

IV-1424 - AVALIAÇÃO DA EXISTÊNCIA DE RESISTÊNCIA BACTERIANA EM ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE ESGOTO

Heitor Semler Fröhler⁽¹⁾

Engenheiro Ambiental pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Raíssa Engroff Guimarães⁽²⁾

Engenheira Ambiental e Sanitarista pela Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS).

Ana Paula Guedes Frazzon⁽³⁾

Médica Veterinária pela UFRGS. Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente e Doutora em Biologia Celular e Molecular pela UFRGS. Professora do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS)/UFRGS.

Salatiel Wohlmuth da Silva⁽⁴⁾

Engenheiro de Bioprocessos e Biotecnologia pela Universidade Estadual do Rio Grande do Sul (UERGS). Mestre e Doutor pelo PPGE3M/UFRGS. Professor no Instituto de Pesquisas Hidráulicas (IPH)/UFRGS.

Endereço⁽¹⁾: Av. Bento Gonçalves, 9500 – Campus do Vale, Prédio 44302 – Bairro Agronomia - Porto Alegre - RS – Brasil – CEP: 91501-970 – Tel: (51) 3308-6564 - e-mail: halfeld@sc.usp.br

RESUMO

A resistência a antimicrobianos tem despertado preocupações da comunidade científica, visto que novas bactérias resistentes, com novos perfis de resistência, surgem de forma mais acelerada que o descobrimento de novos antibióticos, potencializando os riscos associados a infecções bacterianas. Além disso, o aumento no uso de antibióticos para evitar infecções secundárias durante a pandemia da Covid-19 acelerou o processo de aparecimento de cepas resistentes. Ainda assim, a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima que o consumo global de antibióticos aumentará aproximadamente 67% até 2030, reforçando que a resistência bacteriana tende continuar a crescer. Devido a esse cenário, buscou-se avaliar a presença de Enterococos resistentes em efluente hospitalar, em afluente e efluente em estação de tratamento de esgoto (ETE) e propor uma alternativa tecnológica de tratamento que viesse a reduzir a recorrência desses organismos resistentes e contaminantes em efluentes. Assim, esse trabalho propôs avaliar o processo de oxidação eletroquímica avançada (OEA) como polimento em ETE, visando a remoção de Enterococos resistentes e antibiótico. Os resultados demonstraram que foi constatada em amostras de efluentes provenientes da saída da ETE a presença de cepas de Enterococos resistentes a Tetraciclina. O tratamento avançado proposto garantiu a remoção completa desses microrganismos com o tempo de operação de 15 min, a uma densidade de corrente de 10 mA/cm². Nessa mesma condição, o processo foi capaz de remover 75% do antibiótico Sulfametoxazol (SMX) em 60 min, fatores que atestam a eficácia da tecnologia em inativar microrganismos e degradar fármaco. Portanto, infere-se que a OEA pode ser uma alternativa para o polimento de efluentes contaminados, a alto custo de implementação, mas baixo custo de manutenção.

PALAVRAS-CHAVE: Resistência bacteriana, Antibióticos, Estação de Tratamento de Esgoto, Oxidação Eletroquímica Avançada,.

INTRODUÇÃO

A utilização indevida de antibióticos na medicina e pecuária tem aumentado os índices de resistência bacteriana ao redor do mundo. As bactérias que apresentam genes de resistência, sejam eles adquiridos ou natos do organismo, limitam – devido à perda de eficácia – a utilização de determinados fármacos para o tratamento de doenças. Esse cenário é preocupante, visto que a ciência não tem conseguido desenvolver novos antibióticos a uma taxa minimamente necessária para acompanhar a demanda causada pelo surgimento de resistências aos antibióticos mais antigos. Segundo a *Antimicrobial Resistance Fighter Coalition* (2022), somente 15 novos antibióticos foram aprovados pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (CDC) desde o ano 2000, comparados aos 63 que foram aprovados para uso clínico entre 1980 e 2000. Portanto, há uma clara redução do desenvolvimento de novas drogas. Tendo esse cenário em vista, é imprescindível que a comunidade científica, de forma unificada, integrando diferentes áreas, busque soluções para essa problemática que ameaça a saúde global.

Ademais, alguns gêneros bacterianos, como *Escherichia* e *Enterococos*, por serem organismos entéricos, são lançados no ambiente através de esgotos sanitários, assim apresentando capacidade de disseminação de

eventuais características de resistência no ambiente. Considerando o cenário brasileiro, essa preocupação deveria ser maior, visto a baixa cobertura de tratamento de esgotos, que pode reforçar o espalhamento dessas cepas. Além disso, o tratamento convencional de efluentes, que é, em sua maioria, a tecnologia implementada nos municípios que apresentam sistemas de tratamento coletivos, podem corroborar também com a intensificação do processo de aparecimento de resistências.

Portanto, objetivou-se, dentre outras finalidades, averiguar a presença de bactérias resistentes em diferentes efluentes urbanos, bem como, propor a realização de uma etapa terciária do tratamento, com a tecnologia de Oxidação Eletroquímica Avançada (OEA) visando o abatimento de bactérias resistentes e antibiótico, conforme descrito e experimentado por Wohlmuth da Silva (2018). Avaliou-se, também, nesse processo, diferentes densidades de correntes aplicadas, a fim de averiguar o melhor custo-benefício por meio da análise de consumo energético e eficiência geral do processo de tratamento.

MATERIAIS E MÉTODOS

• COLETA DE AMOSTRAS

As amostras foram coletadas em frascos plásticos de 1 L, devidamente autoclavados. A amostra do Hospital (H) foi retirada no ponto de despejo do efluente hospitalar no sistema público de coleta, localizado aproximadamente em 29°46'30.8"S 51°09'00.4"W. Esse efluente, após despejo na rede, é encaminhado para a ETE localizada nas coordenadas aproximadas 29°46'26.0"S 51°09'24.3"W. Na estação, foi feita a coleta de amostras antes e após o tratamento do efluente. A temperatura do ar local era em torno de 22°, variando pouco ao longo do dia – que teve chuvas leves no período inicial da manhã. As coletas foram feitas no dia 02/05/2022, no período da manhã, entre as 8 h 30 min e 11 h.

