoção de contaminantes e nutrientes, evitando a geração de resíduos (BJERK, 2012).

A remoção de nutrientes utilizando FBRs tem sido bastante reportada na literatura (MIN *et al.*, 2011; TERCERO *et al.*, 2014; ZHU *et al.*, 2013), porém informações sobre a remoção de patógenos são escassas. Ademais, a legislação brasileira sobre o tratamento de esgotos ainda é incompleta, pois há apenas parâmetros de remoção de microrganismos para o grupo coliforme, não compreendendo outros microrganismos patogênicos que potencialmente estão presentes nos efluentes e que podem vir a contaminar os corpos hídricos e causar problemas de saúde pública. Considerando esses fatores, é imprescindível que haja estudos mais aprofundados sobre os microrganismos presentes nos efluentes, se possível quantificar e analisar a sensibilidade à antibióticos, para que possa se objetivar um parâmetro mais confiável, e assim uma melhor qualidade e segurança na reutilização ou lançamento de efluentes em corpos hídricos (LEE *et al.*, 2014; MIN *et al.*, 2011).

Nesse contexto, o presente estudo apresenta resultados sobre a ocorrência e remoção de patógenos, mais especificamente coliformes totais, *Escherichia coli* (*E. coli*), *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) e *Enterococcus* spp., em um sistema de tratamento de água negra simulada. Neste estudo, avaliou-se também o perfil de resistência a antimicrobianos nos diferentes compartimentos do sistema de tratamento: água negra simulada, efluente do reator UASB e efluente do fotobiorreator.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a ocorrência, remoção e o perfil de resistência a antimicrobianos de bactérias patogênicas isoladas em diferentes compartimentos de um sistema de tratamento de água negra simulada, composto por reator UASB seguido de fotobiorreator tubular.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Contagem e isolamento de *E. coli*, *S. aureus* e *Enterococcus* spp. em amostras de água negra simulada (AN), efluente do reator UASB (RU) e efluente do fotobiorreator (FT);
 - Averiguação da presença de *Salmonella* spp. em AN, RU e FT;
 - Utilização de diversos testes bioquímicos para confirmação das culturas bacterianas isoladas;
 - Determinação do perfil de resistência à antibióticos das cepas isoladas;
 - Comparação dos resultados entre AN, RU e FT.

3 EMBASAMENTO TEÓRICO

3.1 DESPEJO DE ESGOTO E SAÚDE PÚBLICA

Um dos grandes problemas do despejo de esgoto em corpos d'água sem tratamento adequado é a liberação de microrganismos patogênicos nesses locais. Isso é uma ameaça para a população que vive no entorno, pois pode-se contrair alguma infecção por meio de banhos, consumo de alimentos de plantações próximas, entre outros veículos. Dessa forma, a remoção de patógenos no tratamento de efluentes é algo muito almejado, sendo que isso levaria a diminuição de uma grande fonte de contágio em populações, melhorando potencialmente a qualidade de vida e de saúde pública. Entretanto, sistemas usuais de tratamento de esgotos, como o UASB, podem não possuir eficácia na inativação de patógenos nas águas residuais, tendo assim que recorrer a outras técnicas que conseguem de fato tornar a água suficientemente segura para não transmitir doenças para os indivíduos (BERTONCINI, 2008; GALBIATI, 2009).

3.2 ÁGUA NEGRA

O esgoto doméstico pode ser fracionado em dois tipos: a água negra e a água cinza. A água cinza compõe a maior parte do esgoto, sendo constituída de águas de banho e de lavagem, ou seja, grande volume de água e concentração consideravelmente baixa de materiais orgânicos. O tratamento desse tipo de água é relativamente fácil, podendo ser tratado e reutilizado nas próprias residências. O outro tipo de efluente é a água negra, que é composto basicamente de fezes, urina e água de descarga, sendo que ocasionalmente, águas de cozinha também podem ser classificadas como água negra pela alta quantidade de compostos orgânicos. O volume desse tipo de água é demasiado inferior ao volume produzido de água cinza (70% é água cinza e 30% é água negra), e o tratamento já é consideravelmente mais complexo (BERTONCINI, 2008; GALBIATI, 2009; ALVES *et al.*, 2015).

No Brasil, não há fracionamento para a coleta individualizada das águas negras e das águas cinzas, porém há muitos argumentos a favor da segregação desses resíduos. A separação dos dois tipos de efluente auxiliaria no tratamento de modo que seria possível diferir os processos realizados, ou seja, poderiam dividir os tipos de água e tratá-las para serem reutilizadas para determinado propósito. Além disso, como a água negra, que exige mais procedimentos de tratamento, estaria em menor volume, o tratamento teria então menos

custos quando comparado a tratar um grande volume de esgoto (ALVES *et al.*, 2015; BERTONCINI, 2008; GALBIATI, 2009; ZEEMAN *et al.*, 2008).

A água negra possui alta carga orgânica e concentração elevada de nitrogênio e fósforo provenientes das fezes. Seu tratamento pode ser feito primeiramente com reatores anaeróbios, uma vez que removem a carga orgânica, produzindo biogás que pode ser utilizado no próprio sistema de tratamento, reduzindo custos. Porém, como já mencionado, devido à grande quantidade de nutrientes um pós-tratamento faz-se necessário, e a utilização de FBRs tem-se mostrado eficiente nesse sentido (BERTONCINI, 2008; GALBIATI, 2009; SINGH & SHARMA, 2012), já que as algas cultivadas nesses reatores podem retirar os nutrientes do efluente, utilizando-os para o seu crescimento, possibilitando assim a recuperação desses compostos a partir da biomassa gerada e minimizando presença desses contaminantes nos corpos hídricos (ASLAN e KAPDAN, 2006; ISOLDI *et al.*, 2005; PEREIRA, 2016; RUIZ-MARIN *et al.*, 2010).

3.3 PRESENÇA DE PATÓGENOS E RESISTÊNCIA À ANTIMICROBIANOS EM ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DE EFLUENTES

Em sistemas de tratamento de esgoto há uma grande preocupação em encontrar novas tecnologias para reduzir a quantidade de microrganismos nos efluentes tratados. Nesse sentido, os diferentes processos de desinfecção atuam diminuindo a contagem total de microrganismos, porém, muitas vezes, as condições da própria estação de tratamento de efluentes (ETE) favorecem o domínio de cepas resistentes mesmo após o tratamento (BOUKI *et al.*, 2013; KIM & AGA, 2007).

A resistência microbiana aos antibióticos representa uma grande ameaça à saúde pública e nas últimas décadas discussões e pesquisas relacionadas à área têm tomado grandes proporções, sendo reconhecida por organizações de saúde como um problema global. A infecção adquirida por organismos que apresentam essa resistência é relacionada a diminuição da qualidade de vida e elevada taxa de recorrência, representando um maior potencial de complicações, piora do estado clínico e morte. Um estudo realizado por Czekalski *et al.* (2012) em Lausanne, na Suíça, relatou um aumento acentuado de cepas extremamente multirresistentes na saída de uma ETE. Esse cenário ressalta a gravidade da situação e a importância que deve ser concedida ao processo de desinfecção, uma vez que a Suíça faz parte dos países com consumo baixo de antibióticos, e o uso indevido destes são evidenciados como uma das maiores causas da emergência crescente de vários organismos

que apresentam resistência a várias classes de antimicrobianos, pela ação da pressão seletiva; (ABDEL-RAOUF *et al.*, 2012; FERRI *et al.*, 2017; RIZZO *et al.*, 2013).

A bactéria *E. coli* faz parte do grupo coliformes e é um grande indicador de contaminação fecal. Com base nos estudos de Watkinson *et al.* (2007) a concentração e resistência à antimicrobianos desta bactéria em pontos associados ao tratamento de efluentes é maior e mais recorrente do que em pontos não associados. Kotlarska *et al.* (2015) investigaram o padrão de resistência de *E. coli* em efluentes de sistemas de tratamento e em águas receptoras do Golfo de Gdansk, na Polônia, e identificaram *integrons*, que são amplamente associados à multirresistência a antibióticos, principalmente para Amoxicilina/Clavulanato (resistência de até 32%) e Trimetoprim/Sulfametoxazol (até 20% de resistência). Os autores sugeriram que essas bactérias associadas a humanos, mesmo potencialmente patogênicas, e bactérias que possuem genes de resistência a antibióticos, conseguem sobreviver nos efluentes e nas águas receptoras dos efluentes, o que facilita muito o aparecimento do fenótipo de multirresistência a antimicrobianos e também a transferência horizontal de genes entre esses microrganismos.

Em uma avaliação realizada por Schmidt & Cardoso (2003) em uma estação de tratamento de dejetos suínos no sul do Brasil, em 20 coletas realizadas para análise foram obtidas 163 amostras confirmadas para *Salmonella* spp., sendo que 161 foram identificadas como *Salmonella typhimurium*, que têm alto risco de disseminação entre animais e humanos. Foi então analisado o índice de resistência à antibióticos, que revelou que 94,5% das amostras coletadas eram resistentes a quatro ou mais antimicrobianos.

O *S. aureus* é um grande problema para a saúde pública por ser responsável por variadas infecções humanas. Essas infecções apresentam dificuldade no tratamento pois muitas vezes a cepa causadora se mostra resistente a um ou até mais antibióticos. Estudos realizados por Goldstein (2012) evidenciaram que 83% das amostras coletadas antes da passagem pelo tratamento de esgoto foram positivas para *S. aureus* resistentes à metilina, evidenciando a importância de um tratamento eficiente de desinfecção, pois mesmo em pouca quantidade, a sobrevivência dessas bactérias ao processo aumenta a possibilidade de apresentarem multirresistência e maior virulência.

Os *Enterococcus* spp. fazem parte da microbiota intestinal dos seres humanos e de outros animais. Mesmo que não sejam tão típicos quanto os outros microrganismos, podem ser patógenos oportunistas e estão muito ligados a infecções nosocomiais. Pesquisas realizadas antes e depois de tratamento de efluentes revelaram uma diminuição de *Enterococcus hirae* e aumento de *Enterococcus faecium*, sugerindo que a resistência ao

antibiótico ciprofloxacina três vezes maior em efluentes tratados em relação aos não tratados pode ser devido a esse aumento. Sendo assim, o tratamento de efluentes utilizado (que se baseia em processos com lodo ativado) se mostrou não eficiente na eliminação de *Enterococcus* spp. resistente a antibióticos e apontou a possibilidade desse tratamento ter realizado uma seleção, ocasionando maior sobrevivência de cepas resistentes (SILVA *et al*, 2006).

Os exemplos brevemente citados evidenciam a necessidade de se pensar em sistemas de tratamento de efluentes que realizem uma descontaminação eficiente, pois se não tratados esses efluentes podem acabar contaminando o meio ambiente e causando inúmeras doenças (SCHMIDT & CARDOSO, 2003).

4 METODOLOGIA

A metodologia do presente estudo é descrita no presente tópico e está representada no fluxograma abaixo (Figura 1) para acompanhamento de etapas.

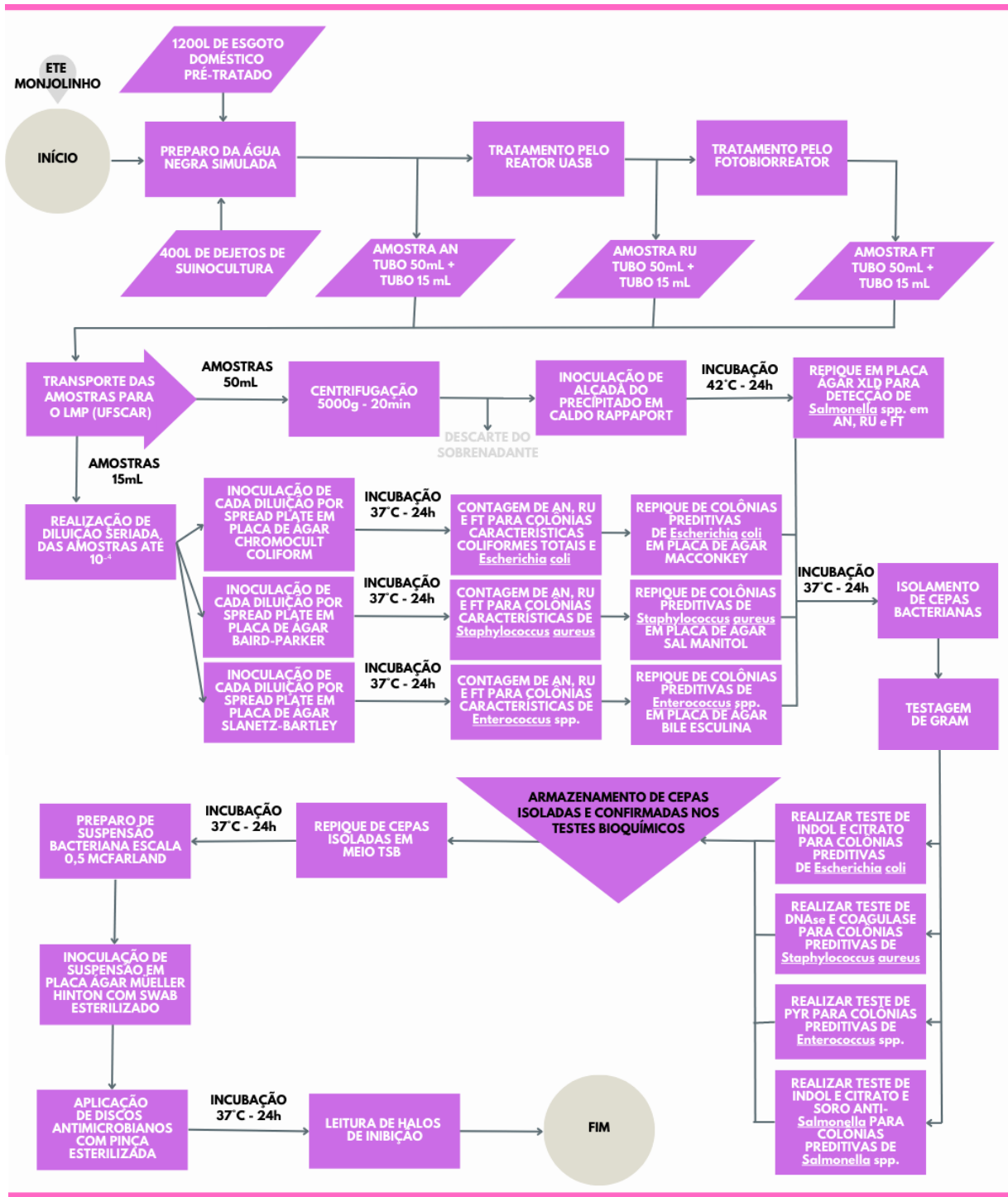


Figura 1 - Fluxograma das etapas realizadas no presente estudo.
Fonte: Elaborada pelo autor.

