

# ESTUDO DA RESISTÊNCIA BACTERIANA NO LODO DE ESGOTO SANITÁRIO EM DIFERENTES SISTEMAS DE TRATAMENTO

Thiara Reis Lopes<sup>a</sup>, Fernando Periotto<sup>b</sup>, Adelmo Lowe Pletsch<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Universidade Tecnológica Federal do Paraná, e-mail: thiara1op@gmail.com; <sup>b</sup>Universidade Federal de São Carlos, e-mail: ferperiotto@yahoo.com.br; <sup>c</sup>Universidade Tecnológica Federal do Paraná, e-mail: adelmo@utfpr.edu.br

**Palavras-chave:** *E. coli*, *Salmonella* sp., Antibióticos.

## Introdução

Os antibióticos são agentes quimioterápicos utilizados extensivamente na medicina humana e veterinária, com a finalidade de prevenir ou propiciar o tratamento de infecções microbianas. Após a administração ou descarte inadequado, os antibióticos e seus metabólitos, passam a constituir os esgotos destinados à estação de tratamento de esgoto (ETE) (KÜMMERER, 2009).

Durante o processo de tratamento de esgoto, na ETE, os antibióticos e seus metabólitos, geralmente, são transferidos da fase líquida para a sólida, passam a constituir parte do resíduo sólido gerado no sistema de tratamento, denominado lodo ou biomassa excedente, aumentando os riscos relacionados à disposição final ou reuso agrícola (AQUINO *et al.*, 2013).

Desde 1940, é cada vez maior a variedade e o uso de antibióticos destinados ao uso humano e veterinário, conseqüentemente, a baixa remoção destes nas ETEs, pode contribuir com a inserção de antibióticos e microrganismos resistentes no ambiente e proporcionar a seleção e manutenção constante de populações de cepas resistentes (AQUINO *et al.*, 2013; KÜMMERER, 2009; DAVIES; DAVIES, 2010).

A caracterização biológica no esgoto e no lodo de esgoto (LE), é fundamental para o controle de doenças ocasionadas por organismos patogênicos de origem humana e possibilita avaliar a presença de microrganismos responsáveis pela degradação biológica da matéria orgânica nas ETEs. As bactérias patogênicas, de origem humana, geralmente provocam doenças do trato intestinal, como febre tifoide, disenteria, diarreia e cólera. Por serem microrganismos potencialmente infecciosos, são responsáveis por milhares de mortes em áreas carentes de saneamento, especialmente nas regiões tropicais (METCALF; EDDY, 2003).

A elevada diversidade de organismos patogênicos nos esgotos, dificulta o isolamento e a identificação dos microrganismos. Como cada pessoa elimina cerca de 100 a 400 bilhões de bactérias coliformes por dia, estas são frequentemente utilizadas como indicadoras de

contaminação fecal (METCALF; EDDY, 2003).

O objetivo deste estudo foi verificar a ocorrência de indicadores de contaminação fecais como a *Salmonella* sp. e *Escherichia coli* no lodo produzido em duas ETEs, localizados no oeste do estado do Paraná, avaliar a susceptibilidade desses microrganismos aos antibióticos: Amoxicilina (10 µg), Tetraciclina (30 µg), Gentamicina (10 µg), e Cefalotina (30 µg), Ciprofloxacina (5 µg) e contribuir para futuros estudos, os quais podem ser fundamentados nos dados aqui levantados.

## Material e Métodos

### Delimitação da área de estudo

O trabalho de campo compreendeu três amostragens, realizadas nos meses de dezembro de 2013, fevereiro e abril de 2014, as amostras de lodo de esgoto foram coletadas nas ETEs localizadas na cidade de Medianeira e de Santa Helena, com o uso de uma draga do tipo *Pettersen*, exceto no Leito de Secagem (LS), no qual, foram coletadas amostras compostas. Todas foram acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas em caixas de isopor com gelo. No laboratório, foram armazenadas sob refrigeração a 4 °C, o tempo de coleta e armazenagem em laboratório ocorreram em até 6 horas. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Análises Microbiológicas e Físico-Químicas de Alimentos e Água – LAMAG, da UTFPR, campus Medianeira, PR. *Métodos adotados para as determinações físico-químicas*

A verificação da temperatura das lagoas da ETE foi realizada com o uso de uma sonda modelo: DO-5519. O potencial hidrogênionico foi determinado eletronicamente na suspensão do lodo em água. A leitura efetuada em um potenciômetro (DONAGEMA *et al.*, 2011).