Seguido destes procedimentos, foi realizado, com o esgoto tratado da ETE, o tratamento terciário por OEA. Essa etapa foi realizada no mesmo dia, poucas horas após a coleta, para que não houvesse possibilidade de desvios nos resultados causados pela replicação bacteriana. Para o monitoramento do processo de tratamento avançado (OEA) ao longo do tempo, fez-se coletas com intervalo de 15 min durante 60 min. O esquema didático da amostragem é explicado na Figura 1.

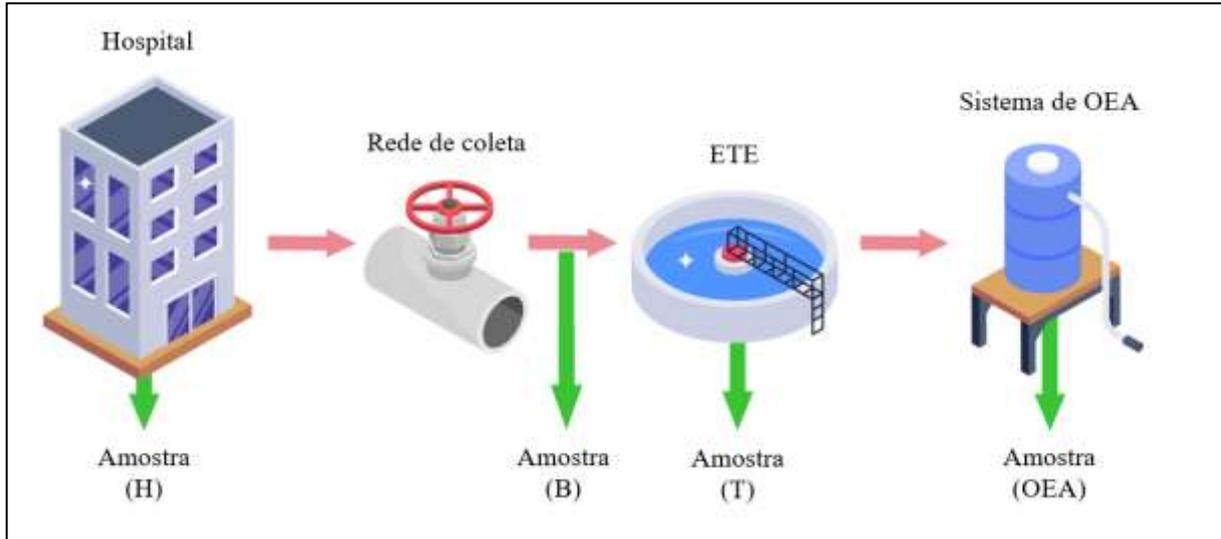


Figura 1: Plano de amostragem, onde (H) refere-se ao Hospital; (B), ao efluente que chega a estação de tratamento, ou seja, posterior ao mesmo; (T), ao efluente tratado na ETE e (OEA), ao efluente após o tratamento por Oxidação Eletroquímica Avançada.

• SISTEMA DE TRATAMENTO CONVENCIONAL

O sistema de tratamento da ETE é do tipo convencional, de reator anaeróbio seguido por aeróbio, que possui uma eficiência adotada oficial de 92,2% (AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS, 2013), com vazão afluente, no dia, de aproximados 43 L/s na entrada da estação. Na Figura 2 é possível verificar a ETE por meio de algumas fotografias tiradas no dia da coleta.



Figura 2: Estação de Tratamento de Esgotos, onde: (a) calha Parshall, onde foi realizada a coleta de efluente bruto, (b) local de coleta de amostras pós-tratamento e (c) vista geral da ETE.

- **SISTEMA DE TRATAMENTO AVANÇADO**

O sistema de tratamento avançado, utilizado como polimento, é um sistema em batelada que utiliza como cátodo uma placa de grafite e como ânodo uma placa de diamante dopado com boro (DDB). O sistema piloto, desenvolvido por Wohlmuth da Silva (2018) pode ser melhor entendido através da Figura 3.

Foram realizados, em primeiro momento, dois ensaios, em duplicada, em que a única variável alterada foi a densidade de corrente (j) aplicada no sistema. Duas bateladas foram realizadas com $j = 1 \text{ mA/cm}^2$ e as restantes com $j = 20 \text{ mA/cm}^2$. Por ser um sistema fechado, fixou-se o volume a ser tratado em cada batelada em 2 L. A vazão em todos os experimentos também foi constante, fixada em 200 L/h (Figura 2 (a)). Esse experimento inicial teve como finalidade avaliar a remoção de bactérias resistentes do efluente da ETE.

Em outro momento, realizou-se experimentos com condições e metodologias similares para a verificação da degradação do antibiótico Sulfametoxazol (SMX), que foi adicionado artificialmente ao sistema. Vale destacar que toda análise microbiológica foi realizada com o efluente que não teve a adição deste fármaco.

O tempo de tratamento estipulado, para todos ensaios, foi de 60 min, com coletas previstas a cada 15 min. Assim, com as coletas realizadas ao longo do tempo de tratamento, abriu-se a possibilidade de averiguação das mudanças dos parâmetros físicos-biológicos em função do tempo.