4.1 INSTALAÇÃO EXPERIMENTAL

As unidades componentes da instalação experimental de onde as amostras eram coletadas para análise foram construídas e montadas nas dependências da Estação de Tratamento de Esgoto Monjolinho (São Carlos – SP), e estão esquematicamente representadas na Figura 2.

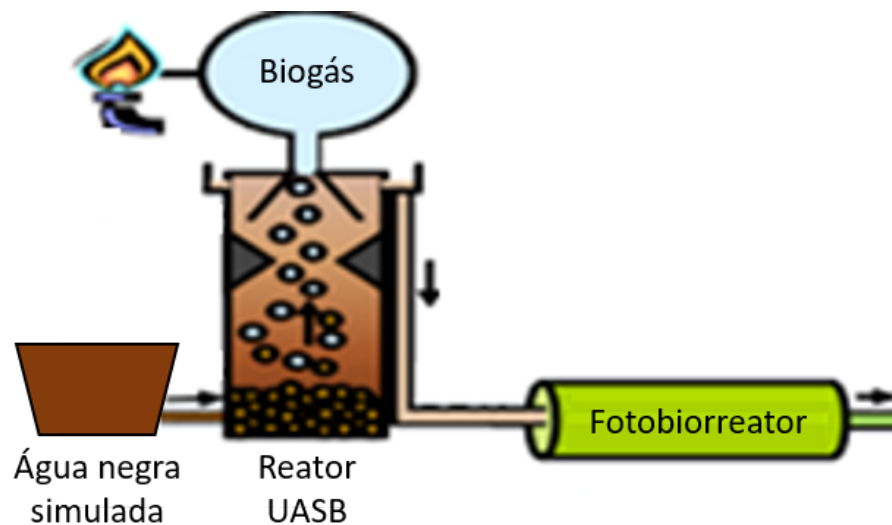


Figura 2 - Modelo esquemático da instalação experimental para tratamento de água negra simulada.
Fonte: Ferrer *et al.* (2017)

Em resumo, os processos esquematizados na Figura 2 revelam que a água negra simulada foi tratada inicialmente em reator UASB e que o efluente deste reator se encaminhou para o fotobiorreator tubular. A água negra foi simulada por meio de uma mistura de 1200 L de esgoto sanitário após tratamento preliminar (remoção de sólidos grosseiros, areia e gordura) fornecido pela ETE Monjolinho e 400 L de dejetos de suinocultura fornecidos pela Fazenda Santo Inácio de Loyola, em Brotas – SP. Essa mistura era preparada toda segunda-feira pela manhã e permanecia sob agitação rotacional (Figura 3a), em temperatura ambiente, durante toda semana para alimentar o reator UASB, como descrito a seguir. O reator UASB (Figura 3b) foi construído em resina estruturada com fibra de vidro, tendo diâmetro interno de 0,45 m e altura útil de 4,0 m. A temperatura foi mantida em 25 ± 1 °C. O fotobiorreator utilizado foi do tipo tubular (Figura 3c), construído em PVC rígido transparente de 50 mm de diâmetro, com a capacidade de 211 L de volume, mantido a céu

aberto, sob iluminação natural filtrada apenas por uma tela de sombrite (20%) e temperatura ambiente.



Figura 3 - Compartimentos do sistema de tratamento analisados no trabalho: (a) água negra simulada; (b) efluente do reator UASB e (c) efluente do fotobiorreator tubular.

Fonte: Sueitt (2019).

Dois experimentos foram realizados: Experimento I (com nove coletas – 08/2018 a 10/2018) e Experimento II (com oito coletas – 03/2019 a 06/2019), totalizando 51 amostras coletadas (17 de cada estágio de tratamento). No primeiro experimento, a bolsista ainda estava sendo treinada no laboratório, sem bolsa. Apenas o segundo experimento corresponde ao experimento contemplado pela bolsa de Iniciação Científica FAPESP. É importante ressaltar que esse sistema de tratamento piloto foi desenvolvido para um projeto de pós-doutorado intitulado “Remoção de nutrientes em fotobiorreator tubular alimentado com efluente de reator UASB tratando água negra” também financiado pela FAPESP (Processo FAPESP: 2015/02073-0). O presente estudo contribuiu como parte complementar ao projeto citado.

4.2 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

As análises microbiológicas realizadas, bem como os testes adicionais (item 4.3) para identificação bioquímica e antibiograma (item 4.4) para a realização do perfil de resistência dos microrganismos de interesse foram realizadas nas dependências do Laboratório de Microbiologia e Parasitologia (LMP), do Departamento de Morfologia e Patologia da Universidade Federal de São Carlos, *Campus* São Carlos. Foram seguidas as técnicas clássicas da microbiologia apresentadas por Koneman *et al.* (2001), ANVISA (2004) e Murray *et al.* (2007).

4.2.1 Amostragem e preparo do material para análise

As amostras foram coletadas semanalmente de três pontos do sistema de tratamento: antes do reator UASB (água negra simulada – AN), depois do reator UASB (água negra anaerobicamente digerida – RU) e depois do fotobiorreator tubular (efluente final – FT). Amostras de 50 mL de cada ponto foram coletadas e colocadas em tubos esterilizados e então submetidas à centrifugação em 5000 g por 20 minutos. A partir disso, descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi utilizado para a detecção de *Salmonella* spp. (Figura 4).

Outras amostras (15 mL) de cada um dos pontos anteriormente citados foram também coletadas em tubos esterilizados para a realização das diluições para contagem e isolamento de coliformes totais, *E. coli*, *S. aureus* e *Enterococcus* spp. O plaqueamento das diluições foi feito pela técnica de “spread plate”. Nesta técnica, a amostra bruta (10^0) foi homogeneizada e submetida a diluições decimais (até 10^{-4}) em solução salina tamponada 0,9% (PBS) e então, cada diluição foi inoculada no meio específico para cada bactéria de interesse. O volume de 100 μ L foi inoculado e difundido no meio com auxílio de alças de Drigalski esterilizadas (Figura 5).

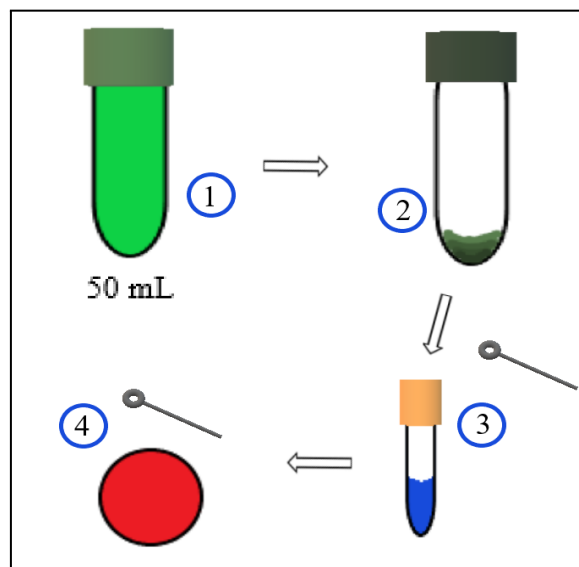


Figura 4 - Ilustração representativa da análise microbiológica para detecção de *Salmonella* spp. (1) Uma alíquota de 50 mL foi submetida à centrifugação; (2) O sobrenadante foi descartado, ficando apenas com o precipitado; (3) Uma alçada do precipitado foi inoculada em caldo Rappaport e incubada a 42°C por 24 horas; (4) Repique a partir do caldo em Ágar Xilose-Lisina-Desoxicolato e incubação a 37°C por 24 horas para detecção de *Salmonella* spp.

Fonte: elaborada pelo autor.

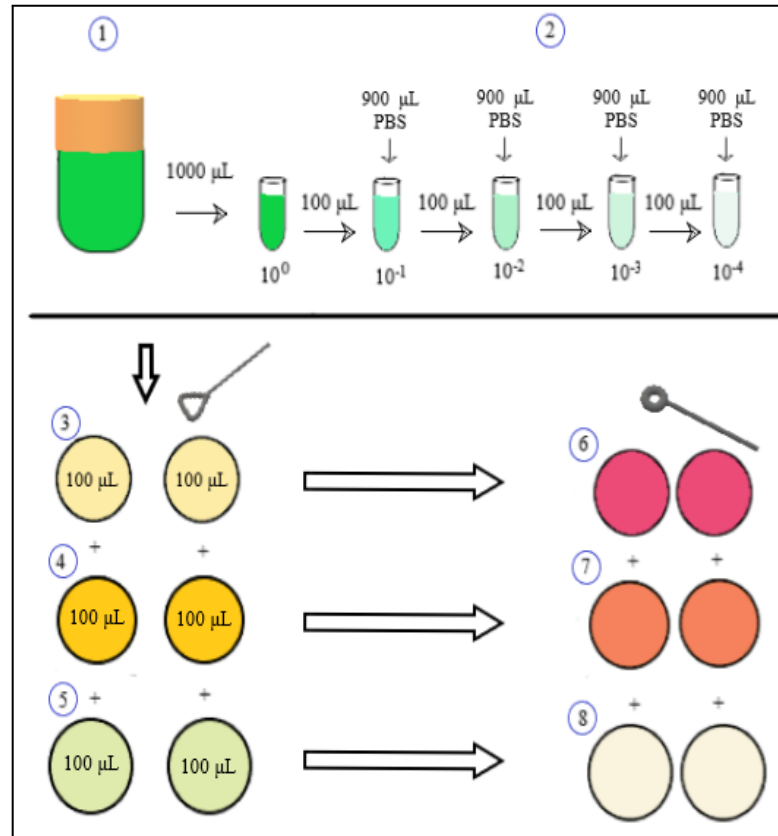


Figura 5 - Ilustração representativa da análise microbiológica para contagem de unidades formadoras de colônias. (1) Uma alíquota de 1000 µL da amostra de 15 mL foi aplicada em um tubo vazio para facilitar a manipulação, sendo então a amostra 10^0 ; (2) Diluição seriada até 10^{-4} ; Inoculação de todas as diluições nos meios Ágar Chromocult (3), Ágar Baird-Parker (4) e Ágar Slanetz Bartley (5); (6) Repique em Ágar MacConkey para isolamento de colônias características de *E. coli* encontradas em (3); (7) Repique em Ágar Sal Manitol para isolamento de colônias características de *S. aureus* encontradas em (4); (8) Repique em Ágar Bile Esculina para isolamento de colônias características de *Enterococcus* spp. encontradas em (5).

Fonte: elaborada pelo autor.

4.2.2 Contagem de coliformes totais e isolamento de *Escherichia coli*

Para a contagem de coliformes totais e isolamento de *E. coli*, as diluições foram inoculadas em Chromocult Coliform Agar (Merck). As placas ficaram incubadas a 37 °C até completar 24 horas de incubação.

Passado esse período, foi realizada a contagem de coliformes totais e fecais nas placas contendo de 30 a 300 colônias. Após essa contagem, 5-10 colônias suspeitas de *E. coli* selecionadas foram estriadas em Ágar MacConkey (Oxoid), com o auxílio da alça bacteriológica de platina esterilizada. As placas ficaram incubadas à 37 °C pelo período de 24 horas. Confirmando as características de crescimento em Ágar MacConkey, as amostras isoladas foram submetidas aos testes adicionais de Gram (item 4.3.1), indol (item 4.3.2) e citrato (item 4.3.3).

4.2.3 Contagem e isolamento de *Staphylococcus aureus*

Para a contagem e isolamento de *S. aureus* as diluições foram inoculadas em placas com Ágar Baird-Parker (Oxoid). A incubação ocorreu a 37 °C por 24 horas, e subsequentemente foi feita a contagem, assim, 5-10 colônias suspeitas foram estriadas em placas de Ágar Sal Manitol (Oxoid). Colônias manitol positivas foram submetidas a testes adicionais de Gram (item 4.3.1), DNase (item 4.3.4) e coagulase (item 4.3.5).

Devido à dificuldade de isolamento detalhado no item 5.2.3 adiante, no Experimento II, foi também utilizado o meio Ágar Vogel Johnson (Merck), outro meio seletivo e diferencial considerado muito eficiente para *S. aureus*. Esse meio foi utilizado seguindo o procedimento padrão realizado com o meio Ágar Baird-Parker (Oxoid) explicado no item 4.2.1 e ilustrado na Figura 5.

4.2.4 Contagem e isolamento de *Enterococcus* spp.

Para a contagem e isolamento de *Enterococcus* spp. as diluições foram inoculadas em meio Ágar Slanetz Bartley (Base m-Enterococos - Kasvi). A incubação ocorreu por 24 horas a 37 °C. Após a contagem, 5-10 colônias suspeitas de *Enterococcus* spp. selecionadas foram estriadas em Ágar Bile Esculina (Acumedia), com o auxílio da alça bacteriológica de platina esterilizada. As placas ficaram incubadas à 37 °C pelo período de 24 horas. Confirmando as características de crescimento em Ágar Bile Esculina, as amostras isoladas foram submetidas aos testes adicionais de testes adicionais de Gram (item 4.3.1) e PYR (item 4.3.6).

4.2.5 Detecção e isolamento de *Salmonella* spp.

Uma alçada do pellet formado após a centrifugação foi inoculada em caldo Rappaport-Vassiliadis (Oxoid), que é um meio de enriquecimento para *Salmonella* spp. e inibitório para a microbiota acompanhante. A amostra ficou incubada a 42 °C por 24 horas.

Subsequente a este tratamento, a amostra foi estriada em meio Ágar Xilose-Lisina-Desoxicolato (XLD – Oxoid) com alça bacteriológica de platina, e incubada a 37 °C por 24 horas. Passado esse período, cinco colônias escolhidas que indicaram *Salmonella* spp. foram inoculadas e incubadas novamente em meio XLD, para o melhor isolamento da amostra. Após a identificação característica de *Salmonella* spp. no meio, as

colônias foram utilizadas para a realização dos testes adicionais de Gram (item 4.3.1), indol (item 4.3.2), citrato (item 4.3.3) e soro anti-*Salmonella* (item 4.3.7).

4.3 TESTES ADICIONAIS

Na Tabela 1, estão expostos todos os testes adicionais realizados para confirmação e o resultado padrão esperado para cada uma das bactérias estudadas. Estes testes são explicados para melhor entendimento em subtópicos deste item 4.3.

Tabela 1: Resultados esperados para confirmação nos testes adicionais dos microrganismos estudados.