*Procedimentos adotados nas determinações biológicas*  
O isolamento de *E. coli* e *Salmonella* sp. seguiram os procedimentos propostos por Silva *et al.* (2007). Na análise de *E. coli*, foram inoculadas amostras de LE nas

diluições de  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  em tubos de Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST). Após a diluição, os tubos de LST foram incubados a 35 °C durante 48 h. A observação de crescimento com produção de gás, após a incubação, é considerada suspeita da presença de coliformes. De cada tubo suspeito, com produção de gás, foi transferida para tubos com Caldo *E. coli* (EC), e incubados em banho-maria a 44,5 °C por 48 h. A confirmação da presença de *E. coli*, foi realizada com cada tubo de EC com produção de gás em 48 h, nesta etapa, uma alçada de cada tubo foi estriada em placas de Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB), um meio seletivo diferencial para distinguir *E. coli* dos demais coliformes termotolerantes. Estas placas foram incubadas a 35 °C por 24 h. Após o período de incubação, foi possível observar a ocorrência ou não do desenvolvimento de colônias típicas de *E. coli*.

Para a detecção de *Salmonella* sp. nas amostras de lodo, 25 g de lodo foram adicionadas juntamente com 225 mL de caldo de pré-enriquecimento (água peptonada tamponada), homogeneizadas e incubadas a 35 °C por 48 h com as embalagens ligeiramente afrouxadas. Cada embalagem foi agitada e foram transferidos 0,1 mL para 10,0 mL de Caldo Rappaport Vasiliadis Modificado (RV), incubados a 41 °C durante 24 h. Após o enriquecimento seletivo, foi realizado o plaqueamento diferencial, nesta etapa, de cada cultura do RV, foi estriada uma alçada (estrias de esgotamento) em placas de Ágar Entérico de Hectroen (HE), incubadas invertidas a 35 °C por 24 h. Para a confirmação bioquímica de *Salmonella* sp., uma porção do centro da colônia típica foi transferida para tubos de ágar tríplice açúcar ferro e tubos de ágar lúcia ferro. A inoculação foi efetuada por picada e estriação na rampa, com o uso da mesma alçada para inocular ambos os tubos, incubados a 35 °C por 24 h.

A avaliação da sensibilidade a antibióticos foi realizada com a execução de antibiogramas. Estes testes foram realizados em duplicata conforme a metodologia do *Clinical and Laboratory Standards Institute* e *National Committee for Clinical Laboratory Standards - CLSI/NCCLS document M2-A8* (2003). A interpretação dos Halos de inibição foi conforme o *CLSI/NCCLS document M100-S15* (2005).

## Resultados e Discussão

As maiores temperaturas foram registradas durante o mês de dezembro e fevereiro, variaram de 36 a 22 °C. Os lodos apresentaram pH próximos a neutralidade, com leve característica de acidez, no lodo do RALF o pH variou de 4,67 a 7,37, no Leito de Secagem (LS) de 2,62 a 7,79 e nas lagoas de 4,8 a 7,5, estiveram próximos a faixa ideal à existência de maior diversidade biológica, entre 6 a 9 (METCALF; EDDY, 2003).

Os resultados das análises de *Salmonella* sp. no lodo de esgoto das lagoas da ETE (Tabela 1), e para *E. coli* (Tabela 2), foram expressos como presença ou ausência, conforme o método confirmativo utilizado.

**Tabela 1 – Ocorrência de *Salmonella* sp. no lodo de esgoto in natura – coletas de dezembro de 2013, fevereiro e abril de 2014.**

Pontos de amostragem	Mês		
	Dezembro/2013	Fevereiro/2014	Abril/2014
RALF	-	Ausência	Presença
LS	-	Ausência	Presença
Lagoa 1	Ausência	Presença	Presença
Lagoa 2	Presença	Presença	Ausência
Lagoa 3	Presença	Ausência	Ausência
Lagoa 4	Ausência	Ausência	Presença

(-) Análise não realizada; LS – Leito de Secagem.

O lodo do LS, em fevereiro, levemente ácido pode ter inibido a ocorrência desse microrganismo, outros parâmetros não estimados no lodo, como a concentração de antibióticos, são potenciais indícios da redução dessa bactéria nas ETEs. A presença ou não de *E. coli* no lodo da lagoa 4 (Tabela 2), foi semelhante aos resultados obtidos com a *Salmonella* sp., isso mostra, a similaridade das condições, físico-químicas, que permitiram a sobrevivência ou declínio desses microrganismos.