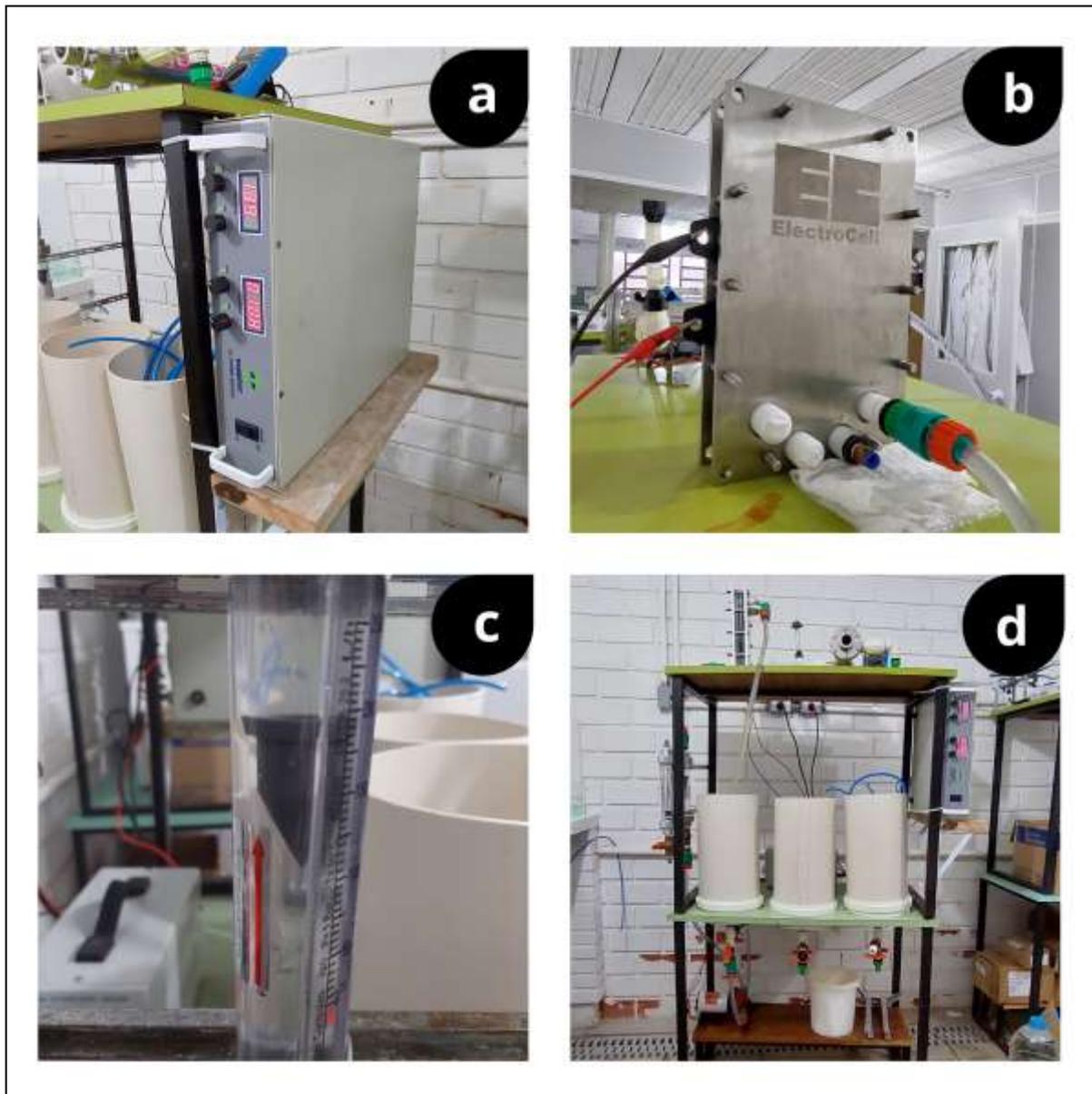


Figura 3: Sistema de tratamento avançado (OEA), onde: (a) fonte de corrente e potencial, (b) célula eletrolítica, (c) medidor de vazão e (d) vista geral do equipamento.

ANÁLISES

As amostras coletadas nos diferentes tempos de tratamento foram submetidas às análises de temperatura, potencial hidrogeniônico, condutividade, monitoramento da remoção do SMX por cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês HPLC) e microbiológicas.

As análises de pH e condutividade foram realizadas utilizando uma sonda multiparâmetros Lutron WA-2015 previamente calibrada com os respectivos padrões de acordo com o manual do fabricante.

As análises de monitoramento da concentração do SMX foram determinadas utilizando um HPLC modelo LC20A da Shimadzu, equipado com um detector UV-VIS de arranjo de diodos (do inglês Diode Array Detector, DAD) modelo SPD 20AV e amostrador automático modelo SIL-20A. Para a separação do SMX foi utilizada uma coluna Shim-pack XR ODS C18 (3,0 mm ID × 50 mm, Shimadzu). Como fase móvel A foi utilizado tampão fosfato 0,025 M (pH 2,5; 2,5 g NaH₂PO₄ · 2H₂O Merck P.A.; 0,65 mL de H₃PO₄ Synth P.A. 85%) e como fase móvel B foi utilizada acetonitrila (Merck, grau HPLC). O sistema foi operado em modo isocrático (50% fase móvel A e 50% fase móvel B) com vazão de 1 mL min⁻¹, volume de injeção de 20 µL, detecção no DAD em λ = 210 nm e temperatura de 25 °C; resultando em um tempo de retenção de 4,53 min.

A análise microbiológica foi realizada com a utilização de meios de cultura seletivos. Para fins de entendimento, a Figura 4 traz um resumo esquemático dos procedimentos adotados para a análise microbiológica.

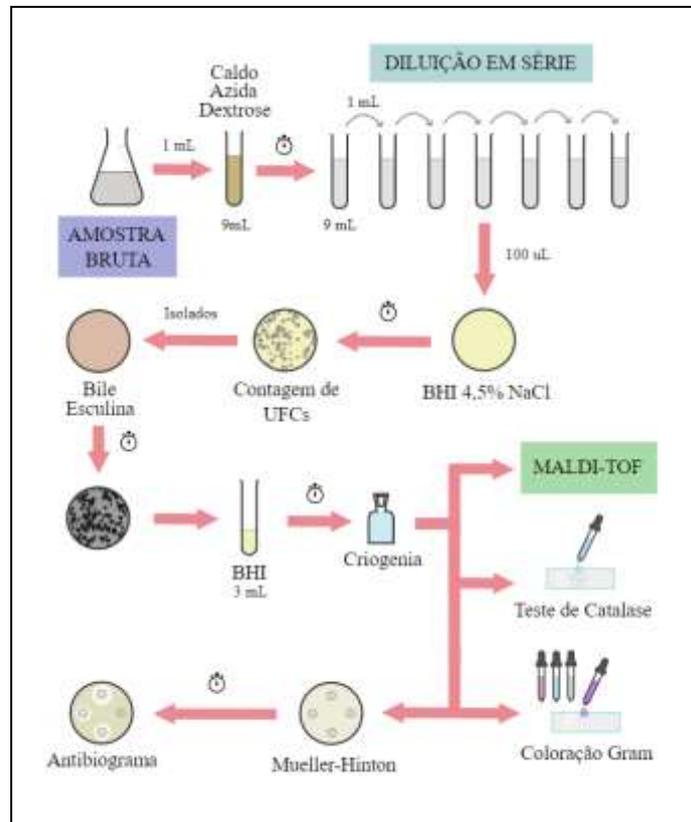


Figura 4: Esquema experimental da análise microbiológica

No mesmo dia da coleta, foi colocada uma alíquota de 1 mL de cada um dos pontos de amostragem em 9 mL de Caldo Azida Dextrose, um caldo seletivo utilizado para identificação presuntiva e enumeração de enterococos em água. A presença destes microrganismos é indicada pela turvação do caldo.