Bactéria	Indol	Citrato	DNase	Coagulase	Soro anti- <i>Salmonella</i>	PYR	Gram
<i>Escherichia coli</i>	+	-					Bacilo (-)
<i>Enterococcus</i> spp.						+	Coco (+)
<i>Salmonella</i> spp.	-	+			+		Bacilo (-)
<i>Staphylococcus aureus</i>			+	+			Estafilococo (+)

4.3.1 Coloração de Gram

O método de coloração de Gram permitiu que as bactérias fossem diferenciadas com base em diferenças nas propriedades químicas e físicas da parede celular. O procedimento consistiu em tratar sucessivamente um esfregaço bacteriano, fixado pelo calor, com os reagentes cristal violeta, lugol, etanol 95% e fucsina básica. As bactérias que adquiriram a coloração azul violeta são Gram-positivas (+) e aquelas que adquiriram a coloração vermelha são Gram-negativas (-) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1997)

4.3.2 Teste de indol

O teste se baseia na identificação da produção de indol pelo uso de reativo de Kovacs. Assim, as colônias suspeitas foram inoculadas em meio Tryptic Soy Broth (TSB – Oxoid) a 37 °C por 24 horas, e então foi adicionada uma gota do reativo para verificar o aparecimento de coloração avermelhada, que indica “Indol +”.

4.3.3 Teste de citrato

Este teste prova a capacidade dos isolados em utilizar citrato de sódio como única fonte de carbono. As amostras foram inoculadas em tubos de ensaio contendo o meio Ágar Citrato de Simmons (Difco) e incubadas à 37 °C por 24 horas. A coloração azul indica a capacidade de utilizar o citrato, enquanto a coloração verde, que é a inicial, remete a um resultado negativo.

4.3.4 Teste de DNase

Como um teste adicional para diferenciar *S. aureus* das demais espécies desse gênero, o teste foi realizado com o repique das colônias em placa com Ágar DNase (Oxoid) e incubação por 24 horas a 37 °C. A seguir, a superfície da placa foi recoberta com ácido clorídrico em solução 1N. Aguardou-se 10 minutos antes da leitura de halos em volta das colônias, que indica hidrólise de DNA.

4.3.5 Teste de coagulase

Realizado com colônias que apresentaram resultado positivo para o teste de DNase. A enzima coagulase tem a capacidade de converter fibrinogênio em fibrina e é um bom indicador da patogenicidade da bactéria. Para a realização do teste, o plasma de coelho (Laborclin) foi distribuído em tubos após a adição de água destilada esterilizada. As culturas foram inoculadas no plasma e incubadas a 37 °C. A presença de coágulos foi verificada de 4 a 24 horas após a inoculação.

4.3.6 Teste PYR

A prova de hidrólise PYR é um teste enzimático que consiste na hidrólise do substrato L-pyrrolidonyl-alfa-naftylamide por uma enzima bacteriana, a L-pyroglutamyl-aminopeptidase. A hidrólise do substrato libera β -naphtylamide, que é detectada com a adição do reagente, o N,N-dimetilaminocinamaldeído, que forma uma base de Schiff, de coloração vermelha. Os testes foram realizados utilizando o kit DrySlide PYR (InterLab) de acordo com as recomendações do fabricante.

4.3.7 Teste de soro anti-*Salmonella*

Das colônias isoladas características de *Salmonella* spp. já testadas em indol e citrato, foram escolhidas cinco para o teste com soro Anti-*Salmonella* somático-flagelar (Probac) para a verificação de aglutinação. Para a realização do teste foi necessária uma lâmina limpa, uma cultura bacteriana de 24 horas, preferencialmente, e solução salina 0,9%. Na superfície da lâmina e com o auxílio da alça de platina esterilizada, foi feita uma suspensão bacteriana espessa pela emulsão da cultura e da salina. Foi então colocado o soro Anti-*Salmonella* somático-flagelar e homogeneizado com a suspensão. Em seguida, a lâmina foi mantida em constante movimento por 1 a 2 minutos, para a obtenção do resultado. A aglutinação pôde ser vista após esse procedimento a olho nu e também foi feita confirmação pela visualização no microscópio óptico.

4.4 ANTIBIOGRAMA

Para testar a sensibilidade a antimicrobianos, foi utilizado o método de disco-difusão em ágar, sendo aplicado apenas nos isolados confirmados bioquimicamente pelos testes adicionais de *E. coli*, *Salmonella* spp. e *Enterococcus* spp. Não houveram isolados confirmados para *S. aureus* e, portanto, o perfil de sensibilidade não foi feito para essa bactéria.

Os antibióticos utilizados para *E. coli* foram: Amoxicilina/Ácido Clavulânico 20/10µg (AMC); Ampicilina 10µg (AMP); Cefepime 30µg (CPM); Cefotaxima 30µg (CTX); Cefoxitina 30µg (CFO); Ciprofloxacina 5µg (CIP); Cloranfenicol 30µg (CLO); Gentamicina 10µg (GEN); Levofloxacina 5µg(LVX); Meropenem 10µg (MER); Nitrofurantoína 300µg (NIT); Sulfazotrim 25µg (SUT); Tetraciclina 30µg (TET). Já os utilizados para *Salmonella* spp. foram: Amoxicilina/Ácido Clavulânico 20/10µg (AMC); Ampicilina 10µg (AMP); Cefepime 30µg (CPM); Cefotaxima 30µg (CTX); Ciprofloxacina 5µg (CIP); Cloranfenicol 30µg (CLO); Meropenem 10µg (MER); Nitrofurantoína 300µg (NIT); Sulfazotrim 25µg (SUT); Tetraciclina 30µg (TET) (Manual de Antibiograma *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2018) – Grupo *Enterobacteriaceae*).

Por último, os antibióticos utilizados para *Enterococcus* spp. foram: Ampicilina 10µg (AMP); Ciprofloxacina 5µg (CIP); Cloranfenicol 30µg (CLO); Estreptomicina 300µg (EST); Levofloxacina 5µg(LVX); Nitrofurantoína 300µg (NIT);

Tetraciclina 30 μ g (TET) (Manual de Antibiograma *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2020) – *Enterococcus* spp.).

As colônias isoladas foram repicadas em tubos contendo meio TSB e incubadas a 37 °C por 24 horas. A partir dessa amostra, utilizou-se pipetas pasteur estéreis a fim de gotejar a cultura em novos tubos contendo PBS 0,9% até que a suspensão bacteriana atingisse a escala 0,5 de McFarland. Realizado o ajuste, a suspensão foi inoculada em placas de Petri contendo meio Ágar Müeller Hinton (Oxoid) com a utilização de swabs esterilizados. Com a ajuda de bico de bunsen e uma pinça esterilizada, e em ambiente também esterilizado, foram colocados os discos de antibióticos (Laborclin) sobre a superfície do ágar. A incubação foi feita em temperatura de 37 °C por 24 horas (NCCLS, 2003).

Após o tempo requerido, seguiu-se a leitura dos diâmetros dos halos de inibição para cada antibiótico, sendo anotados em milímetros. As medidas foram comparadas com os Manuais de Antibiograma CLSI, que contém medidas referenciais a fim de se concluir se o microrganismo é resistente, intermediário ou susceptível (CLSI, 2018; CLSI, 2020; NCCLS, 2003). Esse processo foi ilustrado na Figura 6.

Finalizando, foi utilizado o índice MAR (Múltipla Resistência a Antimicrobianos) para apontar a multirresistência dos microrganismos estudados. O cálculo para o índice apresenta-se em duas formas: 1) individual, em que o valor é obtido a partir da divisão do número de antibióticos a que o microrganismo foi resistente pelo número total de antibióticos testados; e 2) forma utilizada para várias amostras, em que o número de antibióticos a que as bactérias foram resistentes é dividido pelo produto do total de antibióticos testados e o número de amostras testadas (KRUMPERMAN, 1983).

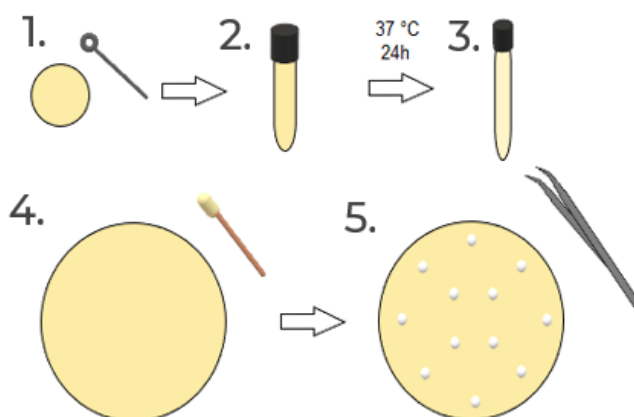


Figura 6 - Ilustração representativa da realização do Antibiograma. (1) Repique da cepa isolada em meio TSB; (2) Incubação a 37°C por 24 horas; (3) Suspensão bacteriana escala 0,5 McFarland; (4) Inoculação da suspensão em placa Ágar Müeller Hinton com swabs esterilizados; e (5) Aplicação dos discos antimicrobianos utilizando pinça esterilizada e incubação a 37°C por 24 horas.

Fonte: elaborada pelo autor.

4.5 CONTROLE DE QUALIDADE

No decorrer da realização dos experimentos foram utilizadas cepas padrão (ATCC), portanto, a cada lote de análises, as cepas foram repicadas em meios seletivos e diferenciais, submetidas aos testes bioquímicos e ao antibiograma, sendo então utilizados como controle de qualidade dos testes e procedimentos realizados.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados referentes ao Experimento I de coleta e análise estão identificados como ANa, RUa e FTa, sendo que os números de 1 a 9 representam as semanas de coleta. Os resultados referentes ao Experimento II estão identificados como ANb, RUB e FTb, e os números de 1 a 8 representam as semanas de coleta.

5.1 COMPARAÇÃO ENTRE A OCORRÊNCIA E REMOÇÃO DE BACTÉRIAS NOS DOIS EXPERIMENTOS

5.1.1 Experimento I

A Figura 7 apresenta os dados de concentração de bactérias de interesse em log UFC/mL para todas as amostras coletadas durante o primeiro experimento, e a Figura 8 apresenta os dados médios de contagem desse experimento.

Analisando os valores médios de contagem, observou-se uma redução de 92,8 e 99,4% no número de coliformes totais (CT) em RUa e FTa, respectivamente, quando comparado à concentração de AN. Se comparado ao RUa, a redução observada em FTa foi de 91,2%. Para os coliformes fecais – *E. coli* (CF), houve redução de 93,1% (RUa) e 99,4% (FTa), e de RUa para FTa foi de 85,1%. Para *Enterococcus* spp. (ENT) a redução foi de 93,1% (RUa) e 99,0% (FTa) a partir de ANa, e uma redução de 94,5% em FTa a partir de RUa. Dessa forma, condensando em uma média geral de todos os microrganismos estudados, foi observada uma redução de 93,4% no número de bactérias após a água negra passar pelo reator UASB, e uma redução de 99,3% quando o efluente do reator UASB foi tratado no fotobiorreator tubular, sendo essa uma redução de 92,6% a partir de RUa.

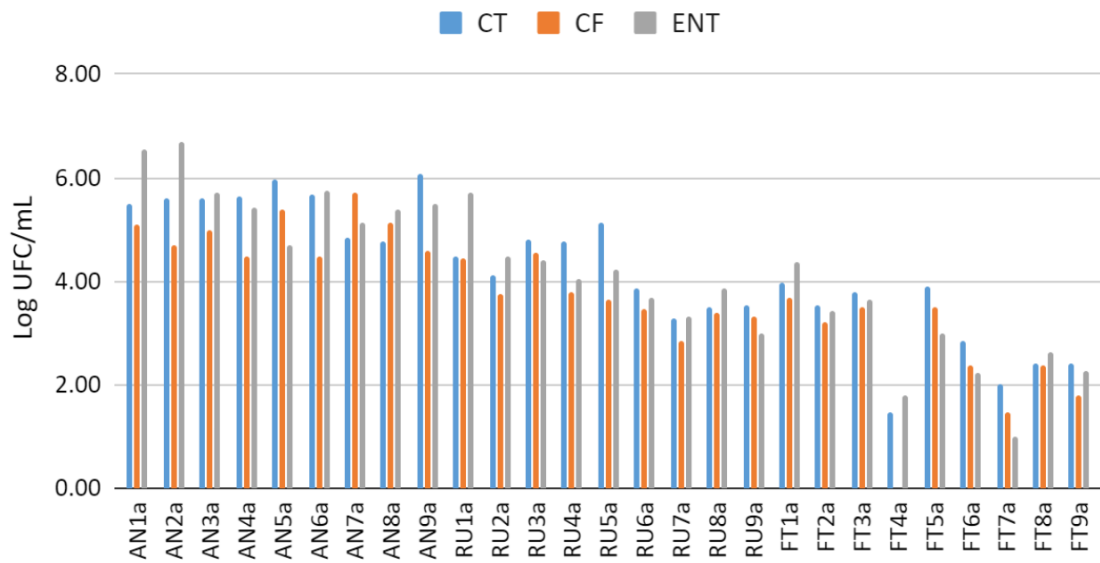


Figura 7 - Concentração em log UFC/mL de coliformes totais (CT), coliformes fecais – *E. coli* (CF) e *Enterococcus* spp. (ENT) em amostras de sistema de tratamento de água negra simulada. Experimento I (a). AN: água negra simulada; RU: efluente do reator UASB; FT: efluente do fotobiorreator tubular. Os números de 1 a 9 representam as semanas de coleta.

Fonte: elaborada pelo autor.

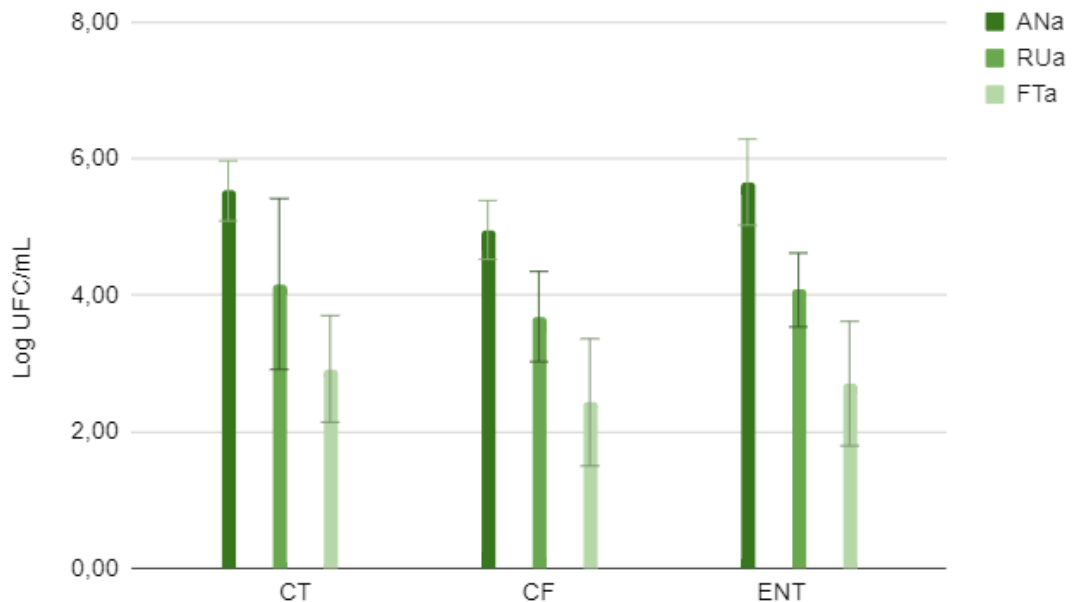


Figura 8 - Concentração média (log UFC/mL) de coliformes totais (CT), coliformes fecais – *E. coli* (CF) e *Enterococcus* spp. (ENT) em nove amostras de sistema de tratamento de água negra simulada. Experimento I (a). AN: água negra simulada; RU: efluente do reator UASB; FT: efluente do fotobiorreator tubular. A barra de erros corresponde ao desvio-padrão.

