

Universidade do Minho
Escola de Engenharia

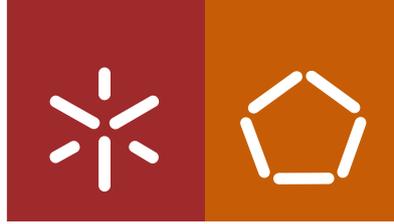
Ana Rita Cartaxo Correia do Seixo

Caracterização do microbioma e dos perfis de resistência nos afluentes e efluentes de ETAR

Ana Rita Cartaxo Correia do Seixo **Caracterização do microbioma e dos perfis de resistência nos afluentes e efluentes de ETAR**

UMinho | 2015

outubro de 2015



Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Ana Rita Cartaxo Correia do Seixo

Caracterização do microbioma e dos perfis de resistência nos afluentes e efluentes de ETAR

Dissertação de Mestrado
Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica
Ramo de Engenharia Clínica

Trabalho efetuado sob a orientação da
Professora Doutora Maria Alcina Pereira
e da
Professora Doutora Maria Olívia Pereira

outubro de 2015

DECLARAÇÃO

Nome: Ana Rita Cartaxo Correia do Seixo

Título dissertação: *Caracterização do microbioma e dos perfis de resistência nos afluentes e efluentes de ETAR*

Orientador: Maria Alcina Pereira e Maria Olívia Pereira

Ano de conclusão: 2015

Designação do Mestrado: Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica

Ramo: Engenharia Clínica

Escola: de Engenharia

Departamento: de Engenharia Biológica

DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA DISSERTAÇÃO

Universidade do Minho, ____/____/_____

Assinatura: _____

Agradecimentos

A realização desta dissertação de mestrado só foi possível graças à colaboração e ao contributo, de forma direta ou indireta, de várias pessoas. A todos eles deixo aqui o meu sincero agradecimento.

Em primeiro lugar, gostaria de expressar a minha gratidão à Dr.^a Professora Maria Alcina Pereira e à Dr.^a Professora Maria Olívia Pereira, por todo o apoio incondicional e disponibilidade demonstrada na orientação deste projeto. Gostaria também de agradecer à Dr.^a Susana Lopes e à Dr.^a Liliana Santos por todo o esclarecimento de dúvidas e pela ajuda prestada ao longo de todo o desenvolvimento da minha dissertação.

Aos meus colegas do Laboratório de Microbiologia Aplicada e da Plataforma de Biologia Molecular, em especial à Ana Silva, Sofia Lima, Tânia Rodrigues e Bruno Valente, o meu sincero agradecimento pela amizade demonstrada e principalmente pela ajuda prestada e força que me deram nas alturas de desânimo.

Agradeço também à Empresa Pública Municipal Agere (Empresa de águas, efluentes e resíduos de Braga) pela possibilidade de recolha de amostras dos efluentes, essenciais ao desenvolvimento do meu projeto.

À minha família, em especial aos meus pais, irmãs e avós, um enorme obrigada por todo o reconhecimento e apoio que me deram. Aos meus pais, pelo enorme esforço e sacrifício ao longo destes anos, às minhas irmãs pelo incentivo que me deram e às minhas avós que sempre foram a minha fonte de inspiração e motivação, a eles devo-lhes tudo!

Ao meu namorado Miguel Gama de Amorim, um agradecimento especial pelo amor e carinho diários, pela paciência, otimismo e apoio incondicional em todos os momentos.

Aos meus avós e ao meu tio que, infelizmente, não estando fisicamente, sempre estiveram presentes na minha memória.

Resumo

A acumulação de resíduos de antibióticos no ambiente conduz ao favorecimento da aquisição de genes que conferem resistência a bactérias inicialmente suscetíveis. Conseqüentemente, para que haja um menor impacto na saúde pública é necessário adotar estratégias que tornem mais célere e eficaz a detecção e caracterização de microrganismos resistentes, que controlem a sua libertação no meio ambiente, bem como reduzam a disseminação das doenças infecciosas provocadas por esses microrganismos patogênicos. Esta situação tem conduzido ao aparecimento de microrganismos patogênicos resistentes nas águas residuais tratadas nas Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETAR) e, posteriormente, descarregadas em massas de água natural. Neste trabalho pretendeu-se caracterizar o microbioma e os perfis de resistência de amostras de águas residuais em três momentos do processo de tratamento da ETAR: à entrada, antes do tratamento terciário e à saída deste, bem como determinar os perfis de suscetibilidade a determinados antibióticos e avaliar a presença e diversidade dos integrões presentes. A caracterização da comunidade bacteriana e dos perfis de resistência foi possível através do método de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (*DGGE*) e da técnica *Illumina Miseq*. Com base nas pesquisas de similaridade para as sequências do gene 16S usando o programa de pesquisa NCBI BLAST e da análise dos resultados de *Illumina Miseq*, foi possível concluir que a maior parte das bactérias apresentaram multirresistência a todos os antibióticos testados, principalmente bactérias pertencentes ao filo *Proteobacteria* e à família *Enterobacteriaceae*. Estas bactérias foram encontradas tanto na água residual aflúente à ETAR como no efluente final (tratado), o que sugere que os processos de tratamento utilizados nas ETAR não estão a ser eficazes na remoção de bactérias patogênicas. Relativamente à análise da presença dos integrões por *PCR* (reação em cadeia da polimerase), verificou-se a existência de pelo menos uma classe de integrões presente tanto no aflúente como no efluente tratado, essencialmente integrões de classe 1. A presença de bactérias multirresistentes e de integrões nos efluentes tratados na ETAR, constitui assim um fator preocupante, uma vez que tais contribuem para a disseminação e dispersão de resistência antimicrobiana por outros ecossistemas aquáticos, nomeadamente rios e mares.

Palavras-chave: Estação de Tratamento de Águas Residuais, *PCR-DGGE*, Multirresistência, Antibióticos, Integrões, Perfis de resistência.

Abstract

The accumulation of antibiotic residues in the environment leads to favoring acquisition of genes that confer resistance to initially susceptible bacteria. Consequently, in order to have less impact on public health it is necessary to adopt strategies to make faster and more effective the detection and characterization of resistant microorganisms, controlling discharged into the environment as well as reduce the spread of infectious diseases caused by these pathogens. This has led to the emergence of resistant pathogens in the wastewater treated in Wastewater Treatment Plants (WWTP) and subsequently discharged into natural bodies of water. This work aimed to characterize the microbiome and the resistance profiles of wastewater samples at three locations of the WWTP treatment process: at the entrance, before the tertiary treatment and discharged into the river, and to determine the susceptibility profiles to certain antibiotics as well as evaluating the presence and diversity of integrons present. The characterization of bacterial communities and resistance profiles was made possible by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and Illumina Miseq technique. Based on investigations of similarity to the sequences of the 16S rRNA using the search program NCBI BLAST and the analysis results Illumina Miseq, it was possible to conclude that most bacteria showed multidrug resistance to all tested antibiotics, especially bacteria belonging to the phylum *Proteobacteria* and *Enterobacteriaceae* family. These bacteria were found both in the initial and in the final wastewater (treated), suggesting that treatment processes used in the WWTP are not effective in removing pathogenic bacteria. The analysis of the presence of integrons by PCR (polymerase chain reaction) revealed the existence of at least one integrons class both in the initial and treated wastewater essentially class 1. The presence of multidrug-resistant bacteria and integrons in the ETAR effluent (treated wastewater) is thus a concern, since these contribute to the dispersion to other aquatic ecosystems, particularly rivers and seas.

Keywords: Wastewater Treatment Plant, PCR-DGGE, multidrug resistance, antibiotics, integrons, resistance profiles.

Índice

Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	v
Abstract.....	vii
Índice.....	ix
Índice de Tabelas	xi
Índice de Figuras.....	xiii
Lista de Abreviaturas	xv
INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Enquadramento	3
1.2. Objetivos.....	4
1.3. Organização da dissertação.....	5
FUNDAMENTOS TEÓRICOS	7
2.1. Antibióticos	9
2.1.1. Definição e História	9
2.1.2. Principais Classes	9
2.1.3. Mecanismos de Ação	11
2.1.4. Consumo de Antibióticos para uso sistémico na União Europeia	11
2.1.5. Consumo de antibióticos em Portugal.....	13
2.2. Resistência a Antibióticos	14
2.2.1. Resistência Intrínseca e Adquirida.....	14
2.2.2. Aquisição de Resistência a Antibióticos	15
2.2.2.1. Integrões.....	16
2.2.3. Situação Atual da Resistência a Antibióticos.....	17
2.3. Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETAR)	19
2.3.2. Importância da ETAR no Ciclo Urbano da Água.....	19
2.3.3. Caracterização das Águas Residuais	20
2.3.4. Sistemas de Tratamento de Águas Residuais	21
2.3.3.1. Fase Líquida.....	22

2.3.3.2.	Fase Sólida	24
2.3.4.	Desinfecção	25
MATERIAIS E MÉTODOS		27
3.1.	Preparação dos meios de crescimento com antibióticos.....	29
3.1.1.	Preparação das soluções dos antibióticos	29
3.1.2.	Meios de cultura.....	29
3.1.3.	Preparação das placas de crescimento	30
3.2.	Recolha das amostras	30
3.3.	Processamento das amostras e crescimento das bactérias cultiváveis.....	31
3.4.	Análise molecular da comunidade bacteriana	32
3.4.1.	Extração de <i>DNA</i>	32
3.4.2.	Reação de Polimerização em cadeia (<i>PCR</i>)	33
3.4.3.	Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (<i>DGGE</i>)	34
3.4.4.	Sequenciação dos genes 16S <i>rRNA</i>	34
3.5.	Caracterização genética dos integrões de genes de resistência a antibióticos.....	35
ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS		37
4.1.	Presença e diversidade de integrões de genes de resistência a antibióticos	39
4.2.	Perfil bacteriano	40
4.2.1.	Perfil bacteriano da água residual afluyente à ETAR.....	40
4.2.2.	Perfil bacteriano do efluente da ETAR (E.F)	42
4.2.3.	Perfil Bacteriano do efluente antes do tratamento de desinfecção (E.A.F)	44
4.3.	Isolados e identificação nos perfis 16S- <i>DGGE</i>	46
4.4.	Sequenciação <i>Illumina</i>	48
CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS		57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		61
ANEXOS		67

Índice de Tabelas

Tabela 1. Exemplos de grupos de antibióticos, os seus principais representantes e indicações frequente.....	10
Tabela 2. Resistência bacteriana a determinados antibióticos	18
Tabela 3. Níveis de tratamento de águas residuais	22
Tabela 4. Subprodutos gerados ao longo das operações e processos de um tratamento convencional da fase líquida	25
Tabela 5. Preparação de Soluções Padrão de Agentes Antimicrobianos	29
Tabela 6. Amostragem referente à ETAR de Braga	30
Tabela 7. Reagentes e respetivos volumes usados para cada <i>PCR</i>	33
Tabela 8. Programa de <i>PCR</i> usado para a amplificação das regiões V6 a V8 dos genes 16S <i>rRNA</i> do domínio <i>Bacteria</i>	34
Tabela 9. Programa de <i>PCR</i> utilizado para a amplificação dos genes 16S <i>rRNA</i> do domínio <i>Bacteria</i>	35
Tabela 10. <i>Primers</i> e condições de amplificação utilizados	36
Tabela 11. Presença e diversidade dos integrões nas amostras recolhidas	39
Tabela 12. Resumo da afiliação das bandas de <i>DGGE</i> obtida a partir das respetivas sequências do gene 16S e a correspondência mais próxima do <i>GenBank</i> e presença no A., E.A.F e E.F	47

Índice de Figuras

Figura 1. Mecanismos de ação dos diferentes fármacos	11
Figura 2. Consumo de antibacterianos de uso sistêmico na comunidade, UE / EEE de 2012, expressos em DDD por 1 000 habitantes e por dia.....	12
Figura 3. Consumo de antibióticos na comunidade, em DDD por 1000 habitantes por dia, em Portugal Continental (2009-2012).....	13
Figura 4. Estrutura de um integrão de classe 1	16
Figura 5. Situação mundial da resistência antimicrobiana combinada em 2013.....	17
Figura 6. Ciclo urbano Da Água	20
Figura 7. Esquema de uma linha de tratamento convencional de águas residuais.....	22
Figura 8. Esquema de uma linha de tratamento convencional de águas residuais e local da recolha dos efluentes.....	31
Figura 9. Placas com 48 horas de incubação (à esquerda) e 24 horas de incubação (à direita) 32	
Figura 10. Perfis Bacterianos 16S- <i>DGGE</i> da água residual afluente à ETAR.....	41
Figura 11. Perfil Bacteriano 16S-DGGE do Efluente Final (E.F).....	43
Figura 12. Perfil Bacteriano 16S-DGGE do Efluente Antes do Tratamento de Desinfecção(E.A.F). 45	
Figura 13. Diversidade taxonómica das sequências do gene 16S rRNA das bactérias cultiváveis presentes no afluente à ETAR.	49
Figura 14. Diversidade taxonómica das sequências do gene 16S rRNA das bactérias cultiváveis presentes no efluente tratado suplementado com o antibiótico CIPROFLOXACINA (CIP).	50
Figura 15. Diversidade taxonómica das sequências do gene 16S rRNA das bactérias cultiváveis presentes no efluente tratado suplementado com o antibiótico CLORANFENICOL (CHF).	51
Figura 16. Diversidade taxonómica das sequências do gene 16S rRNA das bactérias cultiváveis presentes no efluente tratado suplementado com o antibiótico GENTAMICINA (GENT).....	52
Figura 17. Diversidade taxonómica das sequências do gene 16S rRNA das bactérias cultiváveis presentes no efluente tratado suplementado com o antibiótico RIFAMPICINA (RIF).	52
Figura 18. Diversidade taxonómica das sequências do gene 16S rRNA das bactérias cultiváveis presentes no efluente tratado suplementado com o antibiótico TETRACICLINA (TET)..	53
Figura 19 Diversidade taxonómica das sequências do gene 16S rRNA das bactérias cultiváveis presentes no efluente tratado suplementado com o antibiótico AMPICILINA (AMP).....	54
Figura 20. Diversidade taxonómica das sequências do gene 16S rRNA das bactérias cultiváveis presentes no efluente tratado suplementado com o antibiótico VANCOMICINA (VAN).	55

Lista de Abreviaturas

A: Afluente

AMP: Ampicilina

ARS: Administração Regional de Saúde

CHF: Cloranfenicol

CIP: Ciprofloxacina

CLSI: do Inglês *Clinical and Laboratory Standards Institute*

DDD: Doses Diárias Definidas

DGGE: Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (do inglês *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*)

DGS: Direção Geral da Saúde

DNA: do Inglês *Deoxyribonucleic Acid*

E. coli: *Escherichia coli*

EAF: Efluente Antes da Desinfecção

EARS-Net: do Inglês *European Antimicrobial Resistance Surveillance Network*

ECDC: do Inglês *European Center for Prevention and Disease Control*

EEE: Espaço Económico Europeu

EF: Efluente Final

EI: Efluente Bruto

ESAC-Net: do Inglês *European Surveillance of Antimicrobial Consumption Network*

ESKAPE: *Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa e Enterobacter spp*

ETA: Estação de Tratamento de Águas

ETAR: Estação de Tratamento de Águas Residuais

GENT: Gentamicina

LVT: Lisboa e Vale do Tejo

MBT: do Inglês *Molecular Biology Tools*

OMS: Organização Mundial da Saúde

PBS: do Inglês *Phosphate Buffered Saline*

PCR: Reação de Polimerização em Cadeia (do Inglês *Polymerase Chain Reaction*)

RIF: Rifampicina

RNA: do Inglês *Ribonucleic Acid*

SARM: *Staphylococcus aureus* resistente à metilina

TET: Tetraciclina

TSA: do Inglês *Tryptic Soy Agar*

TSB: do Inglês *Tryptic Soy Broth*

UE: União Europeia

UV: Ultravioleta

V: Volume

VAN: Vancomicina

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

1.1. Enquadramento

Com o avanço da ciência, em geral, e com a descoberta de antibióticos e a sua aplicação em terapia anti-infecciosa assistiu-se a uma evolução indiscutível da medicina do século XX. Nos últimos 50 anos, os antibióticos têm sido utilizados não só na medicina mas também como promotores do crescimento animal e algumas vezes em práticas agrícolas. No entanto, o uso excessivo e, por vezes, imprudente destes agentes antibacterianos conduziu à seleção de bactérias multirresistentes, em todas as regiões geográficas. Estas adquirem resistência aos antibióticos, quer pela modificação do seu genoma por mutação, quer pela inclusão de genes provenientes de outros microrganismos por diferentes sistemas de transferência genética. A disseminação de bactérias resistentes e dos seus respetivos genes é um problema emergente a nível dos cuidados de saúde e em outros locais que, direta ou indiretamente, contactam com o homem. Este acontecimento acarreta o risco aumentado de contrair infeções, ou de colonização com bactérias resistentes [1, 2].