Passadas as 18 h, realizou-se diluição em série com água peptonada para que, posteriormente, fosse realizada a semeadura em superfície para a contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC), através da deposição de 100 µL da diluição referida à placa contendo o meio de cultura. Nesse caso, o meio de cultura utilizado foi o Ágar *Brain Heart Infusion* (BHI) com concentração de 4,5 % m/v de NaCl. A concentração de sal no meio garante o crescimento seletivo de enterococos, que apresentam alta resistência à salinidade, como comentado anteriormente nesse trabalho.

Após a contagem de UFC, fez-se uma seleção aleatória de colônias isoladas nas placas de BHI, a fim de se realizar o antibiograma e a identificação de espécie por meio do MALDI-TOF.

O teste de susceptibilidade a antibióticos, chamado de antibiograma, tem como finalidade identificar a resistência bacteriana de forma econômica e prática. Esse método foi aplicado a todos os isolados de enterococos, a fim de apontar as resistências e susceptibilidades das espécies a determinados antibióticos. O padrão utilizado nesse trabalho foi a 28ª edição, datada de 2018, do documento intitulado “*Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*”, elaborado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Os enterococos isolados foram avaliados quanto ao perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos através da técnica de difusão de disco em meio Ágar *Muller Hilton*, como preconiza o método *Kirby-Bauer*. Os isolados serão testados para os seguintes antimicrobianos: Estreptomicina (300 µg), Ampicilina-AMP (10 µg), Vancomicina-VAN (30 µg), Rifampicina-RIF (5 µg), Tetraciclina-TET (30 µg), Ciprofloxacina-CIP (5 µg), Norfloxacina-NOR (10 µg), Cloranfenicol-CLO (30 µg), Nitrofurantoína-NIT (300 µg), Linezolida-LNZ (30 µg), Eritromicina-ERI (15 µg) e Gentamicina-GEN (200 µg).

RESULTADOS

Como mencionado anteriormente, houve dois momentos de tratamento do efluente da ETE. Primeiramente, serão apresentados os resultados de degradação do antibiótico SMX e posteriormente serão apresentados e discutidos os resultados de caráter biológico.

DEGRADAÇÃO DE SULFAMETOXAZOL

A degradação de antibióticos em processos avançados aplicados como polimento de efluentes sanitários é um passo importante para a diminuição de seu lançamento no ambiente, e assim, de maneira direta reduzir a possibilidade de resistência microbiana em matrizes ambientais.

Para tanto, uma concentração conhecida do antibiótico SMX foi adicionada ao efluente coletado após o decantador secundário da ETE e encaminhado ao processo de OEA. Cabe destacar, inclusive, que o SMX já detectado nas águas superficiais da região metropolitana de Porto Alegre/RS (PERIN et al., 2021), portanto a discussão torna-se pertinente tendo em vista essa observação.

Observa-se na Figura 5 dois regimes distintos de degradação do SMX, a depender da densidade de corrente (j) aplicada, 10 ou 20 mA/cm². Wohlmuth da Silva et al. (2019), por meio de experimentos realizados no mesmo sistema de OEA utilizado nesse trabalho, que visavam a avaliação da degradação do fármaco atenolol, verificou que, dependendo da densidade de corrente aplicada no efluente, os meios de degradação se alteravam, levando a diferentes subprodutos inorgânicos e orgânicos (DA SILVA et al., 2019).

Ademais, as diferentes densidades de corrente conferem distintas leis cinéticas. Quando aplicadas densidades baixas, pode-se considerar a reação de ordem zero, gerando boas aproximações (DA SILVA et al., 2019). Para a densidade de corrente de 10 mA/cm², seguindo a Lei de ordem zero, podemos integrar da seguinte forma, na Equação 1; onde $[SMX]$ é a concentração do antibiótico ao longo do tempo; $[SMX]_0$ é a concentração inicial do antibiótico adicionada no sistema; k_z é a constante cinética de ordem zero e t é o tempo de tratamento.

$$[SMX] = [SMX]_0 - k_z t \quad \text{equação (1)}$$

Com base na equação 1, chegou-se a uma constante cinética de 0,012 L/min e um ajuste de $R^2 = 0,99$.

Já para densidades de correntes maiores, como é o caso de 20 mA/cm², considera-se que ocorre uma reação que obedece a Lei de primeira ordem podendo ser integrada da seguinte forma, descrita na equação 2 (onde k é a constante cinética de primeira ordem).

$$[SMX] = [SMX]_0 e^{-kt} \quad \text{equação (2)}$$

Esta relação matemática pode ser confirmada por meio da linearização do sistema, de acordo com o gráfico inserido na Figura 5. Com base na equação da reta do gráfico inserido, chegou-se a uma constante cinética de 0,032 L/min e um ajuste de $R^2 = 0,99$. Isso significa que ao aplicar uma densidade de corrente maior, mais rápida será a degradação do SMX via radicais hidroxila, radicais sulfato e espécies de cloro geradas no ânodo (DA SILVA et al., 2019).

Já na Figura 5(b) está demonstrado o consumo energético específico em kWh para degradar um quilograma de SMX. A equação utilizada para o cálculo do consumo está descrita no trabalho de Heberle et al. (HEBERLE et al., 2022).