Fonte: elaborada pelo autor.

5.1.2 Experimento II

A Figura 9 apresenta os dados de concentração de bactérias de interesse em log UFC/mL para todas as amostras coletadas durante o segundo experimento, e a Figura 10 apresenta os dados médios de contagem desse experimento.

A partir das concentrações médias de contagem das amostras, para os coliformes totais (CT), as amostras de RUB apresentaram uma redução de 96,5%, enquanto as amostras de FTb tiveram uma redução de 99,5% em relação à ANb e de 84,8% em relação à RUB. Para os coliformes fecais - *E. coli* (CF), as reduções foram de 72,6% em RUB e de 98,3% e 93,9% em FTb a partir de ANb e RUB, respectivamente. Para *Enterococcus* spp. as reduções foram de 97,2% em RUB e de 99,8% e 92,9% em FTb, a partir de ANb e RUB, respectivamente. Condensando em uma média geral de todos os microrganismos estudados, foi observada uma redução de 88,8% após a passagem pelo reator UASB e de 99,2% após a passagem pelo fotobiorreator tubular a partir de ANb, e de 90,5% a partir de RUB..

Incorporando os dados dos experimentos I e II, a redução geral da média observada no efluente UASB foi de 91,1%, e no efluente do fotobiorreator foi de 99,3% a partir da água negra e de 91,6% a partir do efluente do UASB.

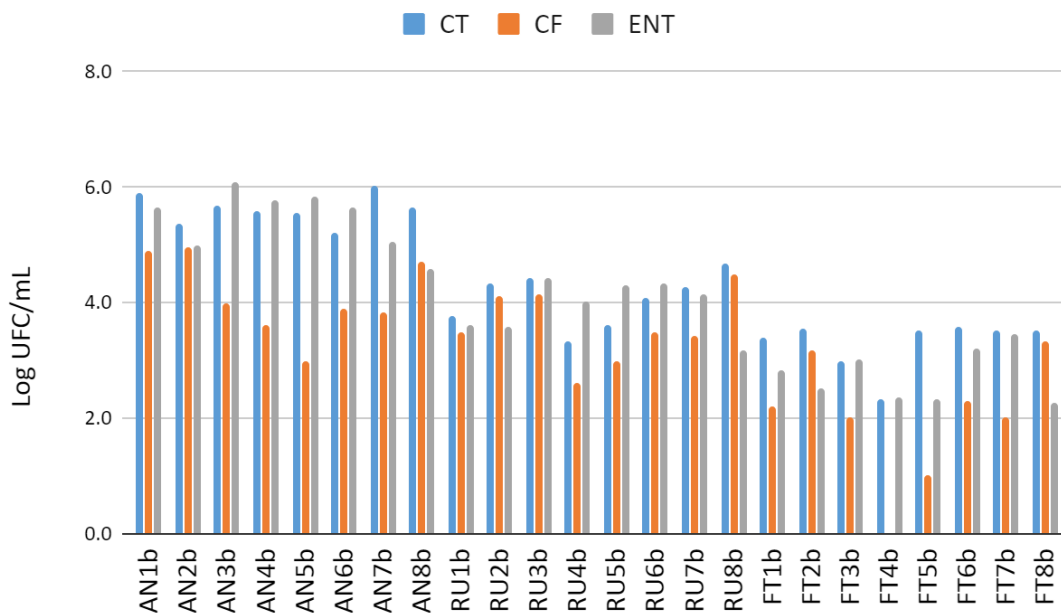


Figura 9 - Concentração em log UFC/mL de coliformes totais (CT), coliformes fecais – *E. coli* (CF) e *Enterococcus* spp. (ENT) em amostras de sistema de tratamento de água negra simulada. Experimento II (b). AN: água negra simulada; RU: efluente do reator UASB; FT: efluente do fotobiorreator tubular. Os números de 1 a 8 representam as semanas de coleta.

Fonte: elaborada pelo autor.

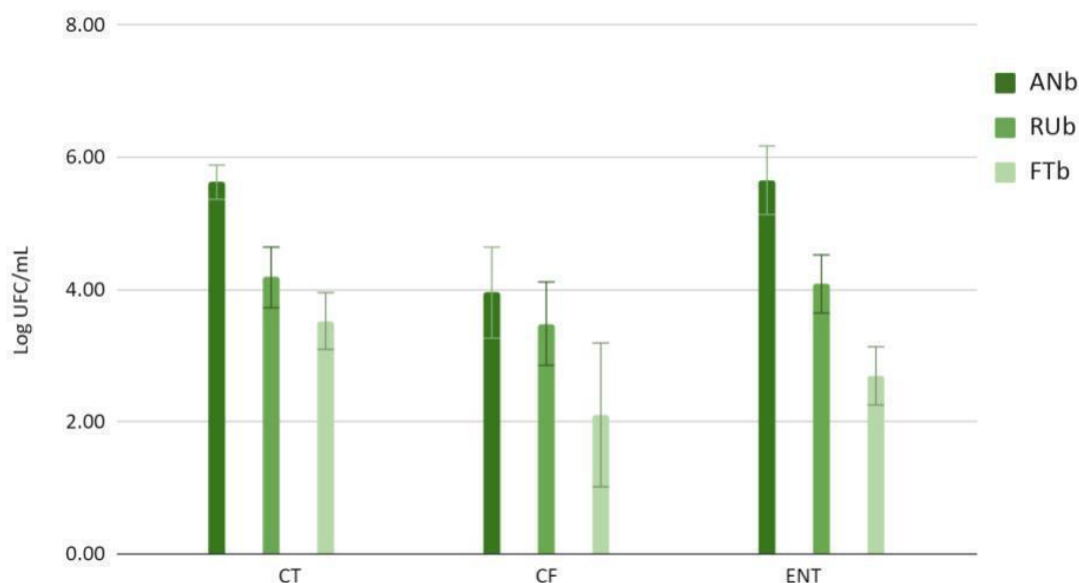


Figura 10 - Concentração média (log UFC/mL) de coliformes totais (CT), coliformes fecais – *E. coli* (CF) e *Enterococcus* spp. (ENT) em oito amostras de sistema de tratamento de água negra simulada. Experimento II (b). AN: água negra simulada; RU: efluente do reator UASB; FT: efluente do fotobiorreator tubular. A barra de erros corresponde ao desvio-padrão.

Fonte: elaborada pelo autor.

5.1.3 Considerações e discussões sobre a ocorrência e remoção de bactérias nos dois experimentos realizados

Analisando os resultados apresentados, fica evidente que, nos dois experimentos realizados, houve uma diminuição da carga microbiana quando a água negra simulada foi tratada no reator UASB e, subsequentemente, no fotobiorreator tubular.

Outro ponto importante a ser destacado é que o desvio-padrão para as contagens foi relativamente alto nos dois experimentos e todos os grupos bacterianos estudados (Figuras 6 e 8), principalmente nas amostras AN e FT. Uma justificativa para isso é que as amostras de água negra simulada (AN) correspondem a uma mistura de esgoto sanitário com dejetos suínos (ver item 4.1), que não apresenta sempre a mesma composição química e microbiana. Ademais, o tratamento no reator UASB (RU) é mais controlado, pois se mantém em uma certa temperatura, porém, o tratamento no fotobiorreator tubular (FT) operado ao ar livre é totalmente suscetível às mudanças climáticas, esclarecendo então o porquê de o desvio-padrão das amostras de FT ser ainda mais acentuado.

A redução de carga microbiológica observada no RU pode ser fundamentada na própria natureza do tratamento, que trata efluentes de alta carga orgânica através de um metabolismo anaeróbico com consórcios microbianos com bactérias fermentativas,

acidogênicas, acetogênicas, metanogênicas e redutoras de sulfato. Esse metabolismo por sua vez, é um grande responsável pela degradação de compostos e redução de carga microbiana aeróbia ou facultativa, sendo destacado a formação de sulfeto de hidrogênio que favorece essa redução. Todavia, os estudos realizados com o reator UASB ainda apontam a necessidade de um pós-tratamento que ajudaria, tanto na redução mais acentuada da carga microbiana mas, principalmente, para a retirada de alguns nutrientes que continuam no efluente, como nitrogênio e fósforo, que podem ser muito prejudiciais às áreas que recebem o efluente, causando eutrofização (ARENA *et al.*, 2005; CERVANTES–ZEPEDA *et al.*, 2011).

Com relação às amostras de RU, ainda que a porcentagem de redução de coliformes no Experimento II tenha sido menor do que no Experimento I, considerando os dois experimentos houve uma redução de 94,5% (CT) e de 89,7%. (CF). Averiguando outros dados sobre a desinfecção proporcionada pelo tratamento em reatores UASB, Tawfik *et al.* (2008) relatou uma redução de 91,6% de coliformes totais e 87,5% de coliformes fecais, porcentagens similares às encontradas no presente estudo.

Korzeniewska & Harnisz (2013) estudaram a ocorrência de espécies com fenótipo β -Lactamase de espectro estendido da família *Enterobacteriaceae* (família que representa uma grande parte da microbiota em águas residuárias, incluindo *E. coli*) em afluentes e efluentes da ETE de Olsztyn, Polônia. Das 28 amostras de afluente coletadas pelos autores, 21 amostras foram positivas para *E. coli* (75%), uma amostra apresentou *Enterobacter asburiae* (3,6%), uma amostra apresentou *Citrobacter freundii* (3,6%), uma amostra apresentou *Klebsiella pneumoniae* (3,6%), uma amostra apresentou *Klebsiella oxytoca* (3,6%), uma amostra apresentou *Kluyvera cryocrescens* (3,6%), uma amostra apresentou *Raoultella planticola* (3,6%) e uma amostra apresentou *Yersinia enterocolitica* (3,6%). Já no efluente, das 15 amostras coletadas, 14 apresentaram *E. coli* (93%) e uma apresentou de *Shigella boydii* (6,7%). Os microrganismos *Enterobacter asburiae*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae* e *Klebsiella oxytoca* fazem parte do grupo de coliformes totais, porém, não compõem os coliformes fecais. Considerando isso, individualmente, a porcentagem destes em relação ao total de amostras não passou de 3,6%. Uma explicação plausível em relação a isso é que *E. coli*, que é coliforme fecal e já se apresentava em alta concentração, teve sua carga microbiana reduzida pelo tratamento assim como a dos coliformes, contudo, como esses outros microrganismos estavam em minoria eles podem não ter resistido, enquanto a proporção elevada de *E. coli* permitiu uma diminuição de concentração. Consequentemente, é coerente que a porcentagem de *E. coli* nos efluentes em relação a coliformes totais seja bem maior que no afluente.

O fotobiorreator por sua vez também apresentou uma redução de carga microbiana mais acentuada nas contagens. Isso indica que além da capacidade de reduzir a quantidade de matéria orgânica, e em especial a concentração de nutrientes como amônio e fósforo – um dos principais motivos pelo qual é utilizado –, também tem capacidade de diminuir a carga microbiana. De acordo com Krustok *et al.* (2015) e Marchello *et al.* (2015), isso se deve aos próprios consórcios microbianos do reator, entretanto um ponto importante é que esse tratamento também demonstra divergências na eficiência dessa redução dependendo das condições no tratamento, principalmente do pH. Segundo os autores citados anteriormente, o processo de fotossíntese e respiração realizado pelas microalgas, que são responsáveis pela variação de pH e também a concentração de oxigênio, acaba sendo o diferencial para abaixar ainda mais a carga microbiológica após o tratamento anaeróbio no reator UASB. Nesses estudos foram detectados até 99% de redução na contagem de unidades formadoras de colônia de coliformes totais e *E. coli*, que foram utilizadas como referência para a avaliação da eficiência do tratamento.

5.2 MICRORGANISMOS ISOLADOS

5.2.1 *Escherichia coli*

Durante o Experimento I, 562 colônias foram contadas e, destas, 90 (16%) foram isoladas em Ágar MacConkey: 32 amostras de ANa, 32 amostras de RUa e 26 amostras de FTa. Após o isolamento, as bactérias passaram pelo teste de Gram, em que todas as amostras isoladas confirmaram a morfologia de bacilo e o Gram (-). Seguidamente no teste de indol, 59 amostras (66%) confirmaram indol (+), e a partir destas todas resultaram em citrato (-). Assim, do total de amostras isoladas em cada tipo de amostra, 63% foram confirmadas a partir de amostras de ANa (20 amostras); 66% foram confirmadas a partir de amostras de RUa (21 amostras) e 69% foram confirmadas a partir de amostras de FTa (18 amostras).

Já no Experimento II, 344 colônias foram contadas e, dessas, 152 (44%) foram isoladas em Ágar MacConkey: 58 amostras de ANb, 56 amostras de RUB e 34 amostras de FTb. Após o isolamento, as bactérias passaram pelo teste de Gram, no qual todas as amostras isoladas no experimento confirmaram a morfologia de bacilo e o Gram (-). Seguidamente no teste de indol, 123 amostras (81%) confirmaram indol (+), e a partir destas todas resultaram em citrato (-). Assim, do total de amostras isoladas em cada tipo de amostra, 72% foram

confirmadas a partir de amostras de ANb; 84% foram confirmadas a partir de amostras de RUb e 89% foram confirmadas a partir de amostras de FTb.

5.2.2 *Enterococcus* spp.

No decorrer do Experimento I, 904 colônias foram contadas e, destas, 37 (4%) foram isoladas em Ágar Bile Esculina: 11 amostras de ANa, 14 amostras de RUa e 12 amostras de FTa. Após o isolamento, as bactérias passaram pelo teste de Gram, em que todas as amostras isoladas confirmaram a morfologia de coco e o Gram (+). A partir destas colônias foi realizado o teste PYR, que resultou em 33 amostras (89%) confirmadas positivas. Assim, do total de amostras isoladas em cada tipo de amostra, 72% foram confirmadas a partir de amostras de ANa; 93 % foram confirmadas a partir de amostras de RUa e 100 % foram confirmadas a partir de amostras de FTa.