As descargas de efluentes hospitalares e urbanos deficientemente tratados e de resíduos de antibióticos por parte da indústria farmacêutica, a utilização de estrume animal contaminado, o uso intensivo de antibióticos na produção animal e, alguns casos, em práticas agrícolas são práticas que podem contribuir para a existência de bactérias resistentes e genes nos alimentos, animais, em ambiente aquático e no ar [2].

As Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETAR) foram pensadas para o tratamento de efluentes de origem doméstica. No entanto, hoje em dia, as ETAR recebem efluentes de diversas atividades, incluindo indústria farmacêutica, instituições de saúde e de centros de investigação. As águas residuais e os sistemas de lamas ativadas das ETAR são ambientes favoráveis, onde se pode encontrar diversas bactérias, nutrientes e agentes antimicrobianos, tanto para a sobrevivência e transferência de genes, disseminando bactérias resistentes no ambiente, tanto aquático como terrestre. A partir destes ecossistemas, estas bactérias podem encontrar uma maneira de voltar para os seres humanos, quer diretamente (através da água para consumo), quer indiretamente (ingestão de carne, peixe e legumes) [2, 3].

Estudos recentes sobre a resistência aos antibióticos mostraram resultados preocupantes, como o aumento para o dobro das taxas de mortalidade a nível de doenças infecciosas, em que o

agente infeccioso é resistente ao antibiótico. Além disso, a duração do tratamento tem aumentado, exigindo o uso de antibióticos mais potentes e caros ou o uso de vários antibióticos em simultâneo [1, 4, 5].

Os betalactâmicos representam a classe de antibióticos mais utilizada a nível mundial, devido, principalmente, à sua grande especificidade de alvo. A penicilina foi introduzida na prática clínica em 1942 e rapidamente se verificou o aparecimento de estirpes não suscetíveis a este antimicrobiano, como a de *Staphylococcus aureus*, a este composto. Um dos principais mecanismos de resistência a esta classe de antimicrobianos tem por base a produção de enzimas betalactamases que degradam o anel betalactâmico e, conseqüentemente, conduzem à sua inativação. A primeira betalactamase foi encontrada em *Escherichia coli* (*E. coli*), anteriormente à utilização da penicilina [6].

Um dos objetivos da norma da Direção Geral da Saúde (DGS) relativo ao assunto “Vigilância Epidemiológica das Resistências aos Antimicrobianos” alerta para a necessidade de prevenir a emergência e a transmissão cruzada de microrganismos com resistência intermédia ou resistência aos antimicrobianos. Torna-se, desta forma, igualmente importante quantificar e controlar a libertação para o ambiente dos microrganismos geneticamente modificados para que se possa controlar os riscos possíveis para a população [6, 7].

1.2. Objetivos

Com este projeto pretendeu-se, numa primeira fase, conhecer e analisar a problemática da emergência de microrganismos patogénicos e resistentes nas águas residuais resultantes da atividade humana. Pretendeu-se, ainda, investigar e caracterizar os processos de tratamento de ETAR, a fim de determinar potenciais impactos dos efluentes hospitalares nos ecossistemas de ETAR municipais e naturais.

Numa segunda fase, pretendeu-se recolher amostras de águas residuais de uma ETAR (à entrada, antes do tratamento de desinfeção e à saída desta) e caracterizar a população microbiana, determinando os perfis *DGGE* (do Inglês Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) do gene 16 *rRNA* bacteriano. Posteriormente, procurou-se identificar os microrganismos patogénicos, nas amostras recolhidas, e determinar os seus perfis de suscetibilidade a

determinados antibióticos como forma de avaliar a ocorrência e diversidade de integções em diferentes fases do processo de tratamento de uma ETAR. O objetivo final passou por recolher dados relativos à contribuição desses ambientes para a transferência horizontal de genes.

1.3. Organização da dissertação

A presente dissertação organiza-se essencialmente em cinco capítulos, de forma a estruturar o trabalho desenvolvido no decorrer da investigação.

No primeiro capítulo, faz-se uma breve contextualização do tema de trabalho, referindo-se os objetivos gerais e a organização da dissertação. No segundo capítulo, referente aos fundamentos teóricos, abordam-se temas como os antibióticos e a resistência bacteriana. De forma a entender também a disseminação de bactérias resistentes em águas residuais, realça-se os tratamentos incluídos em Estações de Tratamento de Águas Residuais. No terceiro capítulo, referem-se os materiais e métodos necessários ao desenvolvimento do trabalho experimental, desde a recolha e processamento até à análise das amostras da ETAR. No quarto capítulo, apresentam-se os resultados obtidos, fazendo-se o seu relacionamento e a sua discussão.

Por fim, na quinta secção, faz-se a síntese das conclusões principais que podem ser retiradas do trabalho experimental assim como algumas sugestões para trabalhos futuros.

Capítulo 2

FUNDAMENTOS

TEÓRICOS

2.1. Antibióticos

2.1.1. Definição e História

Os antibióticos são compostos químicos, naturais ou sintéticos, capazes de matar ou inibir o crescimento de bactérias. Podem ser classificados como bactericidas, quando causam a morte da bactéria, ou bacteriostáticos, quando promovem a inibição do crescimento bacteriano. Atualmente, as principais fontes de antibióticos usados na prática clínica são produtos de origem natural: fungos (*Penicillium* produtor de penicilina) ou bactérias. No entanto, antibióticos totalmente sintéticos (como as sulfamidas) também têm vindo a ser utilizados [1, 8, 9].

Em 1928, Alexander Fleming descobriu o primeiro antibiótico natural, a penicilina. Produzida pelo fungo *Penicillium notatum*, a substância revelou poder antibacteriano no decorrer de estudos com uma cultura de bactérias do género *Staphylococcus*. A sua eficácia no combate às infeções bacterianas foi destacada durante a Segunda Guerra Mundial, permitindo salvar muitas vidas. Desde então, numerosos antibióticos foram isolados de seres vivos e produzidos laboratorialmente em larga escala. Assim, rapidamente, os antibióticos tornaram-se essenciais no combate às infeções de origem bacteriana, permitindo o aumento da esperança de vida no século XX. Entre os anos 1940 e 1960, diversos antibióticos foram descobertos através de triagem de produtos naturais microbianos, sendo a maioria deles eficazes para o tratamento de bactérias Gram +: β -lactâmicos (cefalosporina), aminoglicosídeos (estreptomicina), tetraciclina (clortetraciclina), macrolídeos (eritromicina), Glicopéptídeos (vancomicina) e outros (cloranfenicol e rifampicina). A descoberta dos antibióticos e a sua introdução na prática clínica revolucionou a medicina, devido ao seu grande impacto na diminuição da mortalidade causada por doenças infecciosas de origem bacteriana e, principalmente, no controlo deste tipo de doenças. Atualmente, estes agentes antimicrobianos têm uma elevada significância tanto nas práticas médicas, veterinárias e agrárias [1, 5, 10-12].

2.1.2. Principais Classes

Existem centenas de antibióticos, alguns dos quais são apenas utilizados a nível hospitalar, estando a maior parte incluídos em oito grandes grupos, como mostra a Tabela 1. Estes grupos são classificados de acordo com a sua estrutura química de base. Os constituintes de cada

grupo de antibiótico surgem da adição ou substituição de radicais à estrutura base, com o objetivo de melhorar as propriedades antibacterianas e farmacológicas [7].

Tabela 1. Exemplos de grupos de antibióticos, os seus principais representantes e indicações frequentes (adaptado de [7, 13])

Grupo de Antibiótico	Principais Representantes	Indicações frequentes	
β-lactâmicos	Penicilinas	Naturais: ex: cristalina Aminopenicilinas: ex: ampicilina Penicilinase-resistentes: ex: Oxacilina Antipseudomonas: ex: Ticarcilina Associação com inibidor de betalactamase: ex: amoxicilina/clavulanato 1ª Geração: ex: cefazolina 2ª Geração: ex: cefaclor	Infeções estreptocócicas, sífilis e doença de <i>Lyme</i>
	Cefalosporinas	3ª Geração: ex: ceftriaxona 4ª Geração: ex: cefepime	Infeções da pele e tecidos moles Algumas infeções respiratórias e abdominais Ampla espectro para muitas bactérias em infeções ligeiras ou de gravidade moderada (oral) e doenças graves (por via injetável) Infeções graves (sobretudo em pacientes imunocomprometidos)
	Carbapenemes	Iminipem, meropenem, ertapenem	Gangrena, septicemia, Pneumonia, Infeções abdominais e urinárias e, exceto para ertapenem, infeções por <i>Pseudomonas</i>
	Monobactâmicos	Aztreonam	Infeções causadas por bactérias gram-negativas
Macrolídeos	Eritromicina, claritromicina, Azitromicina, Roxitromicina	Infeções estreptocócicas, sífilis, infeções respiratórias, infeções por micoplasmas, doença de <i>Lyme</i>	
Tetraciclínas	Tetraciclina, miniciclina, doxiciclina, demevlociclina, oxitetraciclina	Sífilis, infeções por Clamídia, doença de lyme, infeções por micoplasma, infeções por Rickétsias	
Aminoglicosídeos	Gentamicina, amicacina, estreptomina, tobramicina, netilmicina, neomicina, canamicina	Infeções causadas por bactérias gram-negativas, como <i>E.coli</i> e <i>Klebsiella</i>	
Sulfonamidas	Mafenide, sulfacetamida, sulfisoxazole, sulfametizol, sulfassalazina, trimetoprim, sulfametoxazol	Infeções das vias urinárias (exceto a sulfassalazina, a sulfacetamida e a mafenide); queimaduras	
Glicopéptidos	Vancomicina, teicoplanina	Infeções graves resistentes a outros antibióticos	
Fluoroquinolonas	Norfloxacin, ciprofloxacina, ofloxacina, levofloxacina, gatifloxacina	Infeções das vias urinárias, prostatite bacteriana, diarreia bacteriana, gonorreia	
Oxazolidinonas	Linezolida	Infeções graves causadas por bactérias gram-positivas que são resistentes a outros antibióticos	
	Metronidazol	Vaginite causada por <i>Tricomonas</i> ou <i>Gardnerella</i> , infeções pélvicas e abdominais	
	Climdamicina	Infeções estreptocócicas; infeções respiratórias, abscessos pulmonares	
	Rifampicina	Tuberculose e lepra	
	Cloranfenicol	Febre tifoide e outras infeções por <i>Salmonella</i> , Meningite	

2.1.3. Mecanismos de Ação

O princípio da antibioterapia estabelece que os antibióticos sejam substâncias que afetem mais adversamente os microrganismos do que os hospedeiros, atuando como agentes tóxicos seletivos. O grau de toxicidade seletiva depende dos mecanismos de ação do fármaco.

Os antibióticos podem ser classificados de acordo com a estrutura da bactéria e a função que é afetada, quando esta é submetida à ação dos antibióticos (figura 1), sendo eles[13-16]:

- Inibidores da síntese da parede celular bacteriana (ex: β -lactâmicos, glicopéptidos);
- Inibidores da síntese de proteínas (ex: macrolídeos, aminoglicosídeos, tetraciclina, cloranfenicol);
- Inibidores da função da membrana celular;
- Inibidores do metabolismo de ácido fólico (ex: sulfanamidas);
- Inibidores da síntese de ácidos nucleicos (ex: quinolonas).

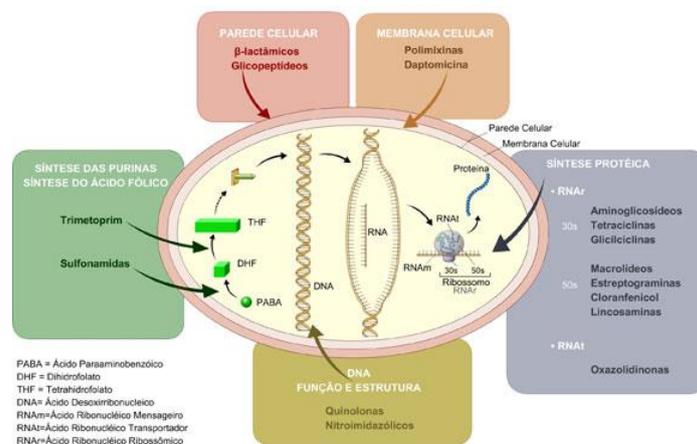


Figura 1. Mecanismos de ação dos diferentes fármacos

2.1.4. Consumo de Antibióticos para uso sistêmico na União Europeia

Em 2012, segundo dados da *European Surveillance of Antimicrobial Consumption Network (ESAC-Net)*, o consumo de antibióticos para uso sistêmico na comunidade de 30 países variou de 11,3 DDD (Doses Diárias Definidas) por 1000 habitantes e por dia na Holanda a 31,9 DDD por 1000 habitantes e por dia na Grécia. O consumo médio foi de 21,5 DDD por 1000 habitantes e por dia. A figura 2 mostra uma menor incidência no consumo de antibióticos no

A classe das β -Lactamases-Penicilinas é, em média, a classe de antibióticos mais solicitada para uso sistémico. Num estudo realizado, conclui-se que o consumo total de antibacterianos administrados oralmente variou de 1,1 pacotes por 1000 habitantes e por dia (Suécia) para 4,9 pacotes por 1000 habitantes e por dia (França). Em média, 3,1 pacotes de antibacterianos foram consumidos por 1000 habitantes e por dia nos países da UE/EEE em 2012. Em relação à classe de antibióticos mais utilizada, destaca-se a classe das penicilinas com média de 1,4 pacotes por 1000 habitantes e por dia contra 0,07 pacotes por 1000 habitantes por dia de sulfonamidas e trimetoprim [17].

2.1.5. Consumo de antibióticos em Portugal

Em relação a Portugal Continental, segundo dados da Direção Geral da Saúde (DGS), regista-se um ligeiro decréscimo de consumo de antibióticos na comunidade, como mostra a figura 3. Este decréscimo também se verifica a nível de todas as Administrações Regionais de Saúde (ARS), mas com valores menores para a ARS de Lisboa e Vale do Tejo (LVT) e maiores para a ARS de Alentejo. Segundo o relatório do *European Center for Prevention and Disease Control* (ECDC), Portugal está entre os 10 países europeus com mais elevado consumo de antibióticos na comunidade. O consumo hospitalar de antimicrobianos em Portugal parece ser superior à média europeia, conforme indicado pelo inquérito de prevalência de infeção hospitalar e de uso de antimicrobianos do ECDC 2011-2012. A classe das β -Lactamases-Penicilinas e as quinolonas são as classes de antibióticos mais solicitadas para uso sistémico, na comunidade e no setor hospital, em Portugal [2].

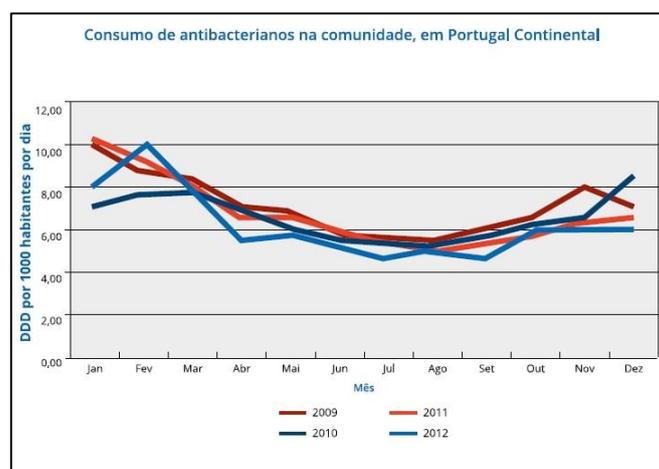


Figura 3. Consumo de antibióticos na comunidade, em DDD por 1000 habitantes por dia, em Portugal Continental (2009-2012) [18].

2.2. Resistência a Antibióticos

2.2.1. Resistência Intrínseca e Adquirida

Antes da descoberta dos antibióticos, milhares de pessoas morriam devido a infecções bacterianas, como a pneumonia ou infecções provenientes de procedimentos cirúrgicos. Desde a descoberta e utilização dos antibióticos, cada vez mais bactérias originalmente suscetíveis aos antibióticos se tornaram resistentes e desenvolveram várias estratégias para os combater. Visto que os níveis de resistência estão a aumentar e que, nos anos mais recentes, cada vez menos antibióticos têm vindo a ser descobertos e comercializados, o problema da resistência aos antibióticos é agora uma importante ameaça para a saúde pública [18].