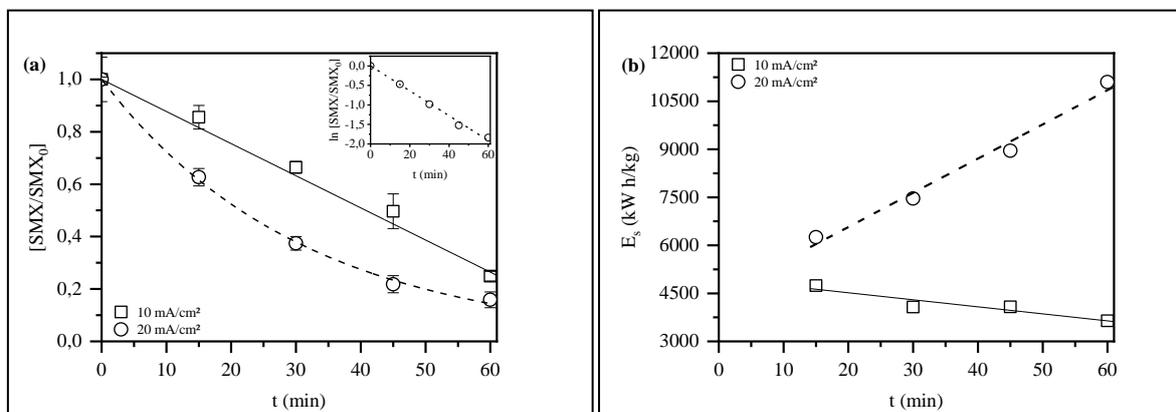


Figura 5: Concentração de SMX ao longo do tempo de tratamento (a) e consumo energético (b) para distintas densidades de corrente

Quando aplicado 10 mA/cm², de acordo com Panizza et al. (2008), a eficiência do processo eletroquímico tende a ser próximo de 100%, significando que a corrente aplicada no sistema está sendo utilizada na oxidação do SMX, tendendo a apresentar menor consumo energético ao longo do tempo. Por outro lado, quando aplicado 20 mA/cm², os compostos orgânicos geralmente são completamente transformados em gás carbônico, configurando degradação rápida. Entretanto, reações secundárias (como evolução de oxigênio) se iniciam, resultando em uma diminuição de eficiência geral, causando maior consumo energético – algo que, do ponto de vista de aplicabilidade da tecnologia, é prejudicial.

Para ambas as densidades de corrente aplicadas, observou-se diminuição de valores de pH e condutividade. O decaimento dos valores absolutos de pH pode estar associado ao desbalanço das reações eletroquímicas, que acarreta acúmulo de H⁺ no meio. Já a diminuição da condutividade pode estar associada a degradação de matéria orgânica dissolvida que possui carga superficial – que pode exercer a função de transportador de carga. Pode ter havido também consumo de íons sulfato e cloreto na geração de oxidantes utilizados para degradar o SMX. A Figura 6 traz a relação destas variáveis em função do tempo.

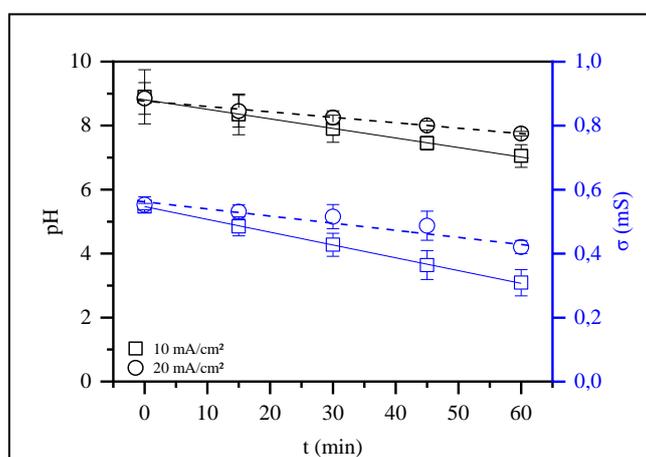


Figura 6: Valores de pH e condutividade (σ) ao longo do tratamento de efluente por OEA.

INATIVAÇÃO MICROBIOLÓGICA

Conforme comentado, houve dois momentos de tratamento do efluente da ETE. Em primeiro momento foram discutidos os resultados de degradação do SMX, e agora, serão discutidos os resultados referentes à inativação de microrganismos. Espera-se, que essa inativação seja elevada, visto a intensidade de diferença de potencial e corrente elétrica que foram propostas para a realização do experimento. Experimentos anteriores, como os apresentados por Chen et al. (2021) fundamentam a hipótese. Os regimes primários e secundários de desinfecção, por meio de OEA, incluem a destruição da membrana celular, enzimas, parede celular e material genético intracelular, ou seja, há uma degradação conjunta de todos os fatores bioquímicos essenciais para a vida bacteriana, garantindo alta eficiência para o processo.

Diferentemente do processo visando a degradação do SMX, onde é possível quantificar sua concentração no sistema, e assim, estimar o consumo energético em kWh para remover 1 kg de SMX; para a inativação microbiológica, o consumo energético global do sistema foi obtido através do produto do tempo de duração do experimento, diferença de potencial e corrente elétrica aplicados. Para a diferença de potencial, fez-se uma média dos valores averiguados no intervalo do experimento de 60 min, e os resultados obtidos para $j = 10$ e 20 mA/cm² foram de $0,013 \pm 0,0001$ e $0,027 \pm 0,0006$ kW, respectivamente.

• UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS

Após a inoculação da amostra em Caldo Azida Destroze, e passadas as 18h em estufa de 37°C, verificou-se a turvação dos tubos. Os meios não turvaram para as amostras provenientes do sistema de tratamento avançado. Para se ter a certeza de que não havia presença de microrganismos nas amostras, optou-se por esperar mais 18 h em 37°C. Mesmo assim, os caldos não turvaram. Passadas as 18 h para os tubos turvados e 36 h para os tubos translúcidos, realizou-se diluição em série das amostras, fundamental para a realização da

contagem de UFCs, feita pelo método de semeadura em superfície, nesse experimento em ágar BHI 4,5% m/v de NaCl.

Passada a realização da semeadura em superfície, pode-se, após 18 h, realizar a contagem. Sendo assim, tem-se os valores de UFCs na Tabela 1. A contagem foi realizada em duplicata para cada ponto. Para os pontos OEA 45-I e OEA 45-II não foi realizada a semeadura em BHI, visto baixa possibilidade de presença de bactérias após tratamento prolongado.

Tabela 1: Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs).