Relativo ao Experimento II, foram contadas 1778 colônias e, dessas, 154 (9%) foram isoladas em Ágar Bile Esculina: 50 amostras de ANb, 57 amostras de RUB e 47 amostras de FTb. Após o isolamento, as bactérias passaram pelo teste de Gram, em que todas as amostras isoladas no experimento confirmaram a morfologia de coco e o Gram (+). A partir destas colônias foi realizado o teste PYR, que resultou em 100% das amostras confirmadas positivas.

As colônias de *Enterococcus* spp. apresentaram a colônia extremamente pequena, dificultando a contagem, porém, afetando majoritariamente o repique, pois muitas vezes, mesmo levando a colônia inteira no repique, não havia um bom crescimento na nova placa. Portanto, foram necessárias várias tentativas para isolar as colônias. Após o isolamento, foi observado a necessidade de uma maior atenção com a manutenção dessas colônias, comparado aos outros microrganismos estudados, necessitando de mais repiques. Essa adversidade em conjunto ao crescimento diminuto da colônia esclarecem a dificuldade maior ainda de obtenção de isolados viáveis para a realização dos testes adicionais e antibiogramas. No Experimento II, com mais experiência adquirida, foi destinado um maior cuidado para o isolamento e armazenamento das amostras, que mesmo ainda apresentando dificuldades, resultou em uma boa melhora com o aumento da quantidade de colônias isoladas para testes e antibiogramas se comparado ao Experimento I.

5.2.3 *Staphylococcus aureus*

No plano inicial de trabalho, era esperado que se conseguisse realizar a contagem e identificação de *S. aureus*, contudo, essa foi a maior dificuldade encontrada durante o desenvolvimento do estudo. Vários problemas foram encontrados: na contagem em Ágar Baird-Parker, as colônias não apresentavam total aparência característica que deveriam ficar no meio. Passando para o meio Ágar Sal Manitol, muitos não apresentaram crescimento, ou então suas características não eram compatíveis. Ao fazer o teste de Gram com os isolados, a morfologia encontrada em muitos eram bacilos, que não correspondia ao desejado, que é estafilococo Gram (+). No Experimento I, após vários repiques, apenas foi conseguido três colônias da amostra AN1. Com essas amostras foi feito o teste de DNase, que foi positivo, porém, quando feito o teste da coagulase, as amostras tiveram um resultado negativo. Assim, mesmo com os dados de contagem, nenhuma amostra foi positiva para *S. aureus*, ou seja, o valor da contagem representa outros estafilococos que não os dessa espécie patogênica.

Tendo em vista que o Experimento I não gerou nenhuma amostra positiva, no Experimento II foi utilizado outro meio para a inoculação, o Ágar Vogel Johnson, que com suas características poderia então gerar um número de contagem com maior veracidade. Foi testado a inoculação da diluição nos meios Ágar Baird-Parker e Ágar Vogel Johnson simultaneamente. Nas oito repetições, nenhuma colônia característica foi observada no Ágar Vogel Johnson, e algumas que cresciam no Ágar Baird-Parker foram diretamente repicadas em Ágar Sal Manitol, que resultou em colônias não características e até ausência de crescimento. Portanto, o Experimento II não resultou em nenhuma contagem para *S. aureus* devido à ausência de isolados.

Entre os estudos encontrados na literatura disponível sobre a presença de *S. aureus* em efluentes, pôde-se encontrar algumas publicações relacionadas. Segundo Nuñez e Moretton (2006), que investigou a presença de *S. aureus* em efluentes de hospitais, foi possível detectar uma concentração de 3×10^4 UFC/100mL de amostra. Essa concentração é consideravelmente grande e representa uma grande preocupação para a saúde pública, entretanto, averiguando os materiais e métodos utilizados foi notado que para a identificação do microrganismo apenas foi utilizado o meio Ágar Sal Manitol. Como descrito acima, no presente estudo, algumas colônias até apresentaram um comportamento condizente ao de *S. aureus* nesse mesmo meio, porém no teste de coagulase, apenas o controle apresentou um resultado positivo. Ainda assim, a contagem realizada no trabalho citado ainda é notavelmente

superior à quantidade de amostras que foram encontradas nesse trabalho, então foi pesquisado outros trabalhos relacionados.

Gómez *et al.* (2016), que avaliou a presença do microrganismo em afluentes e efluentes de dois sistemas de tratamento registrou que, a partir de 16 amostras, 13 delas apresentavam a presença de *Staphylococcus* spp. (81%), e tiveram uma concentração de $6,8 \times 10^2$ UFC/mL em afluentes e 8×10^1 UFC/mL em efluentes, contados em meio Ágar Sal Manitol. Uma particularidade observada foi que, a partir de 21 amostras de afluente, três amostras foram detectadas com *S. aureus* (sendo que a metodologia englobava os testes de coloração de Gram, DNase e coagulase, bem como no presente estudo), enquanto 18 amostras eram outros *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos (CoNS), e de 19 amostras de efluentes, foram cinco foram *S. aureus* e 14 CoNS. Isso demonstra então uma quantidade consideravelmente inferior de *S. aureus* em relação a outras *Staphylococcus* spp. nas amostras. Entretanto, uma informação significativa foi que, a presença de *S. aureus* só foi observada quando foi realizado um pré-enriquecimento em caldo BHI (*brain heart infusion*) em 6,5% de NaCl incubado a 37°C por 24 a 48h, e só após, inoculado em Ágar Sal Manitol. Portanto, uma explicação da ausência de isolados confirmados é a necessidade de pré-enriquecimento para recuperação de *S. aureus* em meio a outros microrganismos. Um ponto ressaltado foi que, em ambientes estressantes, a população de *S. aureus* tem a capacidade de se encontrar em forma viável porém não-cultivável, estando no ambiente porém não é possível o cultivo em condições de laboratório.

5.2.4 *Salmonella* spp.

Referente às amostras analisadas durante o Experimento I, nove amostras foram presuntivas de *Salmonella* spp. (AN2a, AN4a, AN5a, RU2a, RU5a, FT1a, FT2a, FT3a a FT5a), das quais foram isoladas 23 colônias (7 ANa, 7 RUa e 9 FTa). As colônias isoladas foram submetidas ao teste de Gram, que resultou em bacilo (-) para todas. A partir disso, realizou-se o teste do soro Anti-*Salmonella*, que resultou em 12 amostras positivas (52%). Seguiu-se então para o teste de indol, o qual todos os 12 isolados confirmaram indol (-), característico de *Salmonella* spp., e o teste de citrato, que resultou em nove amostras citrato (+), que representa 39% do total de amostras isoladas - 3 isolados do AN (43%), 4 do RU (57%) e 2 do FT (22%).

Em relação ao Experimento II, 6 amostras foram presuntivas de *Salmonella* spp. (AN2b, AN3b, AN5b, RU5b, RU6b, FT1b), das quais foram isoladas 13 colônias (8 ANb

e 5 RUB). A amostra FT1b apresentou apenas uma colônia presuntiva, porém, esta infelizmente acabou sendo perdida na realização dos repiques para isolamento. As colônias isoladas foram submetidas ao teste de Gram, que resultou em bacilo (-) para todas. A partir disso, realizou-se o teste de indol, no qual todos os 13 isolados confirmaram indol (-) e o teste de citrato, que resultou em 12 amostras citrato (+) que resulta em 92% de amostras confirmadas características de *Salmonella* spp. Com isso, seguiu-se então para o do soro Anti-*Salmonella*, finalizando em 12 amostras positivas (100%). Por fim obteve-se então oito isolados do ANb, com um índice de 100% de confirmação a partir das amostras isoladas e 4 de RUB, com 92% de confirmação.

5.2.5 Considerações e discussões sobre os microrganismos isolados

Analisando os resultados dos testes adicionais confirmativos, é notável uma alta taxa de confirmação de isolados de FT, seguido pelos isolados de RU. Uma explicação plausível para a menor porcentagem de confirmação dos isolados em amostras de AN é que este tem uma alta carga microbiana, pois ainda não sofreu nenhum tratamento. Assim, é presumível que essas amostras apresentem além de *E. coli*, *Enterococcus* spp. e *Salmonella* spp., que são os microrganismos estudados, uma diversidade de outros microrganismos que podem ter várias características semelhantes aos estudados, que pode possibilitar seu crescimento em meios seletivos, mesmo não sendo o desejado. Estes outros microrganismos também podem estar presentes nas amostras de RU e FT, porém, como houve uma diminuição da carga microbiana, é provável que estes não conseguiram afetar tanto o isolamento e confirmação quanto na água negra.

Tendo como exemplo o estudo de Korzeniewska & Harnisz (2013), já discutido no item 5.1.3, fica evidente a diferença de diversidade entre afluente e efluente, podendo então ser justificado a menor taxa de confirmação no afluente, que de fato tinha em sua maioria *E. coli*, porém também contava com outros microrganismos. Mesmo em baixas proporções no estudo citado, os outros microrganismos em conjunto formam 25% do total de amostras no afluente, ou seja, $\frac{1}{4}$ das amostras, enquanto no efluente é apenas 6,7%. Sendo assim, como o efluente apresenta 93% de *Enterobacteriaceae* correspondente a *E. coli*, é muito mais fácil o isolamento deste microrganismo e a confirmação em testes adicionais em comparação ao afluente, que exibe uma maior diversidade. Isso porque essa diversidade gera uma maior possibilidade de isolamento de algumas amostras que apresentam características

parecidas por serem da mesma família, mas acabam não sendo confirmadas nos testes por não serem de fato o microrganismo alvo.

5.3 ANTIBIOGRAMAS

5.3.1 Antibiograma de *Escherichia coli*

Em relação ao Experimento I, foi realizado o antibiograma de 59 amostras de *E. coli*, sendo dessas 20 amostras de ANa (34%), 21 amostras de RUa (36%) e 18 amostras de FTa (30%). Das 20 amostras de ANa, 3 amostras foram resistentes a um antibiótico (15%), 5 amostras foram resistentes a dois antibióticos (25%) e 5 amostras foram resistentes a três ou mais antibióticos (25%), sendo assim, 7 amostras foram sensíveis a todos os antibióticos (35%).

Em relação às 21 amostras de RUa, 4 amostras foram resistentes a um antibiótico (19%), 4 amostras foram resistentes a dois antibióticos (19%) e 3 amostras foram resistentes a três antibióticos (14%), sendo assim, 10 amostras foram sensíveis a todos os antibióticos (48%).

Por fim, o antibiograma com as 18 amostras de FTa resultou em 1 amostra resistente a um antibiótico (6%), 1 amostra resistente a dois antibióticos (6%) e 4 amostras foram resistentes a três ou mais antibióticos (22%), sendo assim, 12 amostras foram sensíveis a todos os antibióticos (67%).

Realizando os cálculos de índice MAR individuais e depois para os conjuntos de amostras temos que ANa teve um índice de 0,14, RUa 0,08 e FTa 0,10. Com a análise dos antibióticos pelos quais as amostras apresentaram resistência, as amostras de RUa apresentaram sempre menor índice MAR, tanto no conjunto todo como individualmente.

Considerando as amostras de ANa, RUa e FTa, nenhuma amostra apresentou resistência aos seguintes antibióticos utilizados: Amoxicilina/Ácido Clavulânico 20/10µg; Cefepime 30µg; Cefoxitina 30µg; Estreptomicina 300µg; Meropenem 10µg; Nitrofurantoína 300µg (o antibiótico Cefotaxima 30µg apenas foi utilizado nas amostras do Experimento II de *E. coli*). Os antimicrobianos pelos quais as amostras foram mais resistentes foram a Tetraciclina 30µg (42,4% de resistência), seguido pela Ampicilina 10µg (35,6%) e Levofloxacinina 5µg (20,3%).

Já o Experimento II resultou em 123 amostras testadas, sendo 41 amostras ANb (33%), 48 amostras RUB (39%) e 34 amostras FTb (28%). De 41 amostras de ANb, 19 foram sensíveis a todos os antibióticos (46%), 2 amostras foram resistentes a um antibiótico (5%), 3 foram resistentes a dois antibióticos (7%), e por fim 17 foram resistentes a três ou mais antibióticos (41%).

Em relação ao RUB, das 48 amostras testadas 20 foram sensíveis a todos os antibióticos (42%), 9 foram resistentes a um antibiótico (19%), 7 foram resistentes a dois antibióticos (15%) e 12 foram resistentes a três ou mais antibióticos (25%).

Por fim, das 34 amostras de FTb, 14 foram sensíveis a todos os antibióticos (41%), 2 foram resistentes a um antibiótico (6%), 9 foram resistentes a dois antibióticos (26%) e 9 foram resistentes a três ou mais antibióticos (26%).

Os cálculos de índices MAR resultaram em um valor de 0,16 para ANb, 0,11 para RUB e 0,13 para FTb. Considerando as amostras de ANb, RUB e FTb, nenhuma amostra apresentou resistência aos seguintes antibióticos utilizados: Amoxicilina/Ácido Clavulânico 20/10µg; Cefoxitina 30µg; Estreptomicina 300µg; Nitrofurantoína 300µg. Os antimicrobianos pelos quais as amostras foram mais resistentes foi a Ampicilina 10µg (43,1% de resistência), seguido por Tetraciclina 30µg (38,2%) e Cloranfenicol 30µg (26,0%). A taxa de resistência em relação a cada antibiótico utilizado em AN, RU e FT dos dois experimentos foi representada na Figura 11.