**Tabela 2 – Ocorrência de *E. coli* no lodo de esgoto in natura – coletas de dezembro de 2013, fevereiro e abril de 2014.**

Pontos de amostragem	Mês		
	Dezembro/2013	Fevereiro/2014	Abril/2014
RALF	-	Presença	Presença
LS	-	Presença	Presença
Lagoa 1	Presença	Ausência	Presença
Lagoa 2	Presença	Presença	Presença
Lagoa 3	Presença	Presença	Presença
Lagoa 4	Ausência	Ausência	Ausência

(-) Análise não realizada; LS – Leito de Secagem.

Nas lagoas, o sistema promoveu a redução de *E. coli* devido à ausência dessa bactéria no lodo da última lagoa, isso pode ser resultado de condições desfavoráveis para a manutenção desses microrganismos. A presença de *Salmonella* sp. na última lagoa é preocupante, e indica a necessidade de monitorar os esgotos tratados.

Os resultados dos antibiogramas realizados com os isolados de *Salmonella* sp. do lodo das ETEs estão descritos na Tabela 3.

**Tabela 3 – Antibiogramas com *Salmonella* sp. do lodo da ETE operada com RALF e da ETE operada com lagoas – coletas de dezembro de 2013 e abril de 2014.**

Pontos de amostragem	Amo	Tet	Gen	Cfl	Cip
	[10 µg]	[30 µg]	[10 µg]	[30 µg]	[5 µg]
	N=4	N=4	N=4	N=4	N=4
Abril/2014					
RALF	R	S	S	R	S
LS	R	R	S	R	S
Resistência(%)	100	50	0	100	0
Pontos de amostragem	Amo	Tet	Gen	Cfl	Cip
	[10 µg]	[30 µg]	[10 µg]	[30 µg]	[5 µg]
	N=8	N=8	N=8	N=8	N=8
Dezembro/2013					
Lagoa 2	R	R	S	R	S
Lagoa 3	R	S	S	R	S
Abril/2014					
Lagoa 1	S	S	S	I	S
Lagoa 4	S	S	S	R	S
Resistência(%)	50	25	0	75	0

Nota: Amo-Amoxicilina; Tet-Tetraciclina; Gen-Gentamicina; Cfl-Cefalotina; Cip-Ciprofloxacina; S – Sensível; I – Intermediário; R - Resistente.

No lodo da ETE operada com RALF, 100% dos isolados de *Salmonella* sp. foram resistentes a amoxicilina (10 µg) e a cefalotina (30 µg), 50% resistentes a tetraciclina (30 µg). No lodo das lagoas, das 8 colônias de *Salmonella* sp. 50% apresentaram resistência a amoxicilina, 25% a tetraciclina, e 75% a cefalotina. Em ambas ETEs estudadas, as colônias de *Salmonella* sp. foram sensíveis apenas à gentamicina (10 µg) e a ciprofloxacina (5 µg). Estes resultados se aproximaram aos obtidos por Toro (2014), em seus estudos detectou em pacientes do hospital clínico Universitário Lozano Blesa, Espanha, isolados de *Salmonella* sensíveis apenas a ciprofloxacina.

A Tabela 4, contém os resultados dos antibiogramas realizados com *E. coli* isoladas no lodo das ETEs.

**Tabela 4 – Antibiogramas com *E. coli* do lodo da ETE operada com RALF e da ETE operada com lagoas – coletas de dezembro de 2013, fevereiro e abril de 2014.**

Pontos de amostragem	Amo	Tet	Gen	Cfl	Cip
	[10 µg] N=8	[30 µg] N=8	[10 µg] N=8	[30 µg] N=8	[5 µg] N=8
<b>Fevereiro/2014</b>					
RALF	R	R	S	R	S
LS	R	R	S	R	R
<b>Abril/2014</b>					
RALF	R	S	S	R	S
LS	R	R	S	R	I
Resistência (%)	100	75	0	100	25
Pontos de amostragem	Amo	Tet	Gen	Cfl	Cip
	[10 µg] N=16	[30 µg] N=16	[10 µg] N=16	[30 µg] N=16	[5 µg] N=16
<b>Dezembro/2013</b>					
Lagoa 1	I	R	S	R	S
Lagoa 2	R	R	S	R	R
Lagoa 3	R	R	S	R	R
<b>Fevereiro/2014</b>					
Lagoa 2	S	S	S	I	S
Lagoa 3	I	S	S	R	S
<b>Abril/2014</b>					
Lagoa 1	I	I	S	R	S
Lagoa 2	I	S	S	I	S
Lagoa 3	R	R	S	I	S
Resistência (%)	37,5	50	0	62,5	25

**Nota:** Amo-Amoxicilina; Tet-Tetraciclina; Gen-Gentamicina; Cfl-Cefalotina; Cip-Ciprofloxacina; S – Sensível; I – Intermediário; R – Resistente.