AMOSTRA	TURVAÇÃO	UFC
Hospital (H)	Sim	$5,21 \times 10^6$
Bruto (B)	Sim	$8,6 \times 10^6$
Tratado (T)	Sim	1×10^6
Oxidação Eletroquímica Avançada 15min de tratamento com 1A (OEA 15-I)	Não	Zero
Oxidação Eletroquímica Avançada 30min de tratamento com 1A (OEA 30-I)	Não	Zero
Oxidação Eletroquímica Avançada 45min de tratamento com 1A (OEA 45-I)	Não	-
Oxidação Eletroquímica Avançada 15min de tratamento com 2A (OEA 15-II)	Não	Zero
Oxidação Eletroquímica Avançada 30min de tratamento com 2A (OEA 30-II)	Não	Zero
Oxidação Eletroquímica Avançada 45min de tratamento com 2A (OEA 45-II)	Não	-

A ausência de bactérias nas amostras provenientes do processo de oxidação eletroquímica avançada sugere alta eficiência. Esses resultados estão de acordo com o verificado na análise de coliformes totais, realizada através da tecnologia IDEXX Quanti-Tray 2000®. Os resultados obtidos de número mais provável (NMP) da análise das amostras podem ser verificados na tabela 2.

Tabela 2: NMP para as amostras, utilizando a tecnologia IDEXX Quanti-Tray 2000®.

AMOSTRA	NMP/100mL
Hospital (H)	> 2419,6
Bruto (B)	> 2419,6
Tratado (T)	> 2419,6
Oxidação Eletroquímica Avançada 60min de tratamento com 1A (OEA 60-I)	< 1
Oxidação Eletroquímica Avançada 60min de tratamento com 2A (OEA 60-II)	< 1

Fonte: Próprio autor.

- **SELEÇÃO DE ISOLADOS E IDENTIFICAÇÃO POR MALDI-TOF**

A seleção de colônias isoladas foi realizada aleatoriamente, buscando obter diferentes morfologias de colônia, a fim de se tentar alcançar o maior número de espécies distintas. As colônias foram retiradas diretamente do ágar BHI utilizado para a contagem de UFCs e logo foram semeadas em ágar Bile Esculina. No total, foram selecionadas 56 colônias bacterianas.

A passagem das colônias para a Bile Esculina permite melhor seleção das bactérias. O crescimento em ágar BHI 4,5% NaCl e posterior escurecimento do meio no ágar Bile Esculina garante boas chances de que a colônia em questão possa pertencer ao gênero enterococos.

As colônias que apresentaram capacidade de hidrolisar o glicosídeo esculina em esculetina e dextrose, causando a formação de complexo castanho-escuro – que contém sal de ferro, foram encaminhadas para análise em MALDI-TOF, para a identificação, se possível, da espécie bacteriana em questão. Concomitantemente, o teste de catalase e Coloração Gram foi realizada para os isolados. Os isolados que não se mostraram gram-positivos e/ou apresentaram resultado positivo para o teste catalase foram descartados. A identificação obtida para os isolados de enterococos pode ser verificada na Tabela 3.

Tabela 3: Identificação das espécies dos isolados.

ISOLADO	PROVENIÊNCIA	ORGANISMO	DESCRIÇÃO
3	Hospital	<i>Enterococcus faecium</i>	Provável identificação de gênero.
5	Hospital	<i>Enterococcus hirae</i>	Provável identificação de gênero.
7	Hospital	<i>Enterococcus hirae</i>	Provável identificação de gênero.
10	Hospital	<i>Enterococcus hirae</i>	Identificação segura do gênero e provável identificação de espécie.
11	Hospital	<i>Enterococcus hirae</i>	Provável identificação de gênero.
12	Hospital	<i>Enterococcus hirae</i>	Identificação segura do gênero e provável identificação de espécie.
16	Hospital	<i>Enterococcus hirae</i>	Identificação segura do gênero e provável identificação de espécie.
17	Hospital	<i>Enterococcus faecium</i>	Identificação segura do gênero e provável identificação de espécie.
18	Hospital	<i>Enterococcus hirae</i>	Provável identificação de gênero.
29	Bruto	<i>Enterococcus faecium</i>	Identificação segura do gênero e provável identificação de espécie.
30	Bruto	<i>Enterococcus hirae</i>	Alta probabilidade de identificação de espécie.
53	Tratado	<i>Enterococcus hirae</i>	Alta probabilidade de identificação de espécie.
54	Tratado	<i>Enterococcus hirae</i>	Alta probabilidade de identificação de espécie.
55	Tratado	<i>Enterococcus hirae</i>	Alta probabilidade de identificação de espécie.
56	Tratado	<i>Enterococcus hirae</i>	Identificação segura do gênero e provável identificação de espécie.

• ANTIBIOGRAMA E ANÁLISE DE RESISTÊNCIA

Os antibióticos utilizados para a análise do perfil de resistência foram: Ampicilina (AMP), Ciprofloxacina (CIP), Clororanfenicol (CLO), Eritromicina (ERI), Estreptomicina (EST), Gentamicina (GEN), Linezolida (LNZ), Nitrofuratoína (NIT), Norfloxacina (NOR), Rifampicina (RIF), Tetraciclina (TET) e Vancomicina (VAN).

A interpretação dos valores de diâmetro dos halos, conforme CSLI e BrCAST, classificando a susceptibilidade dos isolados estão apresentados na Tabela 4. A LNZ não consta no CSLI; portanto, os valores de ponto de corte para este antibiótico citado foram retirados do BrCAST. Cabe destacar que “R” = Resistente, “I” = Resistência intermediária, “S” = susceptível e “-” = medida do halo impossível de se realizar com exatidão.

Tabela 4: Susceptibilidade a antimicrobianos dos isolados.

ISOLADO	ANTIBIÓTICO E RESPECTIVA SUSCEPTIBILIDADE											
	AMP	CIP	CLO	ERI	EST	GEN	LNZ	NIT	NOR	RIF	TET	VAN
3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
5	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
7	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
10	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
11	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
12	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
16	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
17	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
18	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
29	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	S	S
30	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
53	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
54	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
55	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
56	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	R	S

Verifica-se, portanto, que há presença de bactérias resistentes à TET no sistema da ETE Vicentina. Tal resistência ao fármaco já foi averiguada em populações de enterococos em outras ETEs no Brasil (DA SILVA *et al.*, 2006).