Os mecanismos de resistência aos antibióticos incluem a inativação do antibiótico por síntese de enzimas (ex: β -lactamases), a diminuição da concentração intracelular (por redução da permeabilidade da membrana externa em Gram-negativos ou bombas de efluxo) e a alteração do local ativo. A resistência bacteriana surge quando determinados antibióticos específicos perdem a sua capacidade de matar ou impedir o desenvolvimento de bactérias. Quando algumas bactérias são naturalmente resistentes a certos antibióticos, a resistência bacteriana designa-se por resistência intrínseca ou natural, como é o caso da *Pseudomonas aeruginosa* que é naturalmente resistente à penicilina, devido principalmente à incapacidade de a substância atravessar a membrana externa e à desativação do antibiótico através de enzimas. Um problema mais preocupante ocorre quando algumas bactérias suscetíveis aos antibióticos adquirem resistência como consequência de mutações ou aquisição de genes provenientes de outros microrganismos por diferentes sistemas de transferência genética. Esta resistência é designada por resistência adquirida. Certos comportamentos como o uso excessivo ou inadequado de antibióticos aumentam a probabilidade do aparecimento e a propagação das bactérias resistentes aos antibióticos. Quando as bactérias são expostas ao antibiótico, as bactérias suscetíveis morrem, mas as bactérias resistentes podem sobreviver e multiplicar-se. É frequente encontrar-se estirpes resistentes a várias classes de antibióticos. Estas bactérias resistentes podem propagar-se e causar infecções noutras pessoas que não tenham tomado qualquer tipo de antibiótico ou, até mesmo a morte. As infecções causadas por bactérias resistentes podem necessitar de cuidados mais exigentes bem como outros antibióticos mais dispendiosos e que podem causar efeitos secundários mais relevantes [1, 17, 19, 20].

O relatório 2014 da Organização Mundial da Saúde (OMS) sobre a vigilância global da resistência antimicrobiana revela que a resistência aos antibióticos é uma “ameaça global” à saúde pública e não é mais do que uma previsão para o futuro. Divulga que o que está a suceder agora, em todo o mundo, aparenta ser o reflexo da incapacidade futura de tratar infeções simples que são tratáveis há décadas na comunidade. A OMS acrescentou ainda que é necessário tomar medidas urgentes para contrariar um possível rumo à era “pós-antibiótico” [21].

2.2.2. Aquisição de Resistência a Antibióticos

A evolução bacteriana foi significativamente moldada pela grande facilidade e capacidade de as bactérias conseguirem facilmente transferir genes entre si, permitindo a existência da disseminação de genes de resistência e/ou bactérias resistentes entre ecossistemas. O fenómeno da resistência a antibióticos talvez seja o exemplo mais recente do impacto da transferência horizontal de genes na adaptação microbiana. Este acontecimento, entre diferentes isolados clínicos de bactérias Gram negativas, durante a última metade do século passado, compreende o aparecimento rápido e vasto de perfis semelhantes de resistência a antibióticos.

As estações de tratamento de águas residuais (ETAR) são a interface entre dejetos humanos e os ambientes aquáticos e do solo. Estas recolhem os efluentes de diversas fontes (como hospitais, casas particulares, indústrias, pecuárias animais), que contribuem para o ecossistema final da ETAR. Estes efluentes incluem produtos químicos e resíduos microbiológicos, formando um “caldo” onde cada elemento interage com o outro sob uma restrição física e química, resultando principalmente numa degradação orgânica na fase aquosa e sólida. Os microrganismos são fundamentais para o processo, resultando em degradação ou transformação química e orgânica. As comunidades bacterianas são organizadas em biofilmes (chamados flocos bacterianos), que constituem a biomassa total (lodo). Como sugerido por muitos autores, a alta densidade bacteriana, devido à riqueza nutricional, indica que as ETAR são pontos favoráveis à transferência horizontal de genes. Na base da aquisição de genes de resistência a antibióticos, destaca-se a atividade dos integrões [7, 19, 20, 22].

2.2.2.1. Integrões

Os integrões foram definidos por Hall e Collis (1995) como sistemas genéticos que permitem que as bactérias capturem e expressem cassetes de genes. Estruturalmente, os integrões são constituídos por um gene que codifica uma integrase (*intI*), um local reconhecido pela integrase (*attI*) e um promotor (Pc) que controla a expressão dos genes contidos nas cassetes de genes que fazem parte do integrão [16, 23, 24].

A potência de um sistema de integração reside na sua capacidade de reconhecer sequências-alvo de recombinação altamente variáveis e a sua capacidade aparentemente ilimitada de trocar e acumular cassetes de genes. Esta flexibilidade permite a rápida adaptação ao imprevisível fluxo de nichos ambientais. Os integrões são classificados em classes de acordo com a sequência da integrase. As integrases dos integrões das classes 1, 2 e 3 são designadas por *int1*, *int2* e *int3*, respetivamente. A *int1* reconhece três tipos de local de recombinação: *attI1*, *attC* e locais secundários. Os integrões de classe 1 localizam-se, normalmente, em plasmídeos conjugativos como em transposões. A estrutura dos integrões de classe 1 inclui dois segmentos: um segmento conservado na posição 5' (5'CS) e outro na posição 3' (3'CS), relativamente à zona variável, como se observa na figura 4. A região variável, localizada entre os dois segmentos conservados, é o local para a inserção de cassetes de genes de resistência a antibióticos. Os integrões de classe 1 estão associados a várias cassetes de genes de resistência. A maior parte destes contém um gene *aadA*, que codifica para a resistência a estreptomicina e espectinomicina e muitos possuem também determinantes de resistência ao trimetopim. Os integrões de classe 1, isolados de bactérias envolvidas em infeções humanas, também possuem frequentemente um gene para a resistência a β -lactâmicos. Integrões de classe 2 foram caracterizados em isolados de *Acinetobacter* de todo o mundo, em *Shigella sonnei* e em *Enterobacteriaceae*. Os integrões de classe 3 foram reportados em *Serratia marcescens*, isolada no Japão, pela identificação do gene *bla_{IMP}*, que codifica resistência aos antibióticos *B-lactâmicos* de espectro alargado [16, 22].

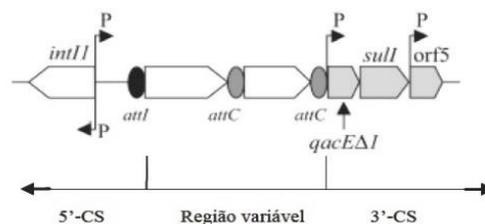
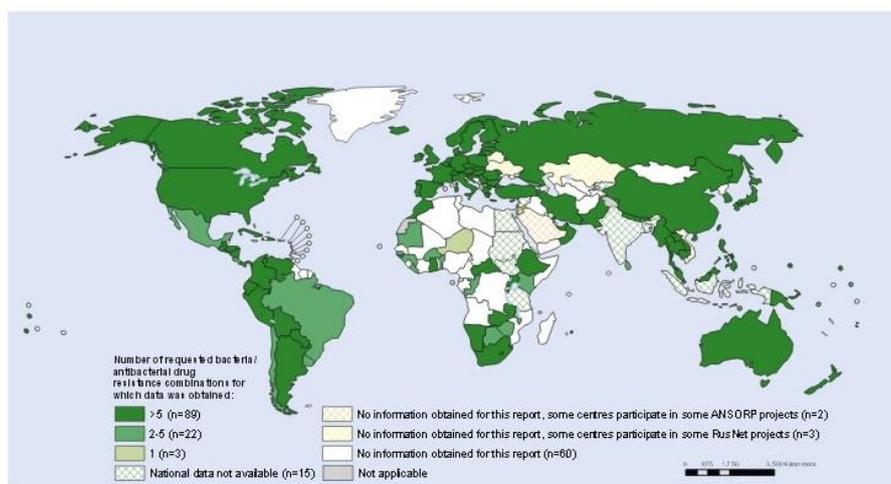


Figura 4. Estrutura de um integrão de classe 1 [24].

2.2.3. Situação Atual da Resistência a Antibióticos

Dados da *European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)* revelam grandes alterações na ocorrência de resistência a antibióticos na Europa em função do microrganismo, antibiótico e região geográfica (figura 5). Os resultados mostram um aumento à escala europeia da resistência antimicrobiana nos patogênicos gram-negativos sob alerta (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*), enquanto a resistência nos patogênicos gram-positivos (*Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis*) aparenta estar a estabilizar ou até mesmo a diminuir em alguns países. No entanto, a resistência combinada de antibióticos (resistência às cefalosporinas de terceira geração, às fluoroquinolonas e aos aminoglicosídeos) na *Escherichia coli* e na *Klebsiella pneumoniae* têm vindo a aumentar significativamente em mais de um terço dos países participantes da UE. A comunidade científica definiu um grupo de bactérias que considerou uma ameaça relativa à aquisição de resistência a antibióticos (tabela 2), designando-o por ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter spp.*). Os microrganismos pertencentes a este grupo são: *Enterococcus*, resistente à vancomicina; *Staphylococcus aureus*, resistente à meticilina (SARM); *Klebsiella*, produtora de betalactamases de espectro alargado; *Acinetobacter*, resistente ao imipeneme; *Pseudomonas* resistente ao imipeneme; e *Enterobacter*, resistente às cefalosporinas de terceira geração. Posteriormente, o *Clostridium difficile* foi também integrado neste grupo [2, 21].



Number of reported bacteria is based on the information obtained based on request to national official sources on antibacterial susceptibility testing of at least one of the requested combinations, regardless of denominator data.
Data from United Arab Emirates originate from Abu Dhabi only.

Figura 5. Situação mundial da resistência antimicrobiana combinada em 2013 [21].

Tabela 2. Resistência bacteriana a determinados antibióticos. (adaptado de [21])

	Resistência/diminuição da suscetibilidade	Exemplo de Patologia associada
<i>Escherichia coli</i>	- Cefalosporinas de 3ª geração - Fluoroquinolonas	- Infecções do trato urinário - Infecções na Corrente Sanguínea
<i>Klebsiella Pneumoniae</i>	- Cefalosporinas de 3ª geração - Carbapenems	- Pneumonia - Infecções na Corrente Sanguínea - Infecções do trato urinário
<i>Staphylococcus aureus</i>	- Meticilina (SARM)	- Infecções em ferimentos - Infecções na Corrente Sanguínea
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	- Penicilina	- Pneumonia - Meningite - Otite
<i>Nontyphoidal Salmonella</i>	- Fluoroquinolonas	- Diarreia - Infecções na Corrente Sanguínea
<i>Shigella species</i>	- Fluoroquinolonas	- Diarreia
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	- Cefalosporinas de 3ª geração	- Gonorreia

Em 2011, a taxa do SARM à meticilina tem vindo a estabilizar, ou até mesmo a diminuir em vários países europeus. No entanto, a percentagem de SARM em todos os *Staphylococcus aureus* isolados manteve-se acima de 25% em 8 países dos estados membros UE em 2011 [21].

Segundo a Direção Geral de Saúde (DGS) e resultados do relatório de vigilância da resistência aos antimicrobianos na Europa 2011, a resistência de *Klebsiella pneumoniae* às cefalosporinas de terceira geração é muito elevada e preocupante na maioria dos países, o que significa que os tratamentos para pacientes com infeções potencialmente fatais são limitados apenas alguns antibióticos, como os carbapenems. Contudo, desde 2010, a resistência a estes antibióticos tem vindo a aumentar em alguns países, o que contribui para o agravamento da situação. As taxas de resistências às cefalosporinas e de multirresistência de *E. coli* são menores do que as de *Klebsiella pneumoniae*, mas também apresentam crescimento. A resistência de *E.coli* às quinolonas, principalmente nos países do sul e leste da Europa, é igualmente preocupante assim como o aparecimento de *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenems [2].

Portugal é o país europeu com mais elevada taxa de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina e está entre os países com taxa mais elevada de *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina, de *E. coli* resistente às quinolonas e de *Acinetobacter* com resistência exceto à colistina; a taxa de *Enterobacteriaceae* resistente a carbapenems apresenta cada vez mais preocupação, conforme expresso nos dados de vigilância epidemiológica da EARS-Net e no

estudo do *European Center for Prevention and Disease Control (ECDC)* 2011-2012 de infeção adquirida no hospital e de uso de antibióticos em hospitais portugueses [2].

2.3. Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETAR)

A Estação de Tratamento de Águas Residuais (ETAR) trata de águas de origem doméstica, mais propriamente conhecidas por esgotos sanitários ou efluentes. Depois de passarem por diversos processos que se dividem em tratamento preliminar ou pré-tratamento, tratamento primário, tratamento secundário e tratamento terciário, são lançadas para os recursos hídricos (rios e oceanos) em níveis de poluição aceitáveis por Lei, sem que haja o risco de prejudicar o ecossistema destes recursos. Para que o tratamento das águas seja eficiente, a concretização dos vários processos tem que alterar as características que tornam as águas prejudiciais [25].

2.3.2. Importância da ETAR no Ciclo Urbano da Água

O Ciclo Urbano da Água retrata a utilização que o Homem faz da água, a qual se encontra disponível na natureza, nomeadamente para consumo doméstico, agrícola, industrial, produção de energia e respetiva descarga de efluentes nos meios hídricos (rios ou oceanos) [25].

A ETA (Estação de Tratamento de Águas) e a ETAR apresentam um papel fundamental no ciclo urbano da água. A água dos rios e oceanos é captada pela ETA, armazenada e posteriormente distribuída na rede de distribuição de água, chegando aos diversos pontos de consumo (habitações, comércio, indústria, entre outros). Através de atividades ou ocorrências associadas à vida humana, as águas geradas deslocam-se para a rede de drenagem de águas residuais, que são posteriormente conduzidas para as ETAR, onde são submetidas a vários tratamentos, para serem lançadas de novo ao meio recetor (Figura 6) [25].



Figura 6. Ciclo urbano Da Água [25].

2.3.3. Caracterização das Águas Residuais

As águas residuais resultam de diversas atividades ou ocorrências associadas à vida humana, o que implica adoção de diferentes tipos de operações e processos de tratamento adequados em função do tipo de águas residuais a tratar [26].

Segundo o Decreto-Lei n.º 236/98, de 1 de Agosto, as águas residuais podem ser classificadas em três tipos: águas residuais domésticas: as águas residuais de serviços e de instalações residenciais, essencialmente provenientes do metabolismo humano e de atividades domésticas (lavagens, cozinha, etc.); águas residuais industriais: as águas residuais provenientes de qualquer tipo de atividade que não possam ser classificadas como águas residuais domésticas nem sejam águas pluviais e águas residuais urbanas: as águas residuais domésticas ou a mistura destas com águas residuais industriais e ou com águas pluviais. As águas pluviais são consideradas águas constituídas exclusivamente pelas escorrências derivadas pela precipitação [26].

Consoante estas atividades, as águas residuais apresentam diferentes características que refletem num tratamento específico para que a água possa ser lançada para os recursos hídricos com níveis de poluição aceitáveis sem que haja o risco de prejudicar o ecossistema destes recursos [26].

O tratamento das águas residuais só é possível através das Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETAR), infraestruturas que permitem a remoção da matéria poluente presente nas

mesmas. As ligações de coletores industriais aos coletores municipais necessitam de uma autorização, que depende das características do efluente industrial. Os municípios possuem um regulamento de descarga de águas residuais em coletores municipais que estabelece valores-limite para os constituintes das águas residuais, de modo a que o tratamento na ETAR não seja comprometido. Caso as unidades industriais não possuam efluentes com as características regulamentares, estes devem ser sujeitos a um tratamento prévio, antes de serem enviados para a ETAR. É essencial caracterizar as águas residuais a tratar para que ocorra um dimensionamento adequado da ETAR e o seu respetivo funcionamento. Os dois parâmetros mais importantes na caracterização de águas residuais afluentes à ETAR são o caudal e a quantidade de carga poluente [26].

As águas residuais transportam não só matéria orgânica biodegradável como também sólidos grosseiros, areias, gorduras, nutrientes como fósforo e azoto e outros possíveis contaminantes [26].

2.3.4. Sistemas de Tratamento de Águas Residuais

O tratamento de águas residuais é constituído por duas fases distintas de tratamento: uma corresponde ao tratamento da fase líquida, cujo objetivo é o tratamento da água residual, de forma a cumprir as condições exigidas na licença de descarga para o meio recetor; a outra corresponde ao tratamento da fase sólida, que permite tratar adequadamente os sólidos removidos da água residual na fase líquida. Pode ser ainda necessário o tratamento de odores resultantes da degradação da matéria orgânica existente nas águas residuais e que são eliminados no decorrer do processo de tratamento das ETAR. As instalações de apoio, bem como vários tipos de instrumentação e automação, são essenciais para um adequado funcionamento e exploração das ETAR, permitindo assim um melhor controlo das diversas etapas do sistema de tratamento e também melhorar a exploração [26].

Na Figura 7, está representado um esquema de uma linha de tratamento convencional de águas residuais, na fase líquida e fase sólida.

2.3.3.1. Fase Líquida

Nas Estações de Tratamento, as águas residuais passam por vários tratamentos: tratamento preliminar, tratamento primário, tratamento secundário e tratamento terciário.