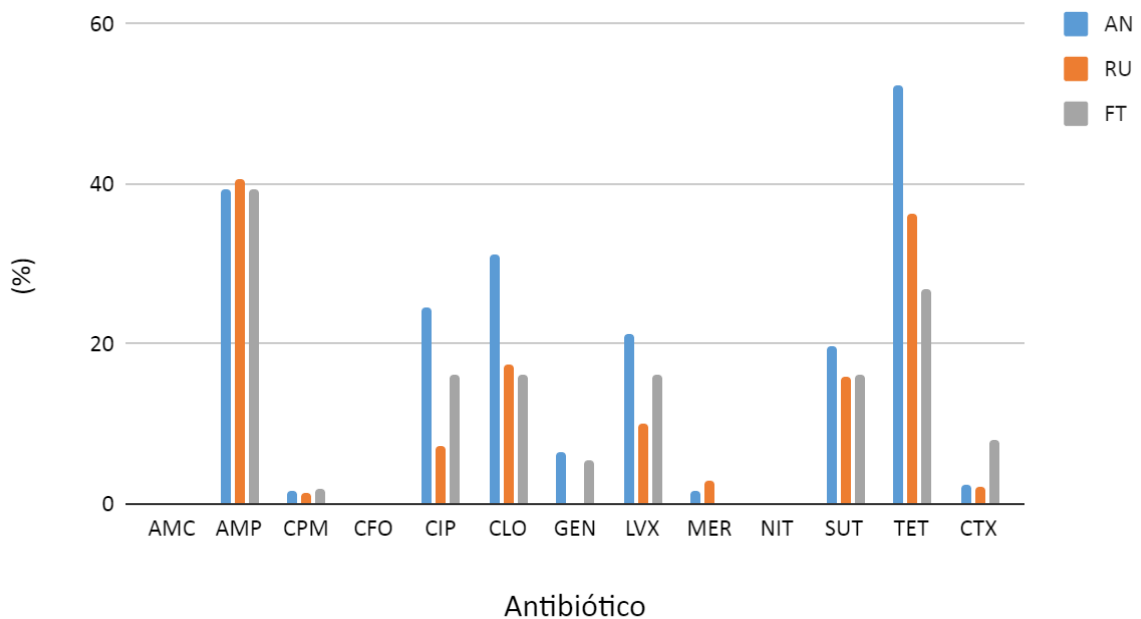


Figura 11 - Representação ilustrativa com a porcentagem de resistência a cada antimicrobiano em relação às amostras do conjunto AN (ANa e ANb), RU (RUa e RUB), FT (FTa e FTb) conforme a legenda de cores. Dados relacionados às amostras de *E. coli* isoladas no Experimento I e II.
Fonte: elaborada pelo autor.

Os dados do Experimento I e II foram ilustrados na Figura 12, relacionando o número de amostras de *E. coli* e a quantidade de antibióticos aos quais as amostras foram resistentes.

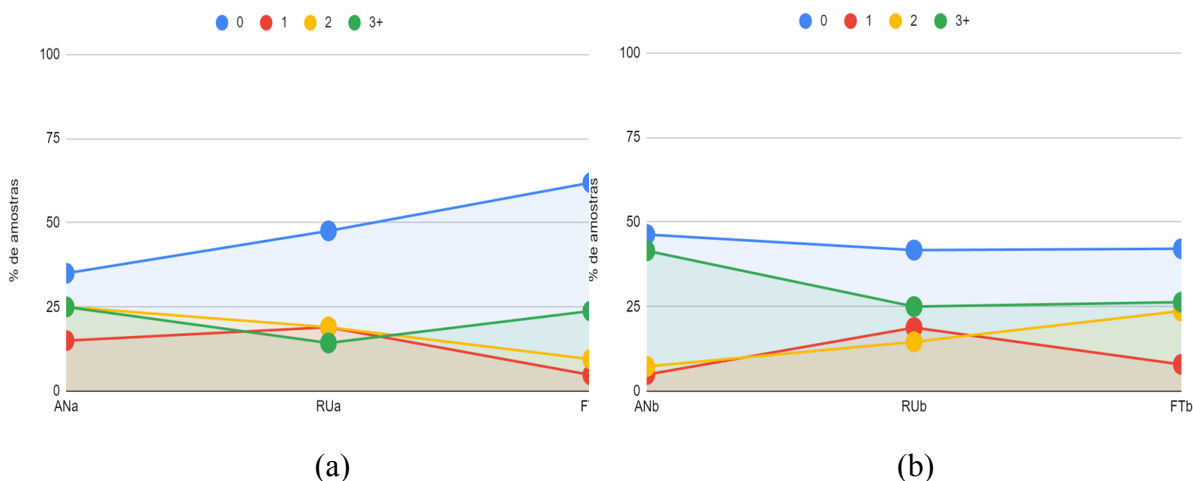


Figura 12 - Representação ilustrativa da resistência a antimicrobianos de amostras do conjunto ANa, RUa, FTa (a), ANb, RUB e FTb (b). Legenda: 0 (sensível a todos), 1 (resistente a um antibiótico), 2 (resistente a dois) e 3+ (resistente a três ou mais). Dados relacionados às amostras de *E. coli* isoladas no Experimento I e II. Fonte: elaborada pelo autor.

5.3.2 Antibiograma de *Enterococcus spp.*

Em relação ao Experimento I, foi realizado o antibiograma de 33 amostras de *Enterococcus spp.*, sendo 8 amostras de ANa (24%), 13 amostras de RUa (39%) e 12 amostras de FTa (36%). Das 8 amostras de ANa, 6 amostras foram resistentes a um antibiótico (75%) e 2 amostras foram sensíveis a todos os antibióticos (25%). Em relação às 13 amostras de RUa, 10 amostras foram sensíveis a todos os antibióticos (77%), 2 amostras foram resistentes a um antibiótico (15%) e 1 amostra foi resistente a quatro antibióticos (8%). Finalmente, o antibiograma com as 12 amostras de FTa resultou em 4 amostras resistentes a um antibiótico (33%) e 8 amostras foram sensíveis a todos os antibióticos (67%).

Realizando os cálculos de índice MAR individuais e depois para os conjuntos de amostras temos que ANa teve um índice de 0,11, RUa 0,07 e FTa 0,05. Considerando as amostras de ANa, RUa e FTa, nenhuma amostra apresentou resistência aos antibióticos Ampicilina 10µg e Cloranfenicol 30µg. Os antimicrobianos pelo quais as amostras foram mais resistentes foi a Tetraciclina 30µg, que obteve um índice de 24,2% de resistência, seguido por Ciprofloxacina 5µg, Estreptomicina 300µg, Levofloxacina 5µg e Nitrofurantoína 300µg, todos com 6,1% de resistência.

Já o Experimento II resultou em 154 amostras, sendo 50 amostras ANb (32%), 57 amostras RUB (37%) e 47 amostras FTb (31%). De 50 amostras de ANb, 31 foram

sensíveis a todos os antibióticos (62%), 13 amostras foram resistentes a um antibiótico (26%), 3 foram resistentes a dois antibióticos (6%) e, por fim, 3 foram resistentes a três ou mais antibióticos (6%). Em relação ao RUB, das 57 amostras testadas, 44 foram sensíveis a todos os antibióticos (77%), 7 foram resistentes a um antibiótico (12%), 5 foram resistentes a dois antibióticos (9%) e 1 foi resistente a três antibióticos (2%). Por último, das 47 amostras de FTb, 20 foram sensíveis a todos os antibióticos (43%), 26 foram resistentes a um antibiótico (55%) e 1 foi resistente a dois antibióticos (2%).

Os cálculos de índices MAR resultaram em um valor de 0,08 para ANb, 0,05 para RUB e 0,09 para FTb. Considerando as amostras de ANb, RUB e FTb, nenhum antibiótico testado apresentou 0% de resistência, ou seja, pelo menos uma amostra do conjunto citado apresentou resistência para cada antibiótico. Os antimicrobianos pelos quais as amostras foram mais resistentes foram, novamente, a Tetraciclina 30µg, que obteve um índice de 35,7% de resistência, seguido pela Estreptomicina 300µg com 8,4%.

A taxa de resistência em relação a cada antibiótico utilizado em AN, RU e FT dos dois experimentos foi representada na Figura 13.

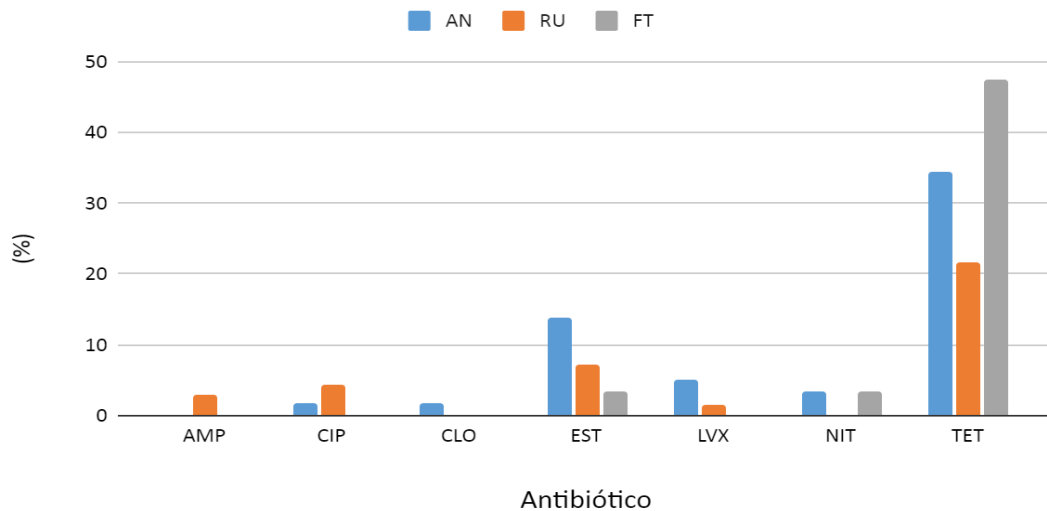


Figura 13 - Representação ilustrativa com a porcentagem de resistência a cada antimicrobiano em relação às amostras dos conjunto AN (ANa e ANb), RU (RUa e RUB), FT (FTa e FTb) conforme a legenda de cores. Dados relacionados às amostras de *Enterococcus* spp. isoladas no Experimento I e II. Fonte: elaborada pelo autor.

Os dados do Experimento I e II foram ilustrados na Figura 14, relacionando o número de amostras de *Enterococcus* spp. e a quantidade de antibióticos aos quais as amostras foram resistentes.

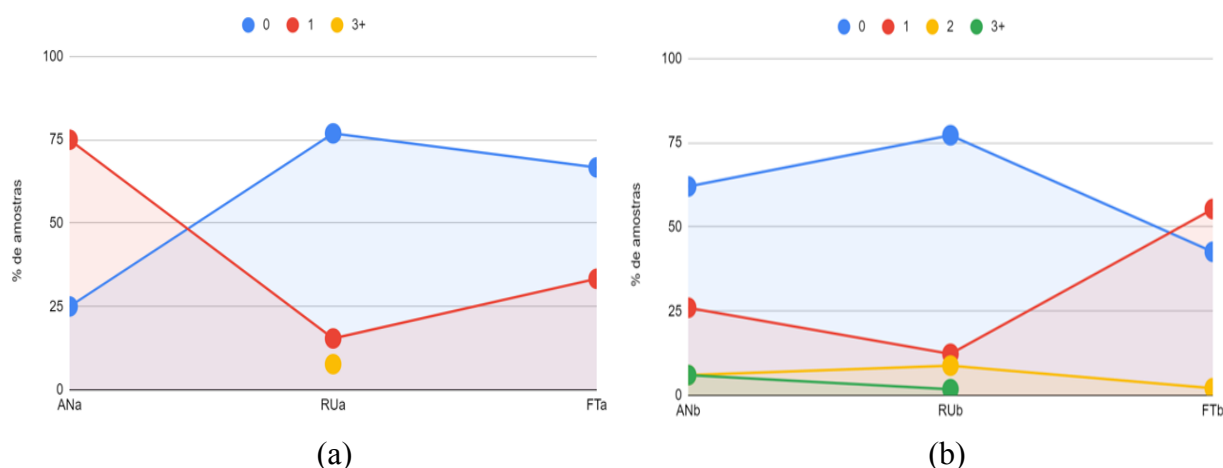


Figura 14 - Representação ilustrativa da resistência a antimicrobianos de amostras do conjunto ANa, RUa, FTa (a), ANb, RUB e FTb (b). Legenda: 0 (sensível a todos), 1 (resistente a um antibiótico), 2 (resistente a dois) e 3+ (resistente a três ou mais). Dados relacionados às amostras de *Enterococcus* spp. isoladas no Experimento I e II. Fonte: elaborada pelo autor.

5.3.3 Antibiograma de *Salmonella* spp.

Em relação ao Experimento I, foi realizado o antibiograma de 9 amostras de *Salmonella* spp., sendo dessas 3 amostras de ANa (33%), 4 amostras de RUa (44%) e 2 amostras de FTa (22%). Das 3 amostras de ANa, 3 amostras foram sensíveis a todos os antibióticos (100%). Em relação às 4 amostras de RUa, 3 amostras foram sensíveis a todos os antibióticos (75%) e 1 amostra foi resistente a dois antibióticos (25%). Por fim, o antibiograma com as 2 amostras de FTa resultou em 2 amostras sensíveis a todos os antibióticos (100%). Como apenas uma amostra apresentou resistência, foi realizado o cálculo de índice MAR individual, que resultou em um índice de 0,22 para a determinada amostra. A resistência apresentada na amostra de RUa foi para os antibióticos Ampicilina 10 μ g e Tetraciclina 30 μ g.

O Experimento II resultou em 12 amostras, sendo 8 amostras ANb (67%) e 4 amostras RUB (33%). De 8 amostras de ANb, 4 foram sensíveis a todos os antibióticos (50%) e 4 amostras foram resistentes a um antibiótico (50%). Em relação ao RUB, das 4 amostras testadas, 4 foram resistentes a dois antibióticos (100%). Os cálculos de índices MAR resultaram em um valor de 0,05 para ANb e 0,20 para RUB. A resistência apresentada nas amostras de ANb e RUB foi para os antibióticos Ampicilina 10 μ g e Tetraciclina 30 μ g, sendo que 5 amostras foram resistentes a Ampicilina 10 μ g, que é 41,7% do total, e 7 amostras foram resistentes a Tetraciclina 30 μ g, sendo então 58,3% do total de amostras.