Deve-se atentar, também, ao fato de que não se pode afirmar que a resistência encontrada para os organismos isolados da estação de tratamento é proveniente de cepas hospitalares. Entretanto, pode-se inferir que o ambiente da ETE – caracterizado, dentre outras variáveis, pelo alto tempo de residência e elevada concentração de microrganismos – favorece a troca de genes de resistência entre as espécies e comunidades microbianas no local, acarretando em consequente facilidade de aquisição desses genes pelos microrganismos. Essa observação põe em destaque a necessidade da realização de um tratamento posterior ao convencional, visto que esses microrganismos podem apresentar potencial risco à saúde humana.

CONCLUSÃO

Dessa forma, como demonstrado, o tratamento convencional de ETE não possui a capacidade de remover por completo a carga bacteriana do esgoto – bem como as bactérias resistentes. Portanto, a tecnologia apresentada nesse trabalho mostra-se, como uma alternativa de remoção completa de microrganismos do efluente.

Ademais, sua versatilidade e capacidade de degradação de diversos fármacos atestam a viabilidade de implementação desses sistemas eletroquímicos avançados em localidades com disposição frequente de efluentes que contenham medicamentos e bactérias patogênicas, com possível traços de resistência – como é o caso de hospitais. A utilização do enterococos como organismo sentinela possibilita afirmar, com teor maior de certeza, que boa parte das bactérias são inativadas durante o processo de OEA, visto que este microrganismo apresenta alta resistência a estressores ambientais.

Apesar de custo de implementação, o sistema mostrou-se eficaz na inativação de microrganismos - até mesmo na aplicação da menor densidade de corrente estudada, de 10 mA/cm², por um período curto, de somente 15 minutos. Essas observações podem indicar um baixo gasto com energia elétrica que o sistema pode vir a demandar para o tratamento. Assim, o custo da tecnologia pode justificar-se devido sua alta eficiência de degradação de fármacos e da inativação de microrganismos.

REFERÊNCIAS

1. AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS. RELATÓRIO DE ESGOTAMENTO SANITÁRIO MUNICIPAL DE SÃO LEOPOLDO. , 2013. Disponível em: Acesso em: 11 jun. 2022.
2. ANDRADE, Leonardo Capeleto de et al. Lago Guaíba: uma análise histórico-cultural da poluição hídrica em Porto Alegre, RS, Brasil. Engenharia Sanitária e Ambiental, [s. l.], v. 24, n. 2, p. 229–237, 2019.
3. ANDRADE, Rodrigo da Rocha; GIROLDO, Danilo. Limnological characterisation and phytoplankton seasonal variation in a subtropical shallow lake (Guaiba Lake, Brazil): a long-term study. Acta Limnologica Brasiliensia, [s. l.], v. 26, n. 4, p. 442–456, 2014.

4. ARSAND, Juliana Bazzan et al. Presence of antibiotic resistance genes and its association with antibiotic occurrence in Dilúvio River in southern Brazil. *Science of The Total Environment*, [s. l.], v. 738, p. 139781, 2020.
5. ARSAND, Juliana Bazzan et al. Wide-Scope Determination of Pharmaceuticals and Pesticides in Water Samples: Qualitative and Confirmatory Screening Method Using LC-qTOF-MS. *Water, Air, & Soil Pollution*, [s. l.], v. 229, n. 12, p. 399, 2018.
6. BILA, Daniele Maia; DEZOTTI, Márcia. Fármacos no meio ambiente. *Química Nova*, [s. l.], v. 26, n. 4, p. 523–530, 2003.
7. BUELOW, Elena; PLOY, Marie-Cecile; DAGOT, Christophe. Role of pollution on the selection of antibiotic resistance and bacterial pathogens in the environment. *Current Opinion in Microbiology*, [s. l.], v. 64, p. 117–124, 2021.
8. BYAPPANAHALLI, Muruleedhara N. et al. Enterococci in the Environment. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, [s. l.], v. 76, n. 4, p. 685–706, 2012.
9. CHEN, Yi-di et al. Advanced oxidation processes for water disinfection: Features, mechanisms and prospects. *Chemical Engineering Journal*, [s. l.], v. 409, p. 128207, 2021.
10. CHEN, Lei et al. Inactivation of antibiotic-resistant bacteria and antibiotic resistance genes by electrochemical oxidation/electro-Fenton process. *Water Science and Technology*, [s. l.], v. 81, n. 10, p. 2221–2231, 2020.
11. CLARA, M. et al. The solids retention time—a suitable design parameter to evaluate the capacity of wastewater treatment plants to remove micropollutants. *Water Research*, [s. l.], v. 39, n. 1, p. 97–106, 2005.
12. COMNINELLIS, Christos. Electrocatalysis in the electrochemical conversion/combustion of organic pollutants for waste water treatment. *Electrochimica Acta*, [s. l.], v. 39, n. 11–12, p. 1857–1862, 1994.
13. DA SILVA, Miguel Ferreira et al. Antibiotic resistance of enterococci and related bacteria in an urban wastewater treatment plant: Antibiotic resistance of enterococci in wastewater. *FEMS Microbiology Ecology*, [s. l.], v. 55, n. 2, p. 322–329, 2006.
14. DA SILVA, Salatiel Wohlmuth et al. Electrochemical advanced oxidation of Atenolol at Nb/BDD thin film anode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, [s. l.], v. 844, p. 27–33, 2019.
15. DE OLIVEIRA, Ana Julia Fernandes Cardoso; WATANABE PINHATA, Juliana Maira. Antimicrobial resistance and species composition of *Enterococcus* spp. isolated from waters and sands of marine recreational beaches in Southeastern Brazil. *Water Research*, [s. l.], v. 42, n. 8–9, p. 2242–2250, 2008.
16. FATTA-KASSINOS, Despo; MERIC, Sureyya; NIKOLAOU, Anastasia. Pharmaceutical residues in environmental waters and wastewater: current state of knowledge and future research. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, [s. l.], v. 399, n. 1, p. 251–275, 2011.
17. FRANZ, Charles M.A.P. et al. Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *International Journal of Food Microbiology*, [s. l.], v. 151, n. 2, p. 125–140, 2011.
18. FRYDA, M. et al. Applications of DIACHEM® Electrodes in Electrolytic Water Treatment. *The Electrochemical Society Interface*, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 40–44, 2003.
19. FUJIOKA, R S et al. Effect of sunlight on survival of indicator bacteria in seawater. *Applied and Environmental Microbiology*, [s. l.], v. 41, n. 3, p. 690–696, 1981.
20. GOGOI, Anindita et al. Occurrence and fate of emerging contaminants in water environment: A review. *Groundwater for Sustainable Development*, [s. l.], v. 6, p. 169–180, 2018.
21. HARDIE, J.M.; WHILEY, R.A. Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Journal of Applied Microbiology*, [s. l.], v. 83, n. S1, p. 1S-11S, 1997.
22. HEBERLE, Alan Nelson Arenhart et al. Evaluation of an electrochemical membrane reactor for the removal of β -blocker compound from water. *Journal of Water Process Engineering*, [s. l.], v. 47, p. 102830, 2022.
23. JJEMBA, Patrick K. Excretion and ecotoxicity of pharmaceutical and personal care products in the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, [s. l.], v. 63, n. 1, p. 113–130, 2006.
24. JOBIN, Giordano. DISPERSÃO DE POLUENTES: SIMULAÇÃO NUMÉRICA DO LAGO GUAÍBA. 2012. 67 f. - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/63189>. Acesso em: 24 jan. 2022.
25. JOHNSON, Cydney N. et al. Let Me Upgrade You: Impact of Mobile Genetic Elements on Enterococcal Adaptation and Evolution. *Journal of Bacteriology*, [s. l.], v. 203, n. 21, p. e00177-21, 2021.