No lodo do RALF e do leito de secagem, 100% dos isolados de *E. coli* foram resistentes a amoxicilina (10 µg) e a cefalotina (30 µg), 75% foram resistentes a tetraciclina (30 µg) e 25% a ciprofloxacina (5 µg). Na ETE operada com lagoas, dos 16 isolados de *E. coli* 37,5% foram resistentes a amoxicilina, 50% a tetraciclina, 62,5 a cefalotina, e 25% ciprofloxacina. Os resultados mostraram que em ambas as ETEs, os isolados de *E. coli* foram sensíveis apenas a gentamicina (10 µg). Estes resultados foram semelhantes aos obtidos por Koczura *et al.* (2012) em seus estudos os isolados apresentaram resistência à tetraciclina, amoxicilina, cefalotina, ciprofloxacina. No sistema operado com lagoas, a ausência de *E. coli* no lodo da lagoa 4, reduz a possibilidade de eliminar esse tipo de bactéria no corpo receptor e dispersar esse microrganismo resistente no ambiente.

## Conclusões

A realização dos testes com antimicrobianos, possibilitaram estimar que no lodo do RALF e no leito de secagem dos 4 isolados de *Salmonella* sp. e dos 8 isolados de *E. coli*, 100 % foram resistentes à amoxicilina (10 µg) e a cefalotina (30 µg), no lodo do leito de secagem, 100% dos isolados de *Salmonella* sp., e 75% dos isolados de *E. coli*, também foram resistentes a tetraciclina (30 µg). Nas lagoas, dos 8 isolados de *Salmonella* sp., 50% foram resistentes a amoxicilina (10 µg), 75% a cefalotina (30 µg) 25% a tetraciclina (30 µg). Em relação a *E. coli*, dos 16 isolados, 37,5% foram resistentes a amoxicilina (10 µg), 50% a tetraciclina (30 µg), 62,5% a cefalotina (30 µg) e 25% a ciprofloxacina (5 µg). Ao comparar os sistemas de tratamento, as lagoas proporcionaram redução de *E. coli*, estas não foram detectadas na última lagoa do sistema de tratamento. A ocorrência de microrganismos resistentes aumenta os riscos relacionados a inserção dessas bactérias resistentes no ambiente, constituindo uma ameaça a saúde pública e ambiental. A ocorrência de patógenos, metais pesados e outros poluentes emergentes no LE, exigem cuidados relacionados ao tratamento desse lodo, para proporcionar o reuso agrícola ou disposição final.

## Agradecimentos

À CAPES, pelo apoio financeiro e à UTFPR.

## Referências Bibliográficas

- AQUINO, S. F. de.; BRANDT, E. M. F.; CHERNICHARO, C. A. de L. 2013. Remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto: revisão da literatura. Eng. Sanitária e Ambiental, v. 18, n. 3. p. 187 – 204.
- CLSI/NCCLS – Clinical and Laboratory Standards Institute. 2003. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Wayne, Pennsylvania, USA.
- CLSI/NCCLS – Clinical and Laboratory Standards Institute. 2005. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Wayne, Pennsylvania, USA.
- DONAGEMA, G. K; CAMPOS, D. V. B. de; CALDERANO, S. B; TEIXEIRA, W. G.; VIANA, J. H. M. 2011. Manual de métodos de análise de solos. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 230 p.
- KOCZURA, R; MOKRACKA, J; JABŁOŃSKA, L; GOZDECKA, E; KUBEK, M; KAZNOWSKI, A. 2012. Antimicrobial resistance of integron-harboring *Escherichia coli* isolates from clinical samples, wastewater treatment plant and river water. Science of the Total Environment, v. 414, p. 680-685.
- KÜMMERER, K. 2009. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. Chemosphere, V. 75, p. 417-434.
- DAVIES, J.; DAVIES, D. 2010. Origins and evolution of antibiotic resistance. Microbiology and Molecular Biology Reviews, v. 74, n. 3, p. 417-433.
- METCALF, L.; EDDY, H. 2003. Wastewater Engineering: Treatment and Reuse. 4 ed. New York: McGraw –Hill.
- SILVA, N. da; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S. dos; GOMES, R. A. R. 2007. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. 3 ed. São Paulo: Livraria Varela, 552 p.
- TORO, M. de; SERAL, C; ROJO-BEZARES, B; TORRES, C; CASTILLO, F. J; SÁENZ, Y. 2014. Resistencia a antibióticos y factores de virulencia en aislados clínicos de *Salmonella* entérica. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, v. 32, n.1, p.4-10.