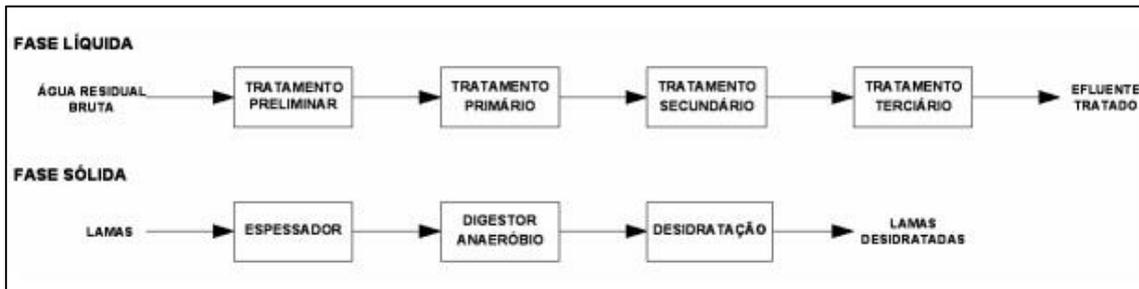


Figura7. Esquema de uma linha de tratamento convencional de águas residuais [27].

A tabela 3 resume os diferentes níveis de tratamento que podem constituir a fase líquida, bem como as operações e processos que lhes estão associados.

Tabela 3. Níveis de tratamento de águas residuais (adaptado de [27])

Nível de tratamento	Descrição	Operações e Processos
Preliminar	Remoção de sólidos grosseiros como trapos, paus, pedras, areia, óleos e gorduras, que possam danificar os equipamentos e os órgãos a jusante.	<ul style="list-style-type: none"> - Gradagem; - Desarenação; - Homogeneização e armazenamento; - Separação de óleos e gorduras
Primário	Remoção de uma parte dos materiais flotantes e sedimentáveis, nomeadamente sólidos suspensos e matéria orgânica, normalmente por decantação.	<ul style="list-style-type: none"> -Químico: neutralização (adição de reagentes químicos e coagulantes); -Físico: Flotação, Decantação, Filtração.
Secundário	Remoção da maioria da matéria orgânica por processos químicos e/ou biológicos. Nos processos em que há formação de flocos, é necessária uma nova decantação (decantação secundária) para a remoção dos flocos formados que incorporam a matéria orgânica removida. Pode haver remoção química ou biológica de nutrientes (fósforo, azoto ou fósforo e azoto).	<ul style="list-style-type: none"> - Lamas ativadas; - Leitos Percoladores; - Discos biológicos; - Lagoas anaeróbias; - Lagoas aeróbias; - Lagoas de estabilização; - Digestão anaeróbia; - Decantação (quando necessário)
Terciário	Remoção adicional de material dissolvido ou suspenso ainda presente após o tratamento secundário, usando combinações de operações e processos. Remoção/inativação de microrganismos.	<ul style="list-style-type: none"> - Coagulação de Decantação; - Filtração; - Adsorção sobre carvão; - Troca iónica; - Osmose inversa; - Desinfecção.

▪ **Tratamento Preliminar**

Num sistema de tratamento convencional, o tratamento preliminar apresenta as operações de gradagem, desarenamento e desengorduramento. As águas residuais quando chegam à ETAR arrastam consigo sólidos com dimensões consideráveis, podendo causar obstruções nos circuitos hidráulicos e afetar a eficiência ou eficácia dos processos seguintes. Para evitar tais acontecimentos, é importante remover esses materiais grosseiros, areias e gorduras através de processos de separação de sólidos antes do tratamento primário [27].

▪ **Tratamento Primário**

Após o tratamento preliminar, segue-se o tratamento primário que normalmente consiste numa decantação primária. O objetivo desta operação é a remoção de sólidos sedimentáveis e de escumas, reduzindo, desta forma, os sólidos suspensos. O efluente passa para o tratamento secundário e os sólidos decantados formam subprodutos. Pretende-se que, com este tratamento, a matéria poluente das águas residuais seja reduzida, no mínimo, 20% e o total das partículas sólidas em suspensão das águas recebidas seja reduzido, no mínimo, 50%. Este tratamento é efetuado através de sedimentação/decantação ou flotação [27].

▪ **Tratamento Secundário**

O tratamento secundário é constituído, geralmente, por processos biológicos que pretendem retirar a matéria orgânica biodegradável existente no efluente, na forma coloidal, dissolvida ou suspensa, que não foi removida no tratamento primário. A água residual é colocada em contacto com um meio rico em microrganismos que vão metabolizar essa matéria orgânica, retirando-a da fase líquida e incorporando-a na sua biomassa. Esta fase de tratamento pode atingir uma eficácia de 95% ou mais, dependendo da ETAR [27].

▪ **Tratamento Terciário**

Após o tratamento secundário, a qualidade do efluente pode ainda não ser suficiente para cumprir os valores de descarga, principalmente quando a descarga é realizada em zonas

sensíveis. Para isso, tem que cumprir os valores de descarga mais exigentes, incluindo a remoção de azoto e fósforo, como referido no Decreto-Lei n.º152/97 de 19 de Junho [27, 28].

Esta fase complementa as etapas anteriores de tratamento, tendo como objetivos a remoção de determinados poluentes que não tenham sido removidos no tratamento secundário, como partículas dificilmente decantáveis, microrganismos patogénicos, nutrientes, como o azoto e fósforo, ou outros compostos como herbicidas e pesticidas, e para conferir qualidade ao efluente de modo a que este possa ser reutilizado. As águas residuais são cada vez mais reutilizadas em usos não potáveis, em situações em que a água é mais escassa para abastecimento, como por exemplo na irrigação e na rega de jardins, espaços públicos e campos de golfe [27, 28].

Os processos utilizados dependem dos objetivos que se pretendem. Estes podem ser precipitação química, tratamento biológico e desinfecção. A precipitação química ou o tratamento biológico são utilizados na remoção de nutrientes, como o fósforo e azoto. A desinfecção é utilizada na inativação/remoção de microrganismos patogénicos presentes no efluente. Isto acontece, principalmente, quando se pretende reutilizar este mesmo ou quando a descarga deste é feita em águas balneares ou de zonas próximas de captação de água para consumo humano. Neste tratamento, recorre-se ao cloro, ozono ou radiação ultravioleta. Este tratamento é feito essencialmente por uma questão de saúde pública [27, 28].

No entanto, o tratamento terciário é raramente aplicado no tratamento de águas residuais em Portugal, devido aos seus custos elevados e requisitos de manutenção [8].

2.3.3.2. Fase Sólida

Ao longo das operações e tratamentos da fase líquida vão sendo produzidos subprodutos, como mostra a tabela 4. Estes subprodutos, antes de ser encaminhados para o seu destino final, sofrem um tratamento, de modo a tornar o seu manuseamento mais fácil e mais seguro, assim como a reduzir os custos do seu transporte até ao seu destino final. O tratamento das lamas é geralmente constituído por três fases. Primeiramente, estas sofrem um tratamento designado por espessamento. Posteriormente, dependendo do seu destino final, podem ser estabilizadas e em seguida são enviadas para desidratação [27].

Tabela 4. Subprodutos gerados ao longo das operações e processos de um tratamento convencional da fase líquida (adaptado de [27]).

Operação/Processo	Subproduto Gerado
Gradagem	Gradados
Desarenação	Areias
Desengorduramento	Gorduras
Tratamento Primário	Lamas Primárias (e Gorduras)
Tratamento Secundário	Lamas Secundárias ou Biológicas

2.3.4. Desinfecção

Muitos microrganismos patogênicos podem ser transmitidos através de água contaminada por efluentes. Desta maneira, o processo de desinfecção é fundamental para que não haja transmissão de microrganismos que possam colocar em causa a saúde pública. Os processos de desinfecção mais utilizados no tratamento de efluentes são a cloração/descloração, ozônio e radiação ultravioleta [29].

Num estudo desenvolvido por Murray et al. (1984) que consistiu em avaliar o efeito da cloração em bactérias resistentes a antibióticos, isoladas de águas residuais, foi verificado, em laboratório, um aumento significativo na percentagem de estirpes resistentes a diversos antibióticos (2 ou 3 antibióticos) facilitando, assim, a transferência da resistência para uma bactéria possivelmente patogénica. Os autores verificaram que 84% das estirpes isoladas foram resistentes a, pelo menos, um antibiótico testado, sendo que 79,5% foi no efluente bruto; 88,2% no efluente clorado e 81,2% no efluente final [30].

Relativamente ao tratamento por radiação ultravioleta, os primeiros registos que relatam o uso deste processo para a desinfecção de água datam o ano de 1877, quando se verificou que era possível inativar microrganismos quando estes eram expostos à radiação ultravioleta. A ação germicida da radiação UV está associada a alterações estruturais que esta provoca no *DNA* das células, consequência de reações fotoquímicas desencadeadas pela absorção da radiação pelas moléculas que constituem o *DNA* [29].

A eficácia de um sistema de desinfecção por ultravioleta depende: das características do afluente, da concentração de coloides e partículas de esgoto; da intensidade da radiação UV aplicada (de

preferência com um comprimento de onda entre os 250-270 nm); do tempo de exposição dos microrganismos à radiação e da configuração do reator. Apesar do dano do *DNA*, devido à radiação UV, as bactérias podem recuperar a atividade de replicação, sob luz visível, através de um processo designado por fotorreativação [31].

A desinfecção com UV resulta na diminuição não significativa da percentagem de coliformes totais resistentes à estreptomicina, no entanto existe um aumento significativo na percentagem destes microrganismos resistentes à tetraciclina e cloranfenicol, após o processo de desinfecção. Meckel (1982) acredita que a proteína específica responsável pela resistência bacteriana à tetraciclina possa absorver a luz UV suficiente para permitir que esta adquira proteção à radiação UV [32].

Capítulo 3

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Preparação dos meios de crescimento com antibióticos

3.1.1. Preparação das soluções dos antibióticos

Os antibióticos selecionados para avaliar a suscetibilidade bacteriana foram: Gentamicina (GENT), Tetraciclina (TET), Ampicilina (AMP), Ciprofloxacina (CIP), Vancomicina (VAN), Cloranfenicol (CHL) e Rifampicina (RIF). Cada antibiótico escolhido representa uma das classes de agentes antimicrobianos mais utilizados. As concentrações utilizadas para a preparação das soluções *stock* dos antibióticos foram definidas conforme as recomendações da *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), tal como mostra a Tabela 5.

Tabela 5. Preparação de soluções de agentes antimicrobianos [33].

Antibióticos	MIC* ($\mu\text{g/mL}$)	Solvente (200 μl)	Diluyente (800 μl)	Massa (g)	Volume (mL)
GENT	16	H ₂ O	H ₂ O	0.0016	1
TET	16	H ₂ O	H ₂ O	0.0016	1
AMP	32	PBS 0.1 M	PBS 0.1 M	0.0032	1
CIP	8	H ₂ O	H ₂ O	0.0008	1
VAN	32	H ₂ O	H ₂ O	0.0032	1
CHL	32	Etanol 95%	H ₂ O	0.0032	1
RIF	4	Metanol	H ₂ O	0.0004	1

* segundo as recomendações da CLSI

3.1.2. Meios de cultura

O meio de cultura utilizado para o crescimento bacteriano das várias amostras foi o *Tryptic Soy Agar* (TSA). O meio TSA é um meio nutritivo sólido, resultante da adição de Agar (Sigma®) ao meio *Tryptic Soy Broth* (TSB) (Liofilchem®). Este meio permite o crescimento e desenvolvimento de uma grande variedade de microrganismos, nomeadamente bactérias aeróbias e anaeróbias.

O meio de cultura foi posteriormente autoclavado a 121 °C durante 20 minutos antes da sua utilização.

3.1.3. Preparação das placas de crescimento

O meio de cultura e a solução de cada antibiótico preparado foram misturados e colocados em placas de Petri, sendo que em algumas placas foi adicionado apenas o meio *TSA* (sem antimicrobiano). Para inibir o crescimento de fungos, incorporou-se nas placas Amphotericin B® uma concentração de 1 mg/L. As placas foram solidificadas à temperatura ambiente e usadas dentro de um período de 48 horas, devido à degradação do fármaco [34].

3.2. Recolha das amostras

As cinco amostras recolhidas e analisadas posteriormente foram provenientes da Estação de Tratamento de Águas Residuais (ETAR) de Braga. A data da recolha e o local de amostragem: afluente bruto (A.), efluente antes da desinfecção (E.A.F) e efluente final (E.F), encontra-se registado na tabela 6.

Tabela 6. Amostragem referente à ETAR de Braga

Campanha de amostragem	Data da Recolha	Local de amostragem					
		A	V [L]	E.A.F	V [L]	E.F	V [L]
1	7/1/14	✓	3,0	×	-	✓	5,0
2	25/3/14	✓	1,0	×	-	✓	1,0
3	22/4/14	✓	1,0	✓	1,0	✓	1,0
4	21/5/14	✓	1,0	✓	1,0	✓	1,0
5	18/6/14	✓	1,0	✓	1,0	✓	1,0

As amostras 1 e 2 foram recolhidas apenas em dois pontos da ETAR correspondentes: ao afluente bruto (A.) e efluente final (E.F). Com o objetivo de analisar a importância do tratamento terciário (tratamento de desinfecção) na remoção da carga bacteriana presente no efluente final, considerou-se incluir nas recolhas subsequentes o efluente antes do tratamento terciário (E.A.F). Na figura 8, encontra-se esquematizada a linha de tratamento de águas residuais e o local onde as amostras foram recolhidas.

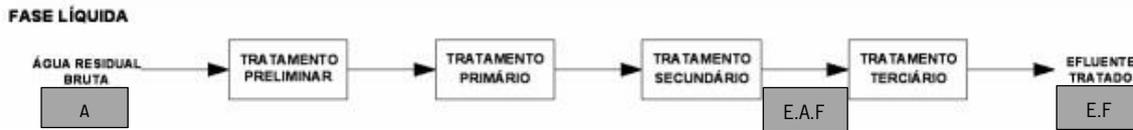


Figura 8. Esquema de uma linha de tratamento convencional de águas residuais e local da recolha dos efluentes (adaptado de [27]).

Todas as amostras foram devidamente recolhidas (certificando-se sempre de que todos os níveis de tratamento da ETAR de Braga estavam a funcionar corretamente), identificadas e transportadas para o laboratório. Todas as amostras foram processadas no próprio dia da colheita.

As condições atmosféricas presenciadas no dia da recolha das diferentes amostras não foram totalmente semelhantes, observando-se alguns casos completamente diferentes. Observou-se que, em dias de maior precipitação, as amostras se apresentavam mais diluídas em comparação com amostras recolhidas em dias de menor precipitação. No entanto, como a análise dos resultados não se baseia numa análise quantitativa, este fator não foi tido em conta.

3.3. Processamento das amostras e crescimento das bactérias cultiváveis

Após a recolha as amostras foram centrifugadas (SIGMA 4K15 ®) a 4 °C e a uma velocidade de 8000 *g* durante 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e ressuspendeu-se o pellet em 4 ml de *Phosphate buffered saline (PBS)*, sujeitando-o em seguida a uma diluição de 1/10 em PBS. Posteriormente, foram plaqueados 25 µl da amostra diluída em placas de petri, com a ajuda de espalhadores estéreis. As placas foram incubadas a 37 °C durante 24 h. Para as primeiras amostras recolhidas, o tempo de incubação estendeu-se às 48 h para as placas em que não houve crescimento considerável. No entanto decidiu-se que, para as amostras posteriores, não se sujeitava as 48 h, pois apenas se verificava um aumento do diâmetro das colónias e não o crescimento de novas colónias e poderia pôr-se em causa a atividade do antibiótico (figura 9).



Figura 9. Placas com 48 horas de incubação (à esquerda) e 24 horas de incubação (à direita)

Posteriormente, as colónias formadas, e visivelmente isoladas umas das outras, foram recolhidas com a ajuda de palitos estéreis para *ependorf's* devidamente identificados e colocados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Cada colónia foi recolhida de forma aleatória, mas com o máximo de cuidado, para garantir que se recolhia apenas microrganismos da mesma espécie. Posteriormente, toda a comunidade bacteriana presente em cada uma das placas de petri foi recolhida, com ajuda de zaragatoas estéreis e armazenada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, até serem utilizadas.

3.4. Análise molecular da comunidade bacteriana

3.4.1. Extração de *DNA*

A extração do *DNA* genómico de amostras pode ser feita de duas formas: direta ou indireta. O princípio básico da extração direta consiste na suspensão de cada uma das amostras em soluções que possuem detergentes que provocam o enfraquecimento das paredes celulares dos microrganismos e de pérolas de vidro, que rompem as células sob forte agitação, libertando para o meio os seus componentes moleculares. Para finalizar, o *DNA* resultante é sujeito a etapas de purificação [35].

Existem no mercado diferentes *kits* de extração de *DNA*, sendo que a extração de todas as comunidades bacterianas recolhidas foi feita de acordo com o protocolo do *FastDNA@SPIN Kit for Soil* (Qbiogene, Carlsbad, CA, EUA) [36].

O *DNA* genómico das colónias recolhidas individualmente foi extraído através da lise celular, 10 minutos a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, usando um termociclador.