5.3.4 Considerações e discussões sobre os antibiogramas

Com a análise dos antibiogramas pode-se ver uma notável diferença de resistência a antimicrobianos entre os microrganismos. Considerando os dois experimentos, para *E. coli*, os índices MAR dos grupos de AN, RU e FT não passaram de 0,16, e foi obtido um índice de até 67% de amostras sensíveis a todos os antibióticos. As amostras apresentaram maior índice de resistência principalmente para Ampicilina 10µg e Tetraciclina 30µg, seguido por Cloranfenicol 30µg e Levofloxacina 5µg. Em relação aos grupos, o AN teve o maior índice MAR, seguido por FT e RU. Sendo assim, conforme esses dados, não houve um aumento significativo de resistência ao decorrer dos processos de tratamento pelo UASB e pelo fotobiorreator em comparação com a água negra, o que é muito relevante, pois a seleção de resistentes representa um grande obstáculo para a implementação do tratamento. Todavia, pode-se notar que o índice MAR para FT é ligeiramente maior que de RU, mesmo ambos sendo inferiores aos de AN. Com isso e os dados das contagens, resulta-se em uma geral diminuição de carga microbiológica de RU para FT, mas um leve aumento de resistência. À vista desse cenário, é notável um resultado positivo no tratamento da água negra pelo reator UASB, que resultou em uma menor carga microbiológica e menor resistência, mas seria mais prudente realizar mais testes para verificação do pós-tratamento com o fotobiorreator, para validar se a diminuição da carga a partir do efluente do UASB é vantajosa e também se a diferença de resistência entre RU e FT é expressiva. O fotobiorreator pode proporcionar não só uma diminuição de carga microbiológica, mas também a reciclagem de nutrientes, portanto seria relevante um melhor estudo desse tratamento, tendo em conta que sua aplicação teria esse diferencial. Em relação aos antibióticos que apresentaram maior índice de resistência, Ampicilina 10µg e Tetraciclina 30µg: Aslan *et al.* (2018) já tinham descrito em uma pesquisa com amostras de uma ETE na Geórgia (Estados Unidos da América), um índice de 50% e 63% de resistência à Ampicilina de amostras de *E. coli* no afluente e efluente, respectivamente. Esse estudo, entretanto, apresentou um índice de resistência relativamente baixo para Tetraciclina, sendo de 6% no afluente e 9% no efluente. Entretanto, um estudo de Rosas *et al.* (2015), que analisou amostras de efluente do sistema de tratamento da Cidade do México (México), resultou uma taxa de resistência maior que 30% para Tetraciclina em amostras de *E. coli*, e aproximadamente 20% para Ampicilina. O presente estudo resultou em uma taxa de resistência de 43,1% a Ampicilina, que foi mais próximo ao encontrado por Aslan *et al.* (2018) e 38,2% a Tetraciclina, mais próximo ao estudo de Rosas *et al.* (2015).

Passando então para a análise de *Enterococcus* spp., considerando os dois experimentos, os índices MAR dos grupos de AN, RU e FT não passaram de 0,11, e foi obtido um índice de até 77% de amostras sensíveis a todos os antibióticos. Sendo assim, se comparados a *E. coli*., os índices MAR foram inferiores e a quantidade de suscetíveis foi superior. Outro elemento curioso é que, assim como em *E. coli*, o índice MAR diminuiu com os tratamentos, mas diferentemente do anterior, em que o índice MAR para FT é apenas ligeiramente maior, foi obtido um índice consideravelmente maior que de RU (explícito nos dados do Experimento II, o qual contava com um número superior de amostras), não chegando ao valor inicial de AN, mas ficando bem próximo. Assim sendo, isso indicaria que o tratamento com o fotobiorreator poderia diminuir a carga microbiológica, entretanto, pode representar uma diferença relevante na resistência, insinuando uma seleção de cepas resistentes a partir do efluente de RU. De certa forma, se comparado apenas a AN, o índice MAR é ligeiramente inferior e houve uma grande diminuição de carga microbiológica, porém, o reator UASB resultou em diminuição de carga microbiológica juntamente com a diminuição de resistência, ao passo que o fotobiorreator também diminuiu a carga, mas aumentou a resistência, gerando dúvidas sobre a sua real eficiência e sua validação como pós-tratamento.

Semelhantemente a *E. coli*, as amostras apresentaram maior índice de resistência principalmente para Tetraciclina 30µg, sendo curiosamente seguido pela Estreptomicina 300µg. A Estreptomicina 300µg, diferentemente da Estreptomicina 10µg, é utilizada no teste para detecção de resistência a aminoglicosídeos de alto nível em *Enterococcus* spp., juntamente a Gentamicina 120µg. No presente estudo, apenas a resistência a Estreptomicina foi estudada e, diferentemente do observado no índice MAR, a taxa de resistência diminuiu gradualmente com os tratamentos: 13,8% de resistência em AN, 7,1% em RU e 3,4% em FT. Não é uma porcentagem de resistência tão elevada (13,8%), porém, é pertinente a realização do antibiograma com a Gentamicina 120µg para completar o teste de resistência de alto nível. Russo *et al.* (2015) identificou espécies e analisou a resistência a antibióticos de efluentes de um sistema de tratamento em San Michele di Ganzaria, uma comunidade na Sicília, Itália. Foi descrito uma prevalência de *E. faecium* (88%) e *E. faecalis* (11%) nos isolados. De forma geral, Cloranfenicol (97%) e Ampicilina (83%) tiveram maior taxa de resistência, porém foi destacado que, especificamente em *E. faecalis*, verificou-se uma maior resistência a Estreptomicina (57%) e Tetraciclina (36%) que em *E. faecium* (8% e 14%, respectivamente). Além disso, a resistência à Ampicilina é rara em *E. faecalis* e frequente em *E. faecium*. Essa alta resistência a Tetraciclina e Estreptomicina, em conjunto a susceptibilidade a Ampicilina descrita em amostras de *E. faecalis*, condiz com os resultados

deste estudo. Monteiro e Santos (2020), que analisaram amostras de três ETEs e de águas receptoras localizados em Portugal, também observaram a predominância de *E. faecium* (53%) em relação a *E. faecalis* (11%) e outras espécies (36%). De forma geral, 40% das amostras foram resistentes a Tetraciclina, - valor mais condizente ao presente estudo do que o encontrado em Russo *et al.* (2015) -, entretanto, 16% foram resistentes a Ampicilina, enquanto neste estudo foi encontrada uma taxa de apenas 2,9%. Dessa forma, para melhor análise do Antibiograma e completude dos dados, seria ideal integrar a identificação de espécies na metodologia (ARIAS & MURRAY, 2012; CLSI, 2020; GAGETTI *et al.*, 2019).

Em relação a *Salmonella* spp., não houve um grande número de isolados tanto no Experimento I quanto no Experimento II, levando também a uma dificuldade para a certificação do resultado do tratamento. Um dos motivos que pode levar isso acontecer é, como já dito, a competição com outros microrganismos que estão presentes nas amostras. Com os dados obtidos entretanto, pode-se notar que no Experimento I, a quantidade de isolados de FT foram inferiores aos de AN e RU, e no Experimento II, houve apenas um isolado de FT, que acabou não podendo ser analisado pois foi perdido no processo de isolamento, porém, contar com apenas uma colônia sugestiva já pode ser sugestivo de que o tratamento com o fotobiorreator ajudou na diminuição de *Salmonella* spp. Avaliando o índice MAR então, no Experimento I, de todos os isolados apenas uma amostra apresentou resistência, que foi uma de RU, e no Experimento II o grupo RU apresentou um índice MAR de 0,20 enquanto o de AN foi de 0,05. Logo, isso pode sinalizar que o tratamento com o reator UASB selecionou cepas resistentes de *Salmonella* spp., mas seria mais adequado acompanhar mais experimentos para averiguação. Não houveram também amostras FT resistentes, mas o número de isolados foi, de fato, escasso. Assim como em *E. coli*, as amostras analisadas apresentaram maior índice de resistência principalmente para Tetraciclina 30µg e Ampicilina 10µg. Segundo Pignato *et al.* (2010), que coletou amostras de esgoto tratado e não tratado das cidades de Caltagirone e San Michele di Ganzaria, na Sicília, Itália, das amostras de *Salmonella* spp., 91,7% apresentaram resistência a Ampicilina. Masarikova *et al.* (2016), similarmente, verificou a sensibilidade de amostras de *Salmonella* spp. isoladas do efluente de um sistema de tratamento de esgoto de Brno, República Tcheca. A Ampicilina teve a terceira maior taxa de resistência: 31%. No presente estudo, 41,7% das amostras de *Salmonella* spp. foram resistentes a esse antibiótico, uma taxa relativamente maior, porém mais próxima a encontrada por Masarikova *et al.* (2016). Outro antibiótico testado por Masarikova *et al.* (2016) foi a Tetraciclina, esta teve a maior taxa de resistência, que foi 52%, em concordância com o presente estudo, que foi de 58,3%, a maior taxa de

resistência entre os antibióticos testados. No geral, pode-se dizer que os resultados em relação ao antibiograma do presente estudo conferem com dados de alguns artigos encontrados, como os antibióticos pelos quais as amostras apresentaram mais resistência, porém a taxa foi substancialmente diferente, o que de certo modo já era esperado por serem estudos em diferentes locais, diferentes climas e diferentes épocas.

Com a observação do perfil de resistência, é notável uma conformidade entre resultados de *E. coli* e *Enterococcus* spp. (mesmo em diferente intensidade), divergindo do observado em *Salmonella* spp.: A resistência diminuiu com o tratamento do reator UASB, mas aumentou levemente para *E. coli* e significativamente para *Enterococcus* spp. com o fotobiorreator (não alcançando a taxa de AN, entretanto), já para *Salmonella* spp., a taxa aumentou com o tratamento no UASB, e zerou com o fotobiorreator. Houve também uma divergência de resultados em relação aos experimentos (no Experimento I, a resistência de *Enterococcus* spp. apenas decresceu ao decorrer dos tratamentos), mas um motivo plausível para isso é a quantidade de isolados bem menor no Experimento I, podendo então ser insuficiente para um perfil de resistência concreto. O Experimento II resultou em uma boa quantidade de amostras de *E. coli* e *Enterococcus* spp., todavia ainda é fundamental o isolamento e análise de mais amostras de *Salmonella* spp.

Concluindo, a fim de ter um padrão mais definido de resistência, seria ideal a obtenção de uma maior quantidade de isolados de *Salmonella* spp., em conjunto a um aprofundamento no estudo da resistência em cada microrganismo, tendo como exemplo a inclusão de mais antibióticos para a realização dos perfis.

6 CONCLUSÕES

- A contagem e isolamento de *E. coli*, *S. aureus* e *Enterococcus* spp. em amostras de água negra simulada (AN), efluente do reator UASB (RU) e efluente do fotobiorreator (FT) foi realizada, com exceção de *S. aureus*, que devido a dificuldade encontrada para seu isolamento, foi encontrado apenas 3 isolados. No total, foram obtidos 242 isolados presuntivos de *E. coli* e 200 de *Enterococcus* spp.
- A averiguação da presença de *Salmonella* spp. em AN, RU e FT foi detectada em 6 amostras de AN, 4 amostras de RU e 4 amostras de FT, totalizando 36 cepas isoladas;
- Foram utilizados diversos testes bioquímicos para confirmação das culturas bacterianas isoladas, sendo que: para *E. coli*, todos os isolados (242) foram confirmados pelos testes de Gram e citrato, e 182 isolados (75%) foram confirmados pelo teste de indol; para *Enterococcus* spp., todos (191) foram confirmados pelo teste de Gram, e 187 (98%) foram confirmados pelo teste PYR; para *S. aureus*, foram isoladas apenas 3 cepas presuntivas de AN, que foram confirmadas pelos testes de Gram e DNase, porém, não foram confirmadas pelo teste de Coagulase, resultando em nenhuma amostra isolada confirmada; e para *Salmonella* spp., todos os 35 isolados (dos 36 isolados iniciais, um foi perdido durante o experimento), foram confirmados 21 isolados (60%) pelos testes de Gram, indol, citrato e Soro Anti-*Salmonella*.
- Foi realizada a determinação do perfil de resistência à antibióticos das cepas isoladas por meio da leitura de halos de inibição referentes aos antibióticos testados, sendo 182 cepas de *E. coli*, 187 de *Enterococcus* spp. e 21 de *Salmonella* spp.;
- Na comparação dos resultados entre AN, RU e FT:
 - Detectou-se uma diminuição da carga microbiana (Coliformes totais, *E. coli* e *Enterococcus* spp.) quando a água negra simulada foi tratada no reator UASB (média de 91,1% de redução) e, subsequentemente, no fotobiorreator tubular (99,3% e 91,6%, em relação à AN e RU, respectivamente).

- Com relação ao perfil de resistência, o índice MAR para *E. coli* e *Enterococcus* spp. foi maior em AN (0,15 e 0,09, respectivamente). Em RU e FT, houve um aumento do índice de FT em relação ao RU (0,10 e 0,05 de RU para 0,12 e 0,08 de FT, respectivamente). Isso indica que o tratamento com o fotobiorreator consegue diminuir a carga microbiológica, entretanto, pode contribuir para a seleção de cepas resistentes em *Enterococcus* spp. e em *E. coli*. Distintivamente, para *Salmonella* spp., os dados obtidos de MAR (0,04 – AN, 0,13 – RU, 0 – FT) mostraram que, possivelmente, o tratamento com o reator UASB tenha selecionado as cepas resistentes de *Salmonella* spp.

Acredita-se que os resultados de contagem gerados sejam satisfatórios porque comprovam que o sistema de tratamento estudado é eficiente na remoção dos microrganismos pesquisados, contudo, mais estudos são necessários com uma quantidade maior de isolamentos para se ter um padrão mais definido e resultados mais fundamentados sobre o perfil de resistência nos diferentes compartimentos do sistema.

REFERÊNCIAS

ABDEL-RAOUF, N.; AL-HOMAIDAN, A. A.; & IBRAHEEM, I. B. M. Microalgae and wastewater treatment. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 2012, 19(3), 257–275.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) Descrição dos meios de cultura empregados nos exames Microbiológicos, Módulo IV, 2004.

ALVEZ, M. O.; ANDRADE, I. K. T.; SILVA, G. M.; COSTA, J. N.; BENINE, A. L. M. Tratamento de esgoto sanitário: uma solução simples e ecológica de interesse social. **Janus**, 2015, Vol. 12, No 22.

ANGENENT, L.T.; KARIM, K.; AL-DAHMAN, M.H.; WRENN, B.A.; DOMÍGUES-ESPINOSA, R. Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater. **Trends in Biotechnology**, 2004, 22(9): 477-485.

ARENA, A. N.; LIBERAL, V.; CUEVAS, C. Eficiencia de remoción de bacterias coliformes en un sistema uasb y lagunas de maduración. **Avances en Energías Renovables y Medio Ambiente**, Vol. 9, 2005.

ARIAS, C.; MURRAY, B. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. **Nat Rev Microbiol** 10, 266–278 (2012).

ASLAN, A.; COLE, Z.; BHATTACHARYA, A.; OYIBO, O. Presence of Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* in Wastewater Treatment Plant Effluents Utilized as Water Reuse for Irrigation. **Water**, 10(6), 2018.

ASLAN, S.; KAPDAN, I.K. Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. **Ecological Engineering**, 2006, 28: 64-70.

BERTONCINI, E. I. Tratamento de efluentes e reúso da água no meio agrícola. **Revista Tecnologia & Inovação Agropecuária**. Junho/2008, pág. 152-169.

BJERK, T. R. *Cultivo de microalgas em fotobiorreator e reator misto visando a biorremediação e produção de biocombustíveis*. 2012. Dissertação (Mestrado) - Área de Concentração em Gestão e Tecnologia Ambiental, Universidade de Santa Cruz do Sul - Santa Cruz do Sul/RS.

BOUKI, C.; VENIERI, D.; DIAMADOPOULOS, E. Detection and fate of antibiotic resistant bacteria in wastewater treatment plants: A review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 2013, 91, 1–9.