26. JUTKINA, J. et al. Antibiotics and common antibacterial biocides stimulate horizontal transfer of resistance at low concentrations. *Science of The Total Environment*, [s. l.], v. 616–617, p. 172–178, 2018.
27. KÖCK-SCHULMEYER, Marianne et al. Occurrence and behavior of pesticides in wastewater treatment plants and their environmental impact. *Science of The Total Environment*, [s. l.], v. 458–460, p. 466–476, 2013.
28. MACHADO, Kelly C. et al. A preliminary nationwide survey of the presence of emerging contaminants in drinking and source waters in Brazil. *Science of The Total Environment*, [s. l.], v. 572, p. 138–146, 2016.
29. MARTÍNEZ-HUITLE, Carlos A.; FERRO, Sergio. Electrochemical oxidation of organic pollutants for the wastewater treatment: direct and indirect processes. *Chem. Soc. Rev.*, [s. l.], v. 35, n. 12, p. 1324–1340, 2006.
30. MARTINS DA COSTA, Paulo; VAZ-PIRES, Paulo; BERNARDO, Fernando. Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. isolated in inflow, effluent and sludge from municipal sewage water treatment plants. *Water Research*, [s. l.], v. 40, n. 8, p. 1735–1740, 2006.
31. MENA, Perozo et al. Resistencia a Vancomicina en Cepas de *Enterococcus faecium* Aisladas en un Hospital Universitario. [s. l.], p. 11, 2011.
32. MURRAY, Christopher JL et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, [s. l.], p. S0140673621027240, 2022.
33. MURRAY, B E. The life and times of the *Enterococcus*. *ASM Journals: Clinical Microbiology Reviews*, [s. l.], v. 3, p. 20, 1990.
34. PANIZZA, Marco; CERISOLA, Giacomo. Direct And Mediated Anodic Oxidation of Organic Pollutants. *Chemical Reviews*, [s. l.], v. 109, n. 12, p. 6541–6569, 2009.
35. POSSAVATZ, Juliana et al. Resíduos de pesticidas em sedimento de fundo de rio na Bacia Hidrográfica do Rio Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. *Ambiente e Agua - An Interdisciplinary Journal of Applied Science*, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 83–96, 2014.
36. RAJASEKHAR, Bokam et al. Comprehensive treatment of urban wastewaters using electrochemical advanced oxidation process. *Journal of Environmental Management*, [s. l.], v. 266, p. 110469, 2020.
37. RODGERS, Kiri et al. Can the legacy of industrial pollution influence antimicrobial resistance in estuarine sediments?. *Environmental Chemistry Letters*, [s. l.], v. 17, n. 2, p. 595–607, 2019.
38. SCHNOOR, Jerald L. Re-Emergence of Emerging Contaminants. *Environmental Science & Technology*, [s. l.], v. 48, n. 19, p. 11019–11020, 2014.
39. SINTON, L W; DAVIES-COLLEY, R J; BELL, R G. Inactivation of enterococci and fecal coliforms from sewage and meatworks effluents in seawater chambers. *Applied and Environmental Microbiology*, [s. l.], v. 60, n. 6, p. 2040–2048, 1994.
40. SIRÉS, Ignasi et al. Electrochemical advanced oxidation processes: today and tomorrow. A review. *Environmental Science and Pollution Research*, [s. l.], v. 21, n. 14, p. 8336–8367, 2014.
41. TREE, Julia A.; ADAMS, Martin R.; LEES, David N. Chlorination of Indicator Bacteria and Viruses in Primary Sewage Effluent. *Applied and Environmental Microbiology*, [s. l.], v. 69, n. 4, p. 2038–2043, 2003.
42. TYRRELL, S; RIPPEY, S.; WATKINS, W. Inactivation of bacterial and viral indicators in secondary sewage effluents, using chlorine and ozone. *Water Research*, [s. l.], v. 29, n. 11, p. 2483–2490, 1995.
43. VON WINTERSDORFF, Christian J. H. et al. Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. *Frontiers in Microbiology*, [s. l.], v. 7, 2016. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2016.00173/abstract>. Acesso em: 24 jan. 2022.
44. WANG, Yue et al. Non-antibiotic pharmaceuticals enhance the transmission of exogenous antibiotic resistance genes through bacterial transformation. *The ISME Journal*, [s. l.], v. 14, n. 8, p. 2179–2196, 2020.
45. WOHLMUTH DA SILVA, Salatiel. Tratamento de águas residuárias contaminadas com poluentes orgânicos emergentes utilizando processos avançados de oxidação. 2018. - Universitat Politècnica de València, Valencia (Spain), 2018. Disponível em: <https://riunet.upv.es/handle/10251/107958>. Acesso em: 25 jan. 2022.