3.4.2. Reação de Polimerização em cadeia (*PCR*)

A diversidade da comunidade bacteriana presente nas diferentes amostras de DNA foi analisada por eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE). O produto da reação de PCR foi preparado para um volume final de 50 μl , utilizando os reagentes e volumes descritos na Tabela 7. Para esta análise foram amplificadas por PCR as regiões V6 a V8 dos genes 16S rRNA do domínio Bacteria, usando os primers 968-F (5'-GAA CGC GAA GAA CCT TAC-3') ([37]) com uma GC-Clamp (5'- CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G-3') ([38]) e 1401-R (5'-CGG TGT GTA CAA GAC CC-3') ([37]). O programa usado para a amplificação está descrito na tabela 8.

Tabela 7. Reagentes e respectivos volumes usados para cada *PCR*.

Reagentes	Volumes
10x PCR <i>reaction buffer</i> (<i>without</i> MgCl ₂)	5 μl
MgCl ₂	6 μl
dNTPs (10 mM)	1 μl
968GC-F (10 μM)	1 μl
1401-R (10 μM)	1 μl
PCR <i>water</i>	34.75 μl
Taq <i>DNA</i> polymerase	0.25 μl

Após a realização da *PCR*, as amplificações obtidas foram visualizadas através de eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) e coloração com SYBR®Safe (Invitrogen - Life Technologies). Os géis correram a voltagem constante de 100 V num sistema de eletroforese (Mupid-EX, Bélgica) durante cerca de 20 minutos. Os ácidos nucleicos foram detetados usando o transluminador de UV ChemiDoc™ (BioRad, CA, EUA).

Tabela 8. Programa de *PCR* usado para a amplificação das regiões V6 a V8 dos genes 16S *rRNA* do domínio *Bacteria*

Fase	Temperatura	Tempo	N.º ciclos
Desnaturação inicial	94 °C	2 minutos	1x
Desnaturação	94 °C	30 segundos	35x
Emparelhamento	56 °C	40 segundos	35x
Extensão	72 °C	1 minuto	35x
Extensão final	72 °C	5 minutos	1x
Conservação	4 °C	∞	—

3.4.3. Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (*DGGE*)

Os genes 16S, parcialmente amplificados por *PCR*, foram separados por *DGGE* para obter o perfil dos ribotipos bacterianos dominantes. Cada banda no gel representa uma espécie ou várias espécies bacterianas e a imagem final do gel corresponderá a um padrão referente à comunidade bacteriana das amostras recolhidas. A análise por *DGGE* foi realizada através de um sistema DCode (BioRad) com *50x TAE buffer* durante 16 horas a 85 V e 60° C em gel de poliacrilamida (8%) contendo um gradiente desnaturante linear entre 30% e 60%. A solução 100% desnaturante era constituída por ureia 7M e 40 % de formamida. Em cada “poço” do gel foi aplicado cerca de 10-20 µl de produto de *PCR* (dependente da qualidade do produto de *DNA* extraído de cada amostra) misturado com cerca 3-5 µl de corante para eletroforese de *DNA*. Após a corrida, cada gel foi retirado da placa e corado com prata, conforme descrito por Sanguinetti et al. ([39]).

Os géis de *DGGE* foram de seguida digitalizados a 600 dpi. As alterações da comunidade bacteriana foram descritas como mudanças nos perfis de *DGGE* das regiões parcialmente amplificadas do gene 16S.

3.4.4. Sequenciação dos genes 16S *rRNA*

De modo a identificar a filogenia das bactérias recolhidas individualmente, os genes 16S *rRNA* do domínio *Bacteria* foram seletivamente amplificados do *DNA* previamente extraído, usando os

primers 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-GGYTACCTTGTTAACGACTT-3')([40]). O programa de amplificação utilizado encontra-se descrito na tabela 9.

A qualidade dos produtos de *PCR* obtidos foi analisada em gel de agarose (1%) e as reações de sequenciação, por método de Sanger, foram realizadas na empresa *Macrogen* (Amesterdão, Holanda).

As sequências parciais obtidas foram montadas usando a aplicação CAP incluída no software BioEdit v7.0.9. As regiões consensus obtidas foram verificadas para a existência de potenciais quimeras usando os softwares Mallard v1.02 e Pintail v1.1. As pesquisas de similaridade para as sequências do gene 16S dos clones foram realizadas usando o programa de pesquisa NCBI BLAST ([41]) da base de dados GenBank, possibilitando a identificação dos diferentes membros da comunidade microbiana.

De modo a identificar a filogenia da comunidade bacteriana com resistência aos vários antibióticos testados, procedeu-se ao envio do *DNA* extraído destas comunidades para sequenciação dos genes 16S *rRNA* do domínio Bacteria usando a plataforma MiSeq Illumina na empresa *Research and Testing Laboratory* (Texas, USA).

Tabela 9 Programa de *PCR* utilizado para a amplificação dos genes 16S *rRNA* do domínio *Bacteria*

Fase	Temperatura	Tempo	N.º ciclos
Desnaturação inicial	94 °C	4 minutos	1x
Desnaturação	94 °C	45 segundos	25x
Emparelhamento	51 °C	45 segundos	25
Extensão	72 °C	55 segundos	25
Extensão final	72 °C	8 minutos	1x
Conservação	4 °C	∞	—

3.5. Caracterização genética dos integrões de genes de resistência a antibióticos

A caracterização da classe de integrões presente nas amostras analisadas foi efectuada por *PCR* utilizando primers específicos para cada classe, e condições de amplificação descritas na Tabela 10. As amplificações obtidas foram visualizadas através de eletroforese em gel de agarose 1%

(p/v) e coloração com SYBR®Safe (Invitrogen - Life Technologies). Os géis correram a voltagem constante de 100 V num sistema de eletroforese (Mupid-EX, Bélgica) durante cerca de 30 minutos. Os produtos de *PCR* foram detetados usando o transluminador de UV ChemiDoc™ (BioRad, CA, EUA).

Tabela 10. *Primers* e condições de amplificação utilizados (adaptado de [42, 43])

Primers (sequência 5' a 3')	Condições de amplificação		
	Temperatura	Tempo	N ° ciclos
Região variável do integrão de classe 1 (Int1) F: CCTCCCGCACGATGATC R: TCCACGCATCGTCAGGC	94°C	4 min.	X1
	94°C	45 seg.	
	55°C	45 seg.	X35
	65°C	55 seg.	
	72°C	8 min.	X1
Região variável do integrão de classe 2 (Int2) F: TTATTGCTGGGATTAGGC R: ACGGCTACCCTCTGTTATC	94°C	4 min.	X1
	94°C	45 seg.	
	50°C	45 seg.	X35
	65°C	55 seg.	
	72°C	8 min.	X1
Região variável do integrão de classe 3 (Int3) F: AGTGGGTGGCGAATGAGTG R: TGTTCTTGATCGGCAGGTG	94°C	4 min.	X1
	94°C	45 seg.	
	50°C	45 seg.	X35
	65°C	55 seg.	
	72°C	8 min.	X1

Capítulo 4

**ANÁLISE E DISCUSSÃO
DOS RESULTADOS**

4.1. Presença e diversidade de integrões de genes de resistência a antibióticos

A tabela seguinte mostra a diversidade dos integrões detetados nas cinco campanhas de amostragens recolhidas da água residual afluyente à ETAR(A) e efluente final (E.F).

Tabela 11. Presença e diversidade dos integrões nas amostras recolhidas

Nº Campanha de amostragem	Tipo de Efluente	Diversidade dos Integrões		
		Classe 1	Classe 2	Classe 3
1	A	✓	✓	×
	E.F	✓	×	×
2	A	✓	✓	×
	E.F	✓	×	×
3	A	✓	✓	✓
	E.F	✓	✓	✓
4	A	✓	✓	×
	E.F	✓	×	×
5	A	✓	✓	×
	E.F	✓	✓	×

Verificou-se a presença de integrões de classe 1 em todas as amostras recolhidas, de integrões de classe 2 em todas as amostras de afluyente (A) analisadas e nas amostras do efluente final (E.F) da 3ª e 5ª campanha de amostragem, e de integrões de classe 3 apenas no afluyente e efluentes da 3ª campanha de amostragem. A presença de integrões indica a existência de microrganismos com multirresistência. No entanto, a ausência de integrões nas amostras não indica, necessariamente, que estas não apresentem multirresistência. Possivelmente possuem também outros mecanismos de resistência codificados por genes não associados a elementos móveis do tipo dos integrões que lhes conferem resistência [44].

Sabe-se da literatura, que os integrões de classe 1 têm sido os mais estudados devido à sua ampla distribuição entre bactérias Gram-negativas e os mais relatados em humanos e animais, sendo que os integrões de classe 2 são o segundo grupo mais descrito e os de classe 3 os menos descritos. Comparando a presença das diferentes classes de integrões, como mostra a

tabela 11, verifica-se uma maior presença de integrões de classe 1 comparada com os de classe 2 e 3, tal como indicado por outros investigadores [23, 24, 45].

A presença de integrões nas amostras de efluente final da ETAR deve-se, possivelmente, a uma ineficácia dos processos atuais de tratamento das águas residuais, como é mencionado por vários autores. Apesar de se verificar uma diminuição da carga bacteriana, os processos de tratamento atuais não são eficazes na remoção de bactérias com multirresistência. A prevalência e a abundância de integrões no efluente final não é reduzida, e em muitos casos ainda consegue ser superior do que o efluente inicial [45].

A presença de integrões em efluentes tratados sugere que as águas residuais domésticas podem favorecer a formação de novas combinações de cassetes de genes. Além disso, a alta prevalência de multirresistência destaca a necessidade urgente de se implementar meios eficazes de desinfecção de efluentes para evitar a disseminação de bactérias multirresistentes [24].

4.2. Perfil bacteriano

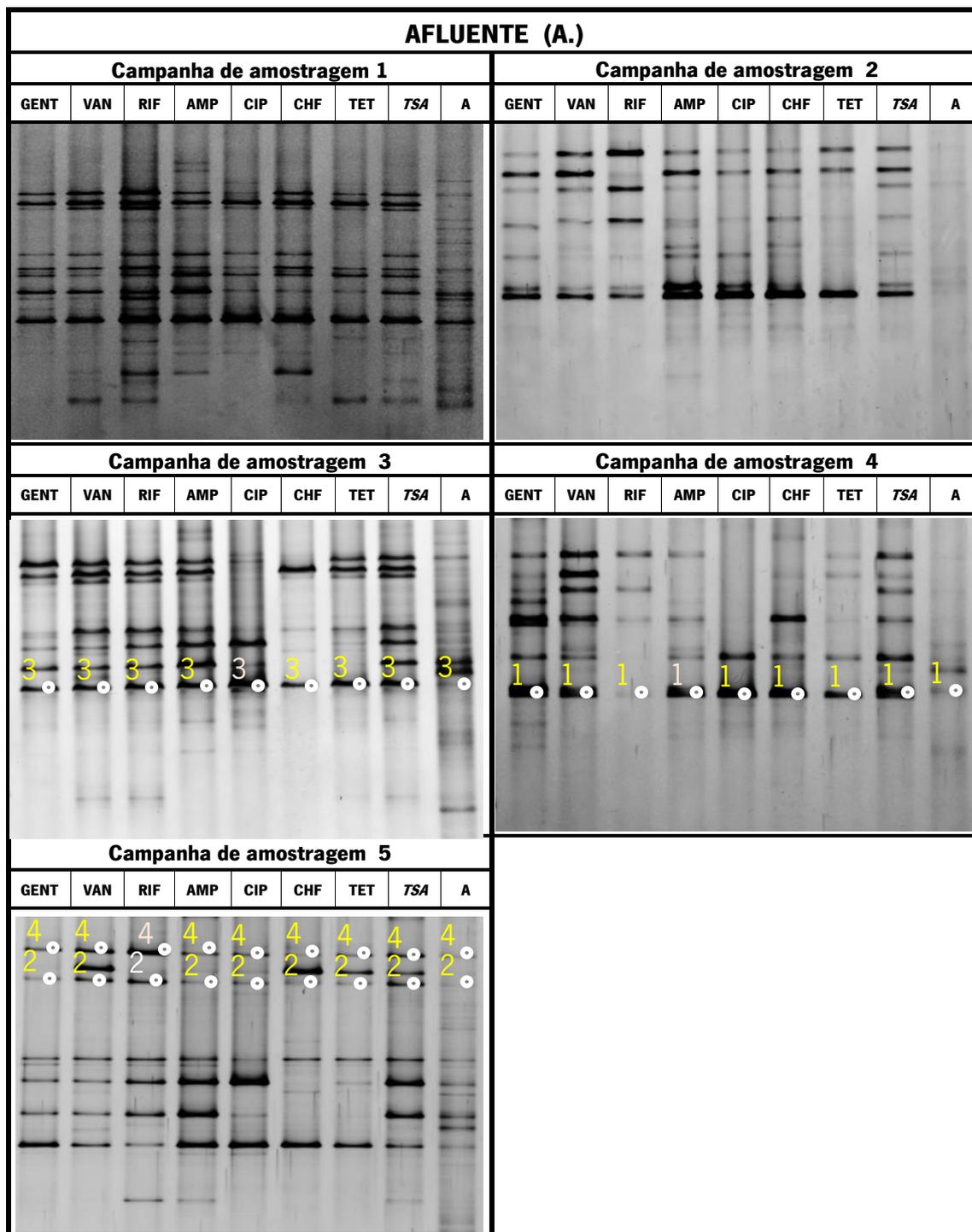
A diversidade bacteriana presente nos vários pontos de tratamento da ETAR (A, E.A.F e E.F) com resistência aos vários antibióticos testados, foi comparada por análise em *DGGE* dos fragmentos do gene 16S do *rRNA* amplificados.

As maiores vantagens do método de amplificação do gene do 16S do *rRNA* seguido de *DGGE* para análise da dinâmica de populações são a sua reprodutibilidade e capacidade de comparar várias amostras simultaneamente, no mesmo gel [46].

Neste tipo de análise parte-se do princípio, que alterações na intensidade das bandas no *DGGE* refletem a abundância relativa das diferentes espécies nas comunidades bacterianas [46].

4.2.1. Perfil bacteriano da água residual afluyente à ETAR

Os perfis de *DGGE* da comunidade bacteriana presente - na água residual afluyente a ETAR (A.), cultivável em meio *TSA* e cultivável em *TSA* suplementado com os vários antibióticos testados (GENT, VAN, RIF, AMP, CIP, CHF e TET) encontram-se ilustrados na figura 10.



Legenda:

GENT	Amostra do A cultivável em meio <i>TSA</i> suplementado com antibiótico Gentamicina
VAN	Amostra do A cultivável em meio <i>TSA</i> suplementado com antibiótico Vancomicina
RIF	Amostra do A cultivável em meio <i>TSA</i> suplementado com antibiótico Rifampicina
AMP	Amostra do A cultivável em meio <i>TSA</i> suplementado com antibiótico Ampicilina
CIP	Amostra do A cultivável em meio <i>TSA</i> suplementado com antibiótico Ciprofloxacina
CHF	Amostra do A cultivável em meio <i>TSA</i> suplementado com antibiótico Cloranfenicol
TET	Amostra do A cultivável em meio <i>TSA</i> suplementado com antibiótico Tetraciclina
TSA	Amostra do A cultivável em meio <i>TSA</i>
A	Amostra padrão do Afluente

Figura 10. Perfis Bacterianos 16S-DGGE da água residual afluente (A) à ETAR.

Comparando os perfis resultantes das cinco amostras recolhidas, estes mantiveram-se semelhantes, sendo possível verificar a existência de bandas, muitas delas em comum, indicando a presença dos mesmos ribotipos bacterianos, igualmente representativos.