BRASIL. IBGE. Doenças relacionadas ao saneamento ambiental inadequado (DRSAI), 2010.
BRASIL. Ministério das Cidades. Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental – SNSA. Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento (SNIS) : Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgotos – 2016. Brasília: SNSA/MCIDADES, 2018.

CAMPOS, C. M. M. *et al.* Desenvolvimento e operação de reator anaeróbico de manta de lodo (UASB) no tratamento dos efluentes da suinocultura em escala laboratorial. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 1, jan./fev., 2006, p. 140-147.

CERVANTES–ZEPEDA, A.I; CRUZ–COLÍN, M.R.; AGUILAR–CORONA, R.; CASTILLA–HERNÁNDEZ, P. ; MERAZ–RODRÍGUEZ, M. Caracterización fisicoquímica y microbiológica del agua tratada en un reactor UASB escala piloto. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, vol.10 no.1 México abr. 2011

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Startards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 28th ed. CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2018.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Startards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 30th ed. CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2020.

CZEKALSKI, N.; BERTHOLD, T.; CAUCCI, S.; EGLI, A.; BÜRGMANN, H. Increased Levels of Multiresistant Bacteria and Resistance Genes after Wastewater Treatment and Their Dissemination into Lake Geneva, Switzerland. **Frontiers in Microbiology**, 2012, 3.

DE-BASAHN, L.E.; BASHAN, Y. Immobilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects. **Bioresource Technology**, 2010, 101: 1611-1627.

FERRER, R. S.; SUEITT, A.P.E. ; HOFFMANN, M. T.; DANIEL, L. A. Evaluation of the temperature influence on *Chlorella sorokiniana* growth and nutrient removal in photobioreactors fed with an anaerobic reactor's effluent In: 1st IWA Conference on Algal Technologies for Wastewater Treatment and Resource Recovery, 2017, Delft. Proceedings of the 1st IWA Conference on Algal Technologies for Wastewater Treatment and Resource Recovery. , 2017.

FERRER, R. S. *Crescimento da biomassa algal, recuperação de nitrogênio, fósforo e remoção de patógenos em fotobiorreator (FBR) utilizado em pós-tratamento de reator UASB alimentado com água negra simulada*. 2017. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo.

FERRI, M.; RANUCCI, E.; ROMAGNOLI, P.; GIACCONE, V. Antimicrobial resistance: A global emerging threat to public health systems. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2017, 57(13), 2857–2876.

FIorentino, A.; FERRO, G.; ALFEREZ, M. C.; POLO-LÓPEZ, M. I.; FERNÁNDEZ-IBÁÑEZ, P.; RIZZO, L. Inactivation and regrowth of multidrug resistant bacteria in urban wastewater after disinfection by solar-driven and chlorination processes. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 2015, 148, 43–50.

GAGETTI, P; BONOFILIO, L; GABARROT, G. G.; KAUFMAN, S; MOLLERACH, M; VIGLIAROLO, L; VON SPECHT, M; TORESANI, I; LOPARDO, H. A. Resistance to beta-lactams in enterococci. **Revista Argentina de microbiología**. Volume 51, (2019), pág. 179-183.

GALBIATI, A. F. *Tratamento domiciliar de águas negras através de tanque de evapotranspiração*. 2009. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Centro de Ciências Exatas e Tecnologia - Campo Grande.

GOLDSTEIN, R. *et al.* Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Detected at Four U.S. Wastewater Treatment Plants. **Environmental Health Perspect**. Novembro/2012 ; 120(11): 1551–1558.

GÓMEZ, P.; LOZANO, C.; BENITO, D.; ESTEPA, V.; TENORIO, C.; ZARAZAGA, M.; TORRES, C. Characterization of *Staphylococci* in urban wastewater treatment plants in Spain, with detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* ST398. **Environmental Pollution**, 212, 71–76. 2016.

GONZÁLEZ, C.; MARCINIAK, J.; VILLAVERDE, S.; GARCÍA-ENCINA, P.A.; MUÑOZ, R. Microalgae-based processes for the biodegradation of pretreated piggery wastewaters. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2008, 80: 891-898.

ISOLDI, L. A.; KOETZ, P. R.; ISOLDI, L. A. Pós-tratamento de efluente nitrificado da parboilização de arroz utilizando desnitrificação em reator UASB. **Eng. sanit. ambient**. 271 Vol.10 - Nº 4 - out-dez 2005, 271-277.

KIM, S.; AGA, D. A. Potential Ecological and Human Health Impacts of Antibiotics and Antibiotic-Resistant Bacteria from Wastewater Treatment Plants. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, 2007, Volume 10, nº8, pág. 559-573.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN Jr., W. C. *Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido*. 5. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001. 1465 p

KORZENIEWSKA, E. & HARNISZ, M. Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-positive Enterobacteriaceae in municipal sewage and their emission to the environment. **Journal of Environmental Management**, 128, 904–911. 2013.

KOTLARSKA, E.; ŁUCZKIEWICZ, A.; PISOWACKA, M.; BURZYŃSKI, A. Antibiotic resistance and prevalence of class 1 and 2 integrons in *Escherichia coli* isolated from two wastewater treatment plants, and their receiving waters (Gulf of Gdansk, Baltic Sea, Poland). **Environmental Science and Pollution Research**, 22:2018–2030, 2015.

KRUMPERMAN, P. H. Multiple Antibiotic Resistance Indexing of *Escherichia coli* to Identify High-Risk Sources of Fecal Contamination of Foods. **Applied and Environmental Microbiology**, July 1983, p. 165-170 Vol. 46, No. 1.

KRUSTOK, I.; TRUU, J.; ODLARE, M.; TRUU, M.; LIGI, T.; TIIRIK, K.; NEHRENHEIM, E. Effect of lake water on algal biomass and microbial community structure in municipal wastewater-based lab-scale photobioreactors. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 99(15), 6537–6549. 2015.

LEE, C. S.; LEE, S.-A.; KO, S.-R.; OH, H.-M.; AHN, C.-Y. Effects of photoperiod on nutrient removal, biomass production, and algal-bacterial population dynamics in lab-scale photobioreactors treating municipal wastewater. **Water Research**, 2015, vol. 68, pág. 680–691.

MARCHELLO, A. E.; LOMBARDI, A. T.; DELLAMANO-OLIVEIRA, M. J.; SOUZA, C. W. O. de. Microalgae population dynamics in photobioreactors with secondary sewage effluent as culture medium. **Brazilian Journal of Microbiology**, 46(1), 75–84. 2015.

MASARIKOVA, M.; MANGA, I.; CIZEK, A.; DOLEJSKA, M.; ORAVCOVA, V.; MYSKOVA, P.; KARPISKOVA, R.; LITERAK, I. *Salmonella enterica* resistant to antimicrobials in wastewater effluents and black-headed gulls in the Czech Republic, 2012. **Science of the Total Environment** 542, 102–107. 2016.

MEZZARI, M. P.; DA SILVA, M. L. B.; NICOLOSO, R. S.; IBELLI, A. M. G.; BORTOLI, M.; VIANCELLI, A.; SOARES, H. M. Assessment of N₂O emission from a photobioreactor treating ammonia-rich swine wastewater digestate. **Bioresource Technology**, 2013, vol. 149, pág. 327–332.

Ministério da Saúde. *Técnica de Coloração de Gram: Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS*, Brasília, 1997, 63 p.

MIN, M.; WANG, L.; LI, Y.; MOHR, M. J.; HU, B.; ZHOU, W.; CHEN, P.; RUAN, R. Cultivating *Chlorella* sp. in a Pilot-Scale Photobioreactor Using Centrate Wastewater for Microalgae Biomass Production and Wastewater Nutrient Removal. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, September 2011, Vol. 165, pág. 123–137.

MONTEIRO, S. & SANTOS, R. Incidence of enterococci resistant to clinically relevant antibiotics in environmental waters and in reclaimed waters used for irrigation. **Journal of Water and Health**. 2020.

MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; LANDRY, M. L.; PFALLER, M. A. *Manual of Clinical Microbiology*. 9. ed. Washington: ASM Press, 2007. 2388 p

NCCLS. *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—8^o Edition*. NCCLS document M2-A8. Pennsylvania/USA, 2003.

NUÑEZ, L.; MORETTON, J. Perfil microbiológico y resistencia bacteriana a desinfectantes en aguas residuales de hospital. **Hig. Sanid. Ambient.** 6: 197-201. 2006.

PEREIRA, M. B. O. C. *Tratamento de água negra em reator UASB*. 2016. Dissertação (Mestrado)—Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia, Bauru.

PIGNATO, S.; CONIGLIO, M. A.; FARO, G.; LEFEVRE, M.; WEILL, F. X.; GIAMMANCO, G. Molecular Epidemiology of Ampicillin Resistance in *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* from Wastewater and Clinical Specimens. **Foodborne Pathogens And Disease**, Volume 7, N^o 8, 2010.

PINHEIRO, R. B.; MONTENEGRO, S. M. G. L. ; SILVA, S. R. ; MEDEIROS, Y. D. P. ; AURELIANO, J. T. Outorga para Lançamento de Efluentes — Uma Metodologia de Apoio à Gestão de Recursos Hídricos. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos Volume**, Out/Dez 2013 vol. 18 n^o4, 55-65

QU, X.; ALVAREZ, P. J. J.; LI, Q. Applications of nanotechnology in water and wastewater treatment. **Water Research**, 2013, vol. 47, n^o 12, pág. 3931–3946.

RAZZAK, S. A.; HOSSAIN, M. M.; LUCKY, R. A.; BASSI, A. S.; DE LASA, H. Integrated CO₂ capture, wastewater treatment and biofuel production by microalgae culturing—A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 2013, vol. 27, pág. 622–653.

RIZZO, L.; MANAIA, C.; MERLIN, C.; SCHWARTZ, T.; DAGOT, C.; PLOY, M. C.; MICHAEL, I.; FATTA-KASSINOS, D. Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: A review. **Science of The Total Environment**, 2013, 447, 345–360.

ROSAS, I.; SALINAS, E.; MARTÍNEZ, L.; CRUZ-CÓRDOVA, A.; GONZÁLEZ-PEDRAJO, B.; ESPINOSA, N.; AMÁBILE-CUEVAS, C. F. Characterization of *Escherichia coli* Isolates from an Urban Lake Receiving Water from a Wastewater Treatment Plant in Mexico City: Fecal Pollution and Antibiotic Resistance. **Current Microbiology**, 71(4), 490–495. 2015.

RUIZ-MARIN, A.; MENDOZA-ESPINOSA, L.G; STEPHENSON, T. Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. **Bioresource Technology**, 2010, 101: 58-64.

RUSSO, N.; PINO, A.; TOSCANO, A.; CIRELLI, G. L.; CAGGIA, C.; ARIOLI, S.; RANDAZZO, C. L. Occurrence, diversity, and persistence of antibiotic resistant enterococci in full-scale constructed wetlands treating urban wastewater in Sicily. **Bioresource Technology**. Vol. 274, 2019, Págs. 468-478.

SCHMIDT, V.; CARDOSO, M. R. I. Sobrevivência e perfil de resistência a antimicrobianos de *Salmonella* sp. isoladas em um sistema de tratamento de dejetos de suínos. **Ciência Rural**, v. 33, nº 5, set-out, 2003.

SHANNON, M. A.; BOHN, P. W.; ELIMELECH, M.; GEORGIADIS, J. G.; MARIÑAS, B. J.; MAYES, A. M. Science and technology for water purification in the coming decades. **Nanoscience and Technology**, 2009, pág. 337–346.

SILVA, F.F.P.; SANTOS, M.A.A.; SCHMIDT, V. Resistência a antimicrobianos de *Escherichia coli* isolada de dejetos suínos em esterqueiras. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, vol.60 nº.3 - Belo Horizonte/MG, junho 2008.

SILVA, L. M. L; *et al.* Tratamento de efluentes em fotobiorreatores iluminados por diodos emissores de luz (leds) de baixa intensidade luminosa. **Revista AIDIS de Ingeniería y Ciencias Ambientales: Investigación, desarrollo y práctica**. Vol. 10, Nº1, abril de 2017, 87–103.

SILVA, M. F.; *et al.* Antibiotic resistance of enterococci and related bacteria in an urban wastewater treatment plant. **FEMS Microbiology Ecology**, Vol. 55, nº. 2, fevereiro/2006, pág. 322–329.

SINGH, R. N. & SHARMA, S. Development of suitable photobioreactor for algae production – A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 2012, vol. 16, nº4, pág. 2347–2353.

SUEITT, Ana Paula Erbeta. **Compartimentos do sistema de tratamento analisados no trabalho: (a) água negra simulada; (b) efluente do reator UASB e (c) efluente do fotobiorreator tubular**. 2019. 3 fotografias. 2019. 376 x 265; 260 x 346; 350 x 624.

TAN, X.; CHU, H.; ZHANG, Y.; YANG, L.; ZHAO, F.; ZHOU, X. *Chlorella pyrenoidosa* cultivation using anaerobic digested starch processing wastewater in an airlift circulation photobioreactor. **Bioresource Technology**, 2014, vol. 170, pág. 538–548.

TAWFIK, A; SOBHEY, M.; BADAWY, M. Treatment of a combined dairy and domestic wastewater in an up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor followed by activated sludge (AS system). **Desalination**, 227, 167–177. 2008.

TERCERO, E. A. R.; SFORZA, E.; MORANDINI, M. Cultivation of *Chlorella protothecoides* with urban wastewater in continuous photobioreactor: biomass productivity and nutrient removal. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2014, Volume 172, nº 3, pág. 1470–1485

VERSTRAETE, W.; VAN DE CAVEYE, P.; DIAMANTIS, V. Maximum use of resources present in domestic “used water”. **Bioresource Technology**, 2009, 100: 5537-5545.

WATKINSON, A. J. Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* in Wastewaters, Surface Waters, and Oysters from an Urban Riverine System. **Applied Environmental Microbiology**. Setembro 2007 vol. 73 nº. 17, pág. 5667-5670.

ZEEMAN, G.; KUJAWA, K.; MES, T.; HERNANDEZ, L.; GRAAF, M.; ABU-GHUNMI, L.; MELS, A.; MEULMAN, B.; TEMMINK, H.; BUISMAN, C.; VAN LIER, J.; LETTINGA, G. Anaerobic treatment as a core technology for energy, nutrients and water recovery from source-separated domestic wastewater. **Water Science & Technology**, 2008, 57(8): 1207-1212.

ZHU, L.; WANG, Z.; SHU, Q.; TAKALA, J.; HILTUNEN, E.; FENG, P.; YUAN, Z. Nutrient removal and biodiesel production by integration of freshwater algae cultivation with piggery wastewater treatment. **Water Research**, 2013, 47(13), 4294–4302.