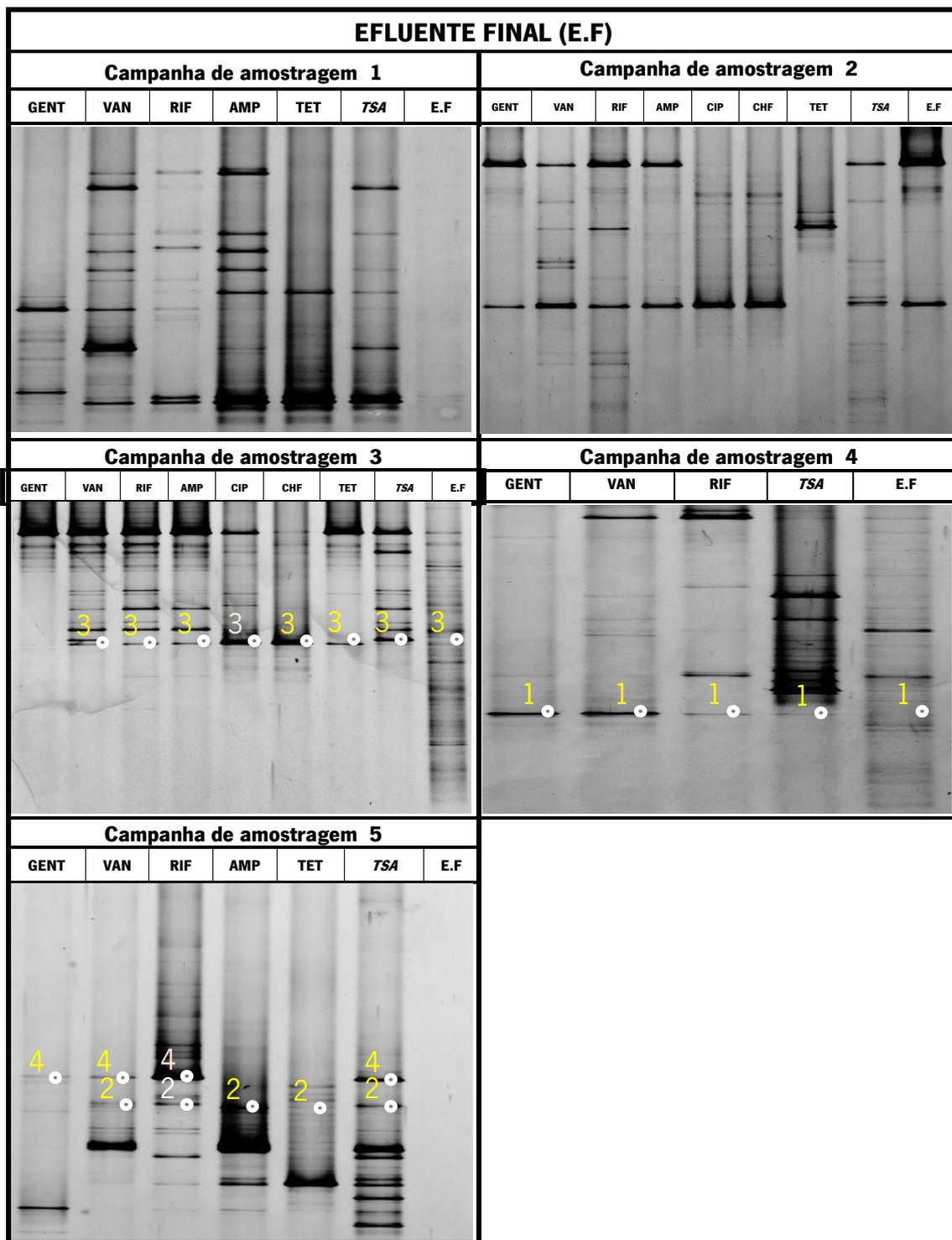
Relativamente às variações entre intensidade das bandas nos géis sugerem que alguns dos microrganismos presentes serão mais dominantes que outros. Algumas das bandas apareceram de uma forma claramente mais predominante nas amostras em relação a outras, daí serem consideradas como diferenciadoras pela intensidade [46, 47].

Analisando a figura 10 e comparando as várias amostras, os perfis bacterianos relativos aos meios de *TSA* suplementados com o antibiótico Ciprofloxacina, Cloranfenicol e Tetraciclina são os que apresentam menos bandas, o que implica uma menor variedade de microrganismos, comparativamente aos outros antibióticos testados.

4.2.2. Perfil bacteriano do efluente da ETAR (E.F)

Os perfis de *DGGE* da comunidade bacteriana presente no efluente final (E.F), cultivável em meio *TSA* e cultivável em *TSA* suplementado com os vários antibióticos testados (Gentamicina, Vancomicina, Rifampicina, Ampicilina, Ciprofloxacina, Cloranfenicol e Tetraciclina) encontram-se ilustrados na figura 11.

Comparando os vários perfis (figura 11), verifica-se que estes também se mantêm semelhantes entre si, sendo possível verificar a existência de bandas, muitas delas em comum, indicando a presença do mesmo ribotipo bacteriano. A existência de certas bandas mais intensas do que outras sugere que determinados microrganismos são mais predominantes do que outros.



Legenda:

GENT	Amostra do E.F cultivável em meio <i>TSA</i> suplementado com antibiótico Gentamicina
VAN	Amostra do E.F cultivável em meio <i>TSA</i> suplementado com antibiótico Vancomicina
RIF	Amostra do E.F cultivável em meio <i>TSA</i> suplementado com antibiótico Rifampicina
AMP	Amostra do E.F cultivável em meio <i>TSA</i> suplementado com antibiótico Ampicilina
CIP	Amostra do E.F cultivável em meio <i>TSA</i> suplementado com antibiótico Ciprofloxacina
CHF	Amostra do E.F cultivável em meio <i>TSA</i> suplementado com antibiótico Cloranfenicol
TET	Amostra do E.F cultivável em meio <i>TSA</i> suplementado com antibiótico Tetraciclina
TSA	Amostra do E.F cultivável em meio <i>TSA</i>
E.F	Amostra padrão do Efluente Final

Figura 11. Perfil Bacteriano 16S-DGGE do efluente final (E.F).

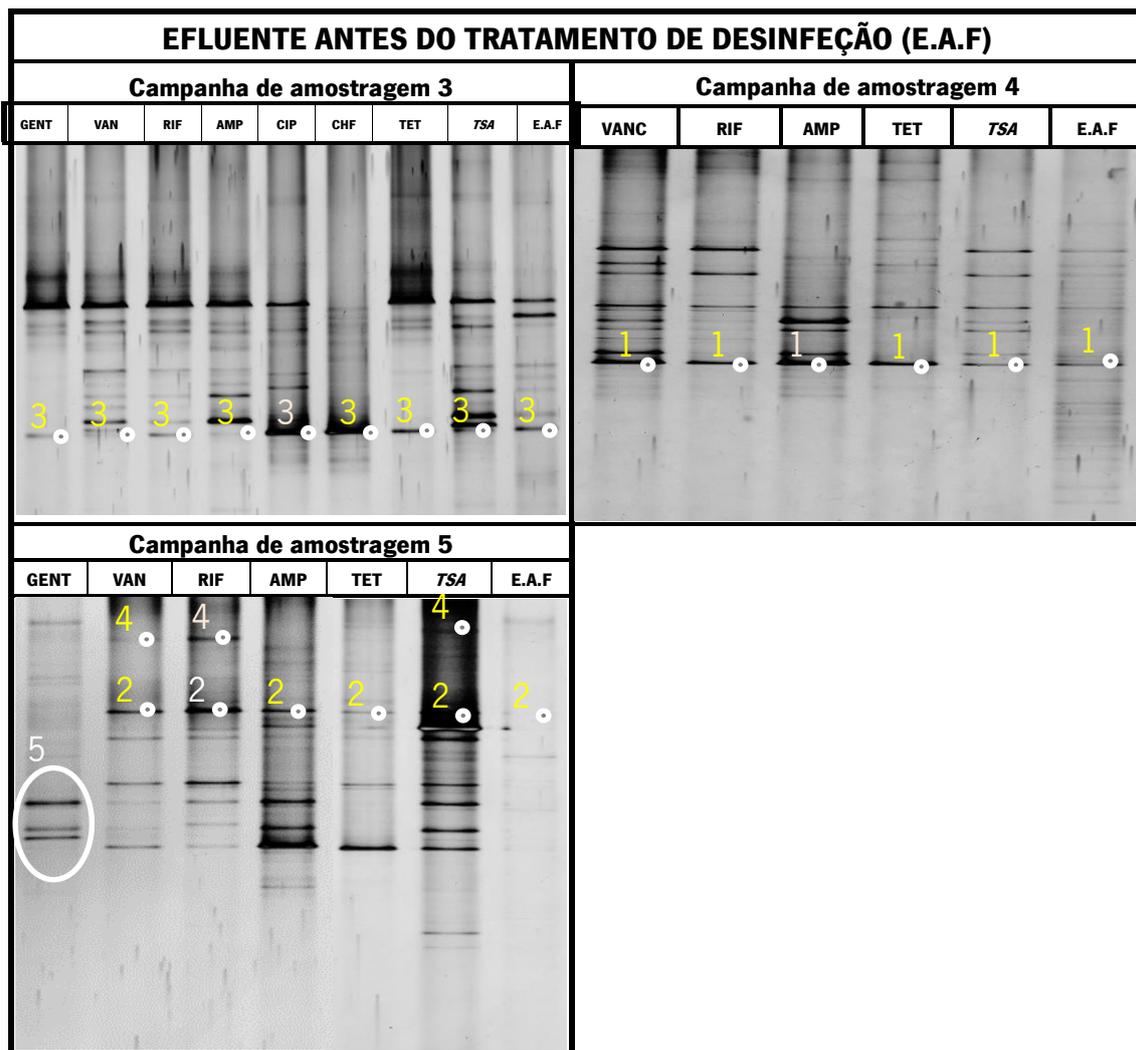
Comparativamente à figura 10, verifica-se uma diminuição do número de bandas do perfil 16S-*DGGE* do E.F e que a sua distribuição seguiu padrões diferentes, ou seja, agruparam-se de forma diferente da verificada nos perfis do A. No entanto, verifica-se a existência de bandas que são detetadas nos dois pontos de recolha, indicando que a população bacteriana afluente à ETAR se vai mantendo ao longo do tratamento, caso das bandas 1,2,3 e 4 que podemos visualizá-las tanto no perfil do A. (figura 10) como no perfil do E.F (figura 11). A permanência das bandas, o que indica a permanência do microrganismo no efluente final, pode ser explicada pelo insucesso dos processos de tratamento da ETAR na eliminação de bactérias multirresistentes, o que pode levar à sua dispersão no meio ambiente [48].

Comparando as bandas 1,2,3 e 4 presentes no perfil do A. e E.F, verifica-se uma diminuição da intensidade das bandas e até mesmo a ausência de algumas delas nos perfis bacterianos relativos aos meios de *TSA* suplementados com o antibiótico Ciprofloxacina e Cloranfenicol, o que implica uma menor variedade de microrganismos, comparativamente aos outros antibióticos testados

Observando os perfis correspondentes às amostras da 1^a,4^a e 5^a campanha de amostragem, verifica-se não só a diminuição das bandas como foi referido anteriormente, mas também a ausência de perfis de amostras do E.F cultivável em meio *TSA* suplementado com os antibióticos Ciprofloxacina, Cloranfenicol (campanha de amostragem 1 e 5) e Ciprofloxacina, Cloranfenicol, Ampicilina e Tetraciclina (campanha de amostragem 4), o que sugere que a comunidade bacteriana presente no A. com resistência a estes antibióticos foi eliminada pelos processos de tratamento da ETAR, explicando a ausência dos perfis no E.F. Esta ausência indica que os microrganismos presentes no efluente inicial não apresentavam genes de resistência aos antibióticos Ciprofloxacina e Cloranfenicol, comparativamente aos outros antibióticos testados.

4.2.3. Perfil Bacteriano do efluente antes do tratamento de desinfecção (E.A.F)

Os perfis de *DGGE* da comunidade bacteriana presente no efluente antes da etapa de desinfecção (E.A.F), cultivável em meio *TSA* e cultivável em *TSA* suplementado com os vários antibióticos testados (GENT, VAN, RIF, AMP, CIP, CHF e TET) encontram-se ilustrados na figura 12.



Legenda:

GENT	Amostra do E.A.F cultivável em meio <i>TSA</i> suplementado com antibiótico Gentamicina
VAN	Amostra do E.A.F cultivável em meio <i>TSA</i> suplementado com antibiótico Vancomicina
RIF	Amostra do E.A.F cultivável em meio <i>TSA</i> suplementado com antibiótico Rifampicina
AMP	Amostra do E.A.F cultivável em meio <i>TSA</i> suplementado com antibiótico Ampicilina
CIP	Amostra do E.A.F cultivável em meio <i>TSA</i> suplementado com antibiótico Ciprofloxacina
CHF	Amostra do E.A.F cultivável em meio <i>TSA</i> suplementado com antibiótico Cloranfenicol
TET	Amostra do E.A.F cultivável em meio <i>TSA</i> suplementado com antibiótico Tetraciclina
TSA	Amostra do E.A.F cultivável em meio <i>TSA</i>
E.A.F	Amostra padrão do Efluente antes do tratamento de desinfecção

Figura 12. Perfil Bacteriano 16S-DGGE do Efluente Antes do Tratamento de Desinfecção (E.A.F).

Comparando os perfis 16S-DGGE do A. (Figura 10) e E.A.F (Figura 12) verifica-se uma diminuição do número de bandas, o que sugere que os tratamentos da ETAR anteriores ao tratamento de desinfecção (tratamento primário e secundário) foram eficazes na eliminação de alguns dos microrganismos com resistência aos antibióticos testados presentes no A.. Contudo, a presença de outras bandas é indicativo que esses tratamentos foram ineficazes na eliminação de outras bactérias. Esta ineficácia sugere a presença de bactérias multirresistentes a antibióticos. Relativamente às amostras da 4ª e 5ª campanha de amostragem, não se obteve

perfis bacterianos na presença dos antibióticos CIP e CHF, indicando que os tratamentos antes do tratamento terciário foram eficazes na eliminação da comunidade bacteriana, sugerindo a ausência de multirresistência.

Comparando os perfis 16S-*DGGE* do E.A.F (Figura 12) e E.F (Figura 11), também se verifica uma diminuição do número de bandas mas a persistência de outras, sugerindo que o tratamento de desinfecção é eficaz na eliminação de alguns microrganismos mas não de todos, comprometendo a qualidade do efluente que será encaminhado para o meio hídrico. Estas evidências permitem concluir que o tratamento de desinfecção incluído na ETAR não está a ser eficiente na eliminação de bactérias com resistência a antibióticos. Num estudo realizado, mostra-se que são inúmeras as investigações que evidenciam que as ETAR convencionais não garantem a completa eliminação de microrganismos, nomeadamente os potencialmente patogénicos [49, 50].

O insucesso do tratamento de desinfecção na eliminação de alguns dos microrganismos presentes nas amostras, poderá também ser explicado por um fenómeno designado por fotorreativação. Apesar do dano no *DNA* devido à radiação dos UV, as bactérias podem recuperar a atividade de replicação, sob luz visível [33].

4.3. Identificação dos isolados obtidos e sua correspondência nos perfis 16S-*DGGE*

Oito dos isolados que cresceram em meio *TSA* com os diferentes antibióticos foram seleccionados, tendo em conta a comparação do seu perfil de *DGGE* com os perfis das amostras das quais foram isolados, para posterior sequenciação. As pesquisas de similaridade para as sequências do gene 16S *rRNA* dos isolados foram realizadas usando o programa de pesquisa NCBI BLAST ([41]) da base de dados GenBank, possibilitando a identificação dos membros da comunidade microbiana. No entanto, não foi possível a sequenciação de três dos isolados seleccionados, por não apresentarem pureza suficiente.

Na tabela 12, observa-se a identificação, família e número de acesso do organismo com maior similaridade, após análise BLAST efetuada na base de dados do NCBI (National Centre of Biotechnology Information).

Através dos perfis 16S-*DGGE* (Figura 10,11 e 12) foi possível verificar a presença ou ausência das bandas identificadas, nas amostras de efluente cultivável em meio *TSA* suplementado com os diferentes antibióticos ao longo do processo de tratamento da ETAR (Tabela 12).

Tabela 12. Resumo da afiliação das bandas de *DGGE* obtida a partir das respectivas sequências do gene 16S e a correspondência mais próxima do GenBank e presença no A., E.A.F e E.F.

Isolado/ Banda	Número de Acesso BLAST NCBI	Identificação	Família	Afluente (A.)	Efluente Antes da Desinfecção (E.A.F)	Efluente Final (E.F)
1	<u>EF560785</u> (97%)	1ª <i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<u>GENT</u> , <u>VAN</u> , <u>RIF</u> , AMP, CIP, CHF e TET	<u>VAN</u> , <u>RIF</u> , AMP e TET	<u>GENT</u> , <u>VAN</u> e <u>RIF</u>
2	<u>JQ997162</u> (98%) <u>JF701185</u> (98%)	1ª <i>Bacterium 'glyphosatp'</i> 2ª <i>Raoutella sp.</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<u>GENT</u> , <u>VAN</u> , <u>RIF</u> , <u>AMP</u> , CIP, CHF e <u>TET</u>	<u>VAN</u> , <u>RIF</u> , <u>AMP</u> e <u>TET</u>	<u>VAN</u> , <u>RIF</u> , <u>AMP</u> e <u>TET</u>
3	<u>HQ807503</u> (94%) <u>KJ477003</u> (94%)	1ª <i>Uncultured organism</i> 2ª <i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<u>GENT</u> , <u>VAN</u> , <u>RIF</u> , <u>AMP</u> , <u>CIP</u> , <u>CHF</u> e <u>TET</u>	<u>GENT</u> , <u>VAN</u> , <u>RIF</u> , <u>AMP</u> , <u>CIP</u> , <u>CHF</u> e <u>TET</u>	<u>VAN</u> , <u>RIF</u> , <u>AMP</u> , <u>CIP</u> , <u>CHF</u> e <u>TET</u>
4	<u>NR117686</u> (98%)	1ª <i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<u>GENT</u> , <u>VAN</u> , <u>RIF</u> , AMP, CIP, CHF e TET	<u>VAN</u> e <u>RIF</u>	<u>GENT</u> , <u>VAN</u> e <u>RIF</u>
5	<u>HM779408</u> (92%) <u>KJ806448</u> (92%)	1ª <i>Uncultured bacterium</i> 2ª <i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Aeromonabacteriaceae</i>	Não foi possível identificar a banda correspondente ao microrganismo (Figura 17)	Não foi possível identificar a banda correspondente ao microrganismo (Figura 17)	Não foi possível identificar a banda correspondente ao microrganismo (figura 17)

Todos os isolados identificados na tabela 12 apresentaram multirresistência aos antibióticos testados, pois tem a mesma banda nos perfis de vários antibióticos, e persistiram ao longo dos tratamentos da ETAR, com exceção das campanhas de amostragem 1,2 e 4 para os antibióticos Ciprofloxacina e Cloranfenicol.

O isolado correspondente à banda 1 apresentou 97 % de similaridade com a *Escherichia coli*, apresentando multirresistência com os antibióticos Gentamicina, Vancomicina e Rifampicina. O isolado correspondente à banda 2 apresentou 98 % de similaridade não só com a *Bacterium 'glyphosatp'* mas também com a *Raoutella* sp, revelando a presença de genes resistentes à Vancomicina, Rifampicina, Ampicilina e Tetraciclina. Relativamente ao isolado correspondente à banda 3 apresentou 94 % de similaridade com um organismo não cultivado e com a *E.coli*, apresentando multirresistência com a Vancomicina, Rifampicina, Ampicilina, Ciprofloxacina, Cloranfenicol e Tetraciclina. O isolado correspondente à banda 4 apresentou 98 % de similaridade com a *Klebsiella pneumoniae*, revelando a presença de genes resistentes aos agentes antimicrobianos Gentamicina, Vancomicina e Rifampicina. O isolado correspondente ao padrão de bandas identificado com o número 5 apresentou 92 % de similaridade com um organismo não cultivado e com a *Aeromonas hydrophila*. No entanto, não foi possível identificar qual a sua correspondência nos perfis de *DGGE* (figura 12).

Neste estudo, todos os microrganismos identificados pertencem ao mesmo filo, *Proteobacteria*, e quatro das cinco bactérias identificadas pertenceram à mesma família, *Enterobacteriaceae* (tabela 12), o que se verificou também em outros estudos. As *Proteobacterias* são dos grupos de bactérias mais reportadas nas ETAR, sendo que as bactérias da família *Enterobacteriaceae* estão relacionadas com organismos do intestino, resultados não surpreendentes atendendo à origem das amostras estudadas [46, 48, 51].

4.4. Sequênciação *Illumina*

Como não foi possível a identificação de vários microrganismos presentes nas amostras recolhidas, devido à pouca qualidade apresentada em algumas das sequências obtidas, enviou-se uma amostra de cada ponto de amostragem, nomeadamente a que apresentou maior

diversidade no perfil de DGGE, para o *Research and Testing Laboratory* para sequenciação através da técnica *Illumina Miseq* e análise dos resultados através do programa *Krona*.

Com os resultados obtidos (figura 13), foi possível ter uma noção de toda a comunidade bacteriana existente à entrada e saída da ETAR, e cultiváveis na presença dos diferentes antibióticos testados: Gentamicina, Vancomicina, Rifampicina, Ampicilina, Ciprofloxacina, Cloranfenicol e Tetraciclina.

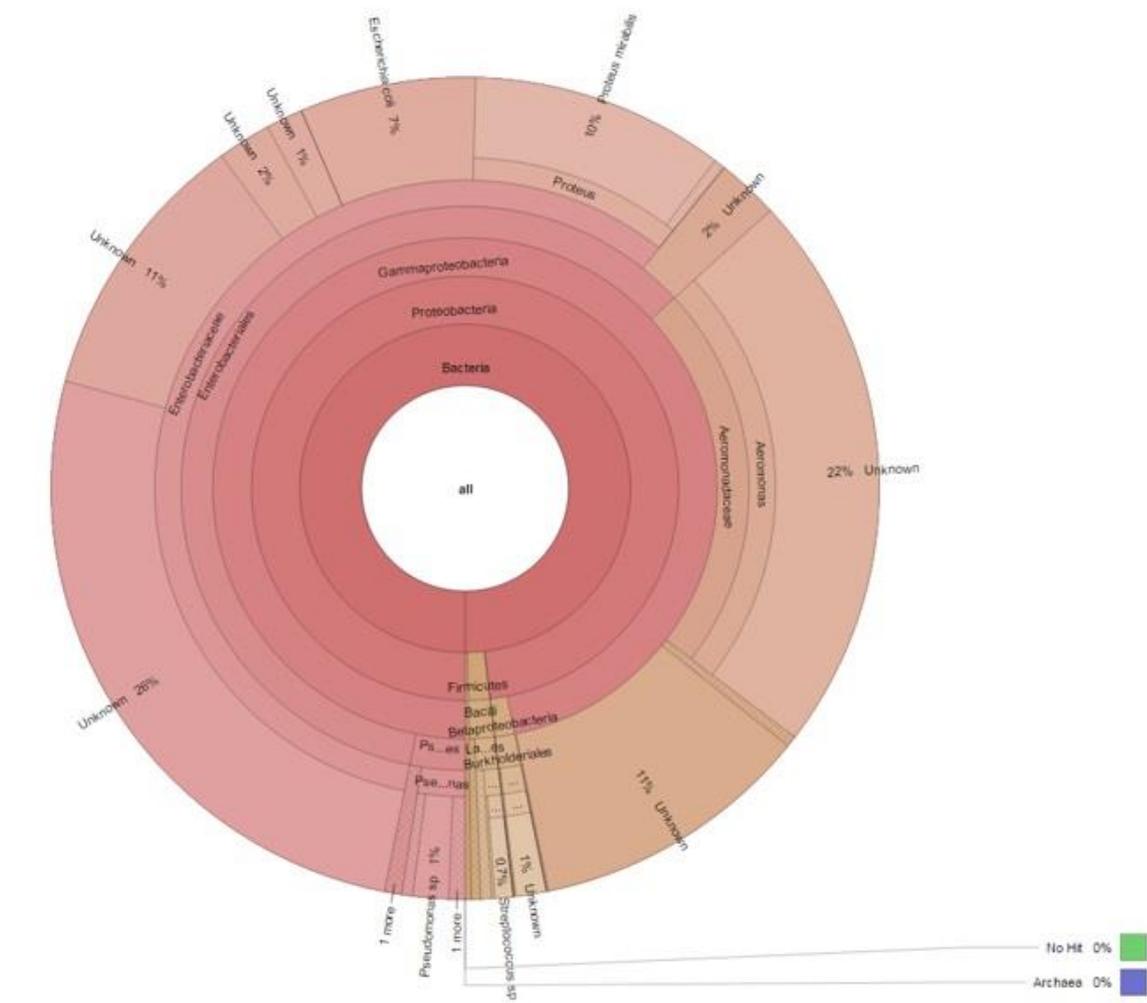


Figura 13. Diversidade taxonômica das sequências do gene 16S *rRNA* das bactérias cultiváveis presentes no afluente à ETAR.

Com base nos resultados obtidos relativos à comunidade bacteriana presente no afluente à ETAR (Figura 13), verificou-se uma maior presença de *Proteobacterias*, sugerindo uma presença de 10% de *Proteus mirabilis*, 7 % de *Escherichia coli*, 40 % de espécies não cultivadas pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, 22 % de uma espécie não cultivável de *Aeromonas*, 1 % de *Pseudomonas sp.* e 0,7 % de *Streptococcus sp.*

Relativamente à amostra do efluente à saída da ETAR (E.F) suplementado com o antibiótico Ciprofloxacina (Figura 14), verificou-se que 99 % das espécies presentes pertencem à família *Enterobacteriaceae*, sendo que 14 % pertence à espécie *Escherichia coli* e 85 % a duas espécies de bactérias não cultivadas. Estes resultados mostram a presença de genes resistentes à Ciprofloxacina, essencialmente em *Enterobacteriaceas*.

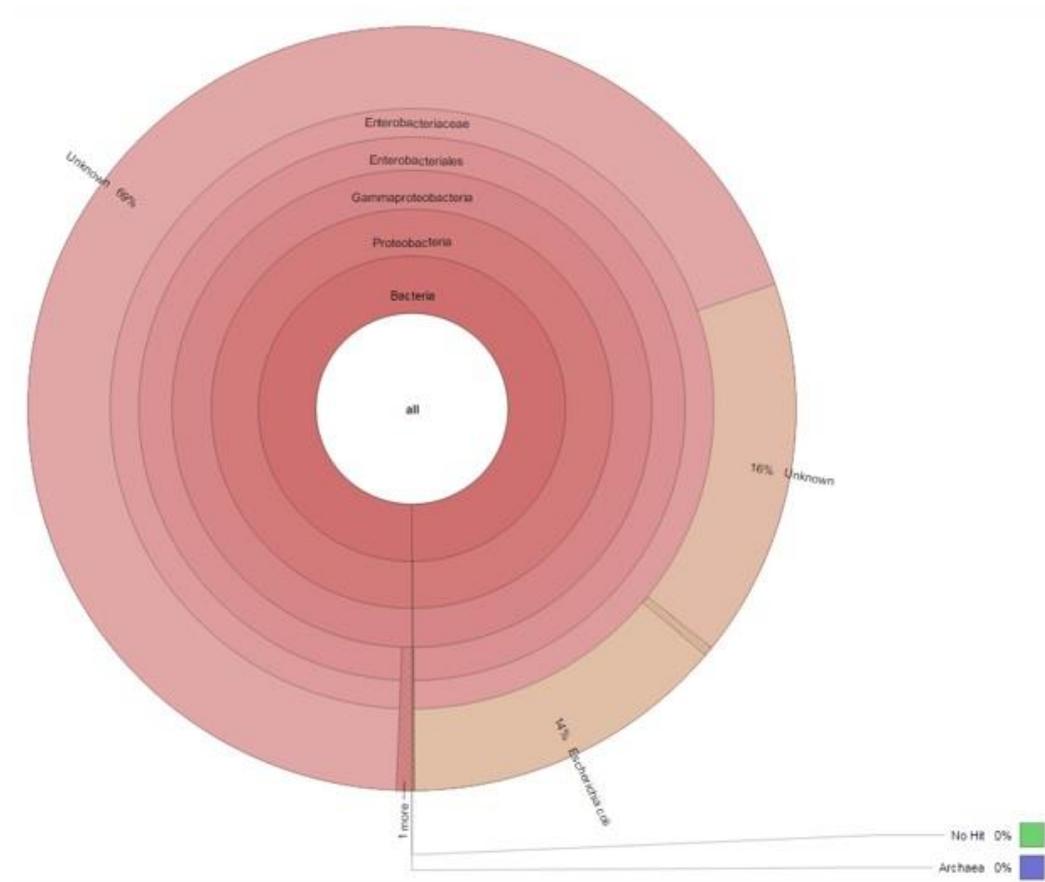


Figura 14. Diversidade taxonómica das sequências do gene 16S *rRNA* das bactérias cultiváveis presentes no efluente tratado suplementado com o antibiótico CIPROFLOXACINA (CIP).

Quanto à amostra suplementada com o antibiótico Cloranfenicol (Figura 15), observou-se que toda a comunidade bacteriana pertence à família das *Enterobacteriaceas*, sendo que 27 % pertence à espécie *E. coli* e 73 % com uma espécie não cultivada.

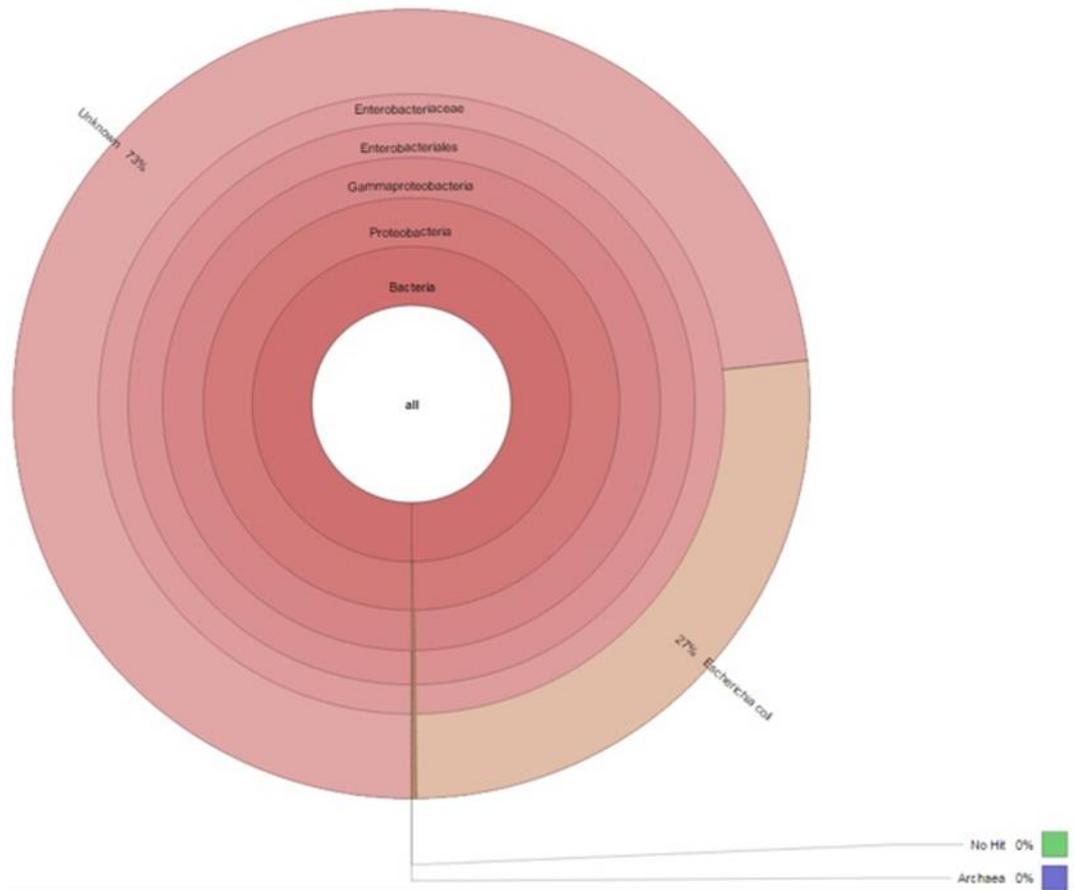


Figura 15. Diversidade taxonômica das sequências do gene 16S *rRNA* das bactérias cultiváveis presentes no efluente tratado suplementado com o antibiótico CLORANFENICOL (CHF).

Comparativamente à amostra suplementada com Gentamicina (Figura 16), verificou-se que 89 % de duas espécies não cultivadas pertencem à família *Enterobacteriaceae*, 3 % à espécie *E.coli* e 3 % a uma espécie não cultivada pertencente à família *Propionibacteriaceae*, sendo que para o antimicrobiano Rifampicina (Figura 17) verificou-se que 95 % da comunidade bacteriana pertencia a duas espécies não cultivadas da família *Enterobacteriaceae* e 3 % a uma espécie de *Aeromonas*.

Relativamente à amostra do efluente à saída da ETAR (E.F) suplementado com o antibiótico Tetraciclina (Figura 18), verificou-se que 99 % da comunidade bacteriana pertence ao género *Burkholderia*, sendo que para a amostra suplementada com o antibiótico Ampicilina (Figura 19) verificou-se que 88 % pertencia ao género *Pseudomonas*, 5 % a uma espécie de *Enterobacteriaceae*, 2 % ao género *Aeromonas* e 3 % a *Ralstonia sp.*

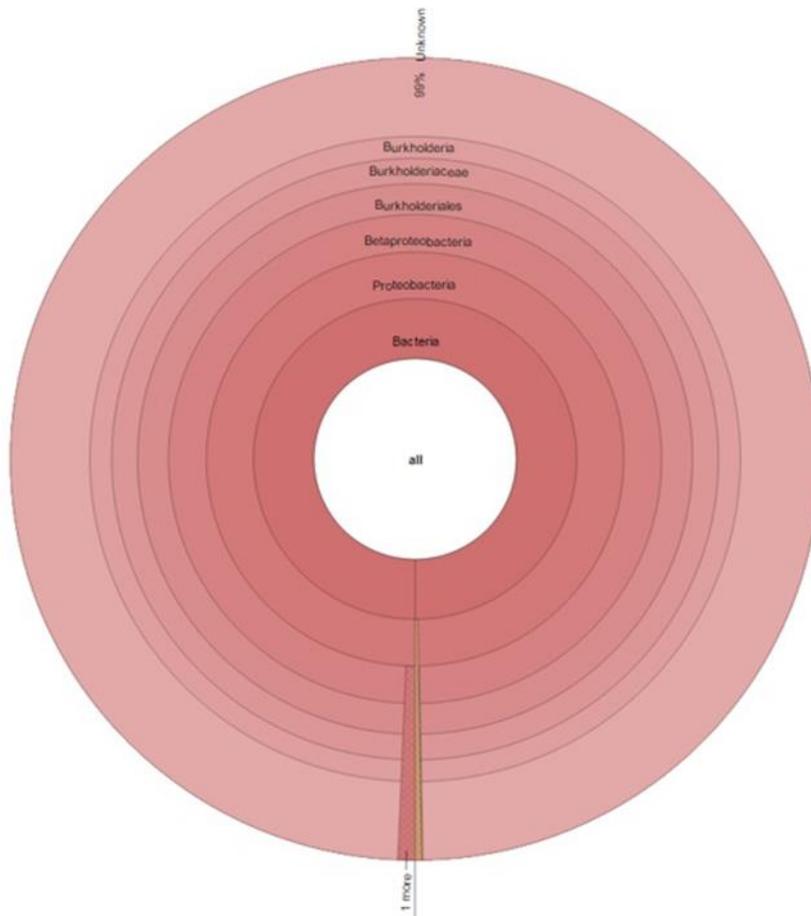


Figura 18. Diversidade taxonómica das sequências do gene 16S *rRNA* das bactérias cultiváveis presentes no efluente tratado suplementado com o antibiótico TETRACICLINA (TET).

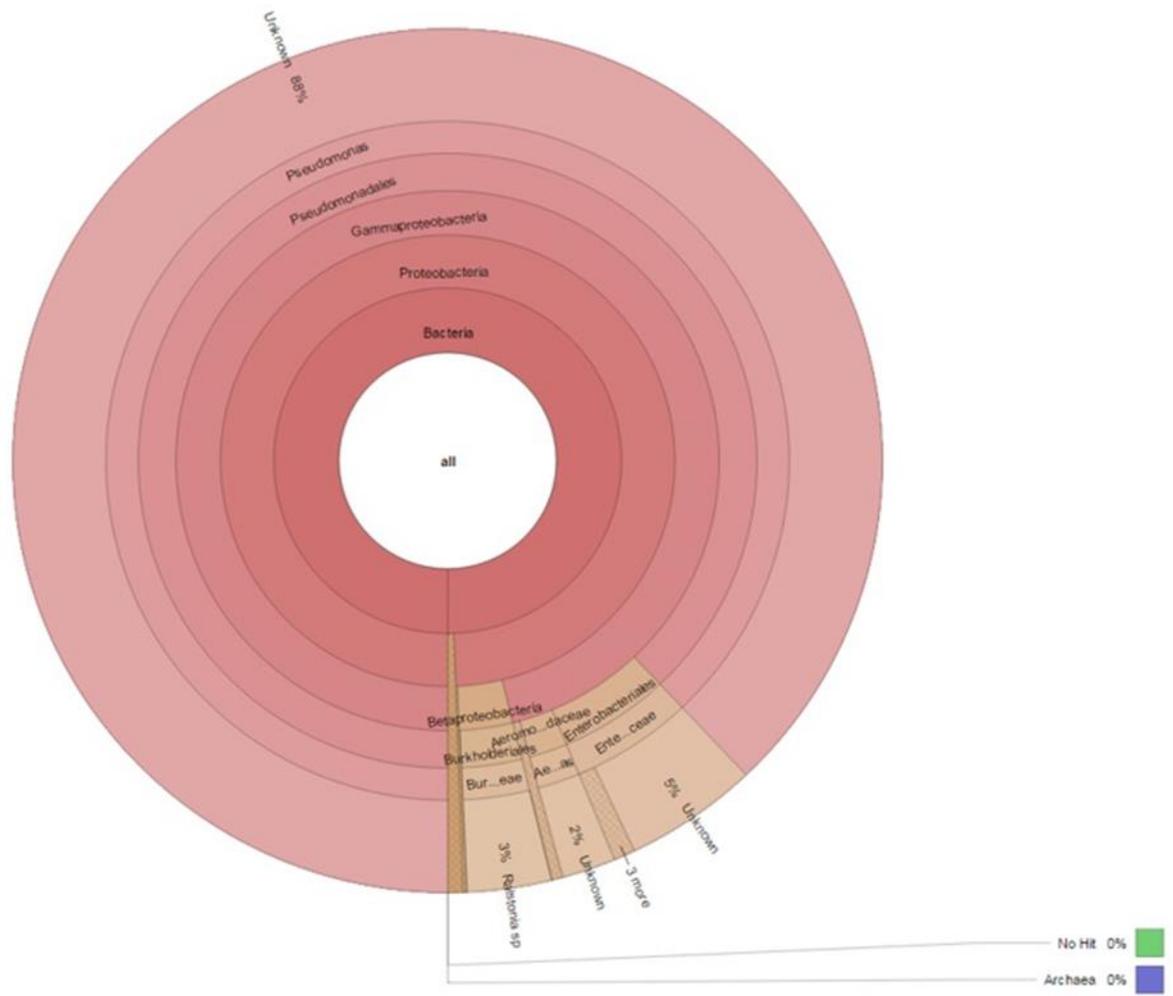


Figura 19. Diversidade taxonômica das sequências do gene 16S rRNA das bactérias cultiváveis presentes no efluente tratado suplementado com o antibiótico AMPICILINA (AMP).

Quanto à amostra suplementada com o antibiótico VAN (Figura 20), observou-se a presença de 52 % de *Pseudomonas*, 29 % de *Burkholderias*, 9 % de *Herbaspirillum*, 5% e 7 % de duas espécies de *Enterobacteriaceae* e 3 % de *Aeromonas*.

Capítulo 5

**CONCLUSÕES E
SUGESTÕES PARA
TRABALHOS FUTUROS**

A introdução de antibióticos no tratamento de doenças infecciosas foi um momento revolucionário na medicina humana. No entanto, a utilização de antimicrobianos origina pressões seletivas que favorecem a seleção de estirpes com fenótipo de resistência. Os mecanismos de transferência genética possibilitam a rápida disseminação de genes de resistência entre bactérias o que traduz num importante problema para a saúde pública. O meio ambiente é constantemente alvo de contaminação por efluentes constituídos por resíduos de antimicrobianos, estirpes bacterianas resistentes, bem como genes de resistência. É um importante reservatório de genes de resistência que podem ser captados por patógenos humanos e animais. Estes microrganismos podem causar infecção de água e alimentos contaminados.

No presente estudo foi avaliada a presença e a diversidade de integroes nas águas residuais afluentes à ETAR de Braga e no efluente tratado descarregado no meio hídrico. Nas campanhas de amostragens recolhidas verificou-se a presença de pelo menos uma classe de integroes, sendo que a classe de mais predominante foi a classe 1, seguida da classe 2 e por fim classe 3. O estudo revelou uma maior presença de integroes no afluente do que no efluente final. No entanto, a presença destes no efluente tratado (efluente final), deve-se, possivelmente a uma ineficácia dos processos atuais de tratamento das águas residuais na remoção de bactérias multirresistentes. Por isso, destaca a necessidade urgente de se implementar meios eficazes de desinfecção de efluentes para evitar a disseminação de bactérias com multirresistência.

Os resultados dos perfis bacterianos 16S-DGGE mostram que tanto o perfil bacteriano do afluente como o do efluente final se mantêm semelhantes em todas as amostras recolhidas. Também foi possível verificar a existência de bandas, muitas delas em comum, indicando a presença do mesmo tipo de microrganismo e intensidade de bandas, indicativo da predominância do microrganismo em questão. Verificou-se uma maior diversidade de bactérias no afluente, à entrada da ETAR, do que no efluente tratado e que certos microrganismos se mantêm ao longo dos processos de tratamento da ETAR, concluindo a presença de bactérias multirresistentes e a ineficácia dos tratamentos da ETAR na eliminação dessas bactérias, o que leva à sua dispersão no meio ambiente. Relativamente à importância do tratamento de desinfecção, verificou-se que não foi eficaz na eliminação de todos os microrganismos que estavam presentes antes de sofrerem este tratamento, comprometendo a qualidade do efluente que será encaminhado para o meio hídrico. Foi possível identificar alguns dos microrganismos com genes de resistência a determinados antibióticos, como a *Escherichia coli*, *Raoutella* sp.,

Klebsiella Pneumoniae e *Aeromonas hydrophila*, todos eles pertencentes ao filo *Proteobacteria* e à família *Enterobacteraceae*, com exceção de *Aeromonas hydrophila*. Numa forma geral, verificou-se uma menor presença de microrganismos na presença dos antibióticos Ciprofloxacina (CIP) e Cloranfenicol (CHF), e uma maior na presença da Vancomicina (VAN) e Rifampicina (RIF). Através de uma análise mais completa da comunidade bacteriana, através da técnica *Illumina Miseq*, foi possível confirmar a presença de genes resistentes a todos os antibióticos testados, principalmente a bactérias da família *Enterobacteraceae*. Verificou-se que a comunidade bacteriana presente na amostra de afluente era composta por: *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas* sp, *Streptococcus* sp, outras *Enterobacteriaceae*s, *Aeromonas* e outras *Aeromonadaceae*s. Quanto à comunidade bacteriana presente nas amostras analisadas de efluente final, era constituída por: *Escherichia coli*, *Aeromonas*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Ralstonia* sp e *Herbaspirillum*.

Com este trabalho, conclui-se a existência de bactérias patogénicas multirresistentes e que os processos utilizados no tratamento de efluentes em ETAR não estão a ser completamente eficazes na remoção dessas bactérias presentes nos efluentes finais que vão, posteriormente, ser descarregados em massas de água naturais.

Relativamente a sugestões futuras para a continuidade deste trabalho, julga-se importante a recolha de amostras em diferentes alturas do ano o que permitirá uma comparação sazonal dos resultados, aumentar o número de amostras recolhidas e testar outros agentes antimicrobianos, determinar alguns parâmetros físico-químicos como o pH, temperatura, entre outros e correlacionar com o desenvolvimento dos microrganismos. Pode ainda sugerir o mesmo estudo para outras ETAR, assim poder-se-ia comparar a capacidade de remoção de microrganismos de cada uma e a variação da comunidade bacteriana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] D. R. Jorge. Resistência aos Antimicrobianos. *Instituto Nacional de Saúde*. Available: <http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/AreasCientificas/DoencasInfecciosas/AreasTrabalho/ResistencAnti/Paginas/inicial.aspx>
- [2] DGS. (2013, PORTUGAL - Controlo da infeção e resistências aos antimicrobianos em números. *Programa de Prevenção e Controlo de Infeções e de Resistência aos Antimicrobianos*. Available: <http://www.dgs.pt/estatisticas-de-saude/estatisticas-de-saude/publicacoes/portugal-controlo-da-infecao-e-resistencia-aos-antimicrobianos-em-numeros-2013.aspx>
- [3] P. Martins da Costa, P. Vaz-Pires, and F. Bernardo, "Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. isolated in," *Elsevier*, pp. 1735 – 1740, 2006.
- [4] J. J. Huang, H. Y. Hu, S. Q. Lu, Y. Li, F. Tang, Y. Lu, *et al.*, "Monitoring and evaluation of antibiotic-resistant bacteria at a municipal wastewater," *Elsevier*, pp. 1-6, 2011.
- [5] F. H. M. George. (2013, 02 21). Vigilância Epidemiológica das Resistências aos Antimicrobianos *Norma da Direção-Geral da Saúde*. Available: <http://www.dgs.pt/upload/membro.id/ficheiros/i018609.pdf>
- [6] A. Martins, "Prevalência de resistência a antimicrobianos em isolados ambientais de *Escherichia coli* e enterococos," Instituto Politécnico do Porto, 2012.
- [7] T. M. Correia Martins, "Caracterização da virulência e dos perfis de resistência de populações microbianas patogénicas presentes no efluente final de ETAR," Universidade do Minho, 2012.
- [8] A. S. T. R. S. Moura, "Diversidade molecular e transferência de integrões," Universidade de Aveiro, 2011.
- [9] D. J. A. Dias, "Estudo dos Principais Mecanismos de Resistência aos Antibióticos β -lactâmicos em Bactérias Patogénicas de Gram negativo," Universidade Nova de Lisboa, 2009.
- [10] D. Oliveira Guimarães, L. da Silva Momesso, and M. Tallarico Pupo, "Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes," *Química Nova*, pp. 667-679, 2010.
- [11] D. R. Jorge. A resistência aos Antibióticos. *Instituto Nacional de Saúde*. Available: <http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/Paginas/AntibioticosResi.aspx#oqeanti>
- [12] B. A. Costa Coelho, "Estudo do Tratamento de águas residuais urbanas," Faculdade de Engenharia, Universidade do Porto, 2008.
- [13] L. L. C. Brunton, Bruce A.; Knollmann, Björn C., *As Bases farmacológicas da terapeutica Goodman & Gilman*, 2012.
- [14] E. C. B. Guilherme, "Caracterização dos mecanismos de resistência à ampicilina em estirpes clínicas de *Haemophilus influenzae* isoladas em Portugal entre o período de 2009 a 2012," Departamento de Biologia Animal, Universidade de Lisboa, 2013.
- [15] L. Wannmacher, "Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: Uma guerra perdida?," *Uso racional de medicamentos: temas seleccionados*, pp. 1-6, 2004.
- [16] A. P. Gaspar Mondego, "Pesquisa e caracterização de integrões em bactérias isoladas de ambientes naturais e hospitalares," Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, 2005.
- [17] ECDC. (2012, Surveillance of antimicrobial consumption in Europa 2012. 82. Available: <http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-consumption-europe-esac-net-2012.pdf>
- [18] DGS. (2013, Dia Europeu dos Antibióticos. *Informação para o Cidadão*. Available: <http://www.dgs.pt/em-destaque/dia-europeu-do-antibiotico-2013.aspx>
- [19] OMS. (2012, A crescente ameaça da resistência antimicrobiana. *Opções de Ação*. Available: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75389/3/OMS_IER_PSP_2012.2_por.pdf
- [20] E. R. P. F. Pedrosa, Joao Gabriel, *Enciclopédia da Saúde: Antibioticoterapia* vol. 4, 2001.
- [21] WHO. (2014, Antimicrobial Resistance. *Global Report on Surveillance*. Available: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf

- [22] T. Stalder, O. Barraud, M. Casellas, C. Dagot, and M. C. Ploy, "Integron involvement in environmental spread of antibiotic resistance," *Frontiers in Microbiology*, vol. 3, April 2012.
- [23] A. Moura, I. Henriques, R. Ribeiro, and A. Correia, "Prevalence and characterization of integrons from bacteria isolated from a slaughterhouse wastewater treatment plant," *J Antimicrob Chemother*, vol. 60, pp. 1243-50, Dec 2007.
- [24] A. Moura, C. Pereira, I. Henriques, and A. Correia, "Novel gene cassettes and integrons in antibiotic-resistant bacteria isolated from urban wastewaters," *Res Microbiol*, vol. 163, pp. 92-100, Feb 2012.
- [25] M. d. F. Martins Pereira, "Contributo para avaliar a possibilidade de reutilização das areias removidas nas ETAR," Departamento de Ciências e Engenharia do Ambiente, Universidade Nova de Lisboa, 2008.
- [26] M. H. Lima Santos, M. Pedras, P. Diegues, V. S. Noronha, V. Augusto, and N. Sanches, "Recomendações Genéricas para a Gestão das Águas Residuais Hospitalares," in *Cadernos da DGIES*, C. E. d. Dqies, Ed., ed, 2005.
- [27] F. J. Telo Rasquilha, "Contribuição para o tratamento e gestão das lamas em excesso das estações de tratamento de águas residuais-caso de estudo de optimização para 4 ETAR do concelho de Elvas," Departamento de Ciências e Engenharia do Ambiente, Universidade Nova de Lisboa, 2010.
- [28] J. Saldanha Matos. (2003) Aspectos Históricos e Actuais da Evolução da Drenagem de Águas Residuais em Meio Urbano. 12. Available: <http://www.civil.uminho.pt/cec/revista/num16/pag%2013-23.pdf>
- [29] C. Chernicharo, L. A. Daniel, M. Sens, and B. Coraucci Filho. Pós-Tratamento de Efluentes Anaeróbios por Sistemas de Desinfecção. Available: <http://www.finep.gov.br/prosab/livros/ProsabCarlos/Cap-7.pdf>
- [30] G. E. Murray, R. S. Tobin, B. Junkins, and D. J. Kushner, "Effect of Chlorination on Antibiotic Resistance Profiles of Sewage - Related Bacteria," *Environmental Microbiology*, vol. 48, pp. 73-77, 1984.
- [31] L. Rizzo, C. Manaia, C. Merlin, T. Schwartz, C. Dagot, M. C. Ploy, *et al.*, "Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: a review," *Sci Total Environ*, vol. 447, pp. 345-60, Mar 1 2013.
- [32] M. C. Meckes, "Effect of UV Light Disinfection on Antibiotic-Resistant Coliforms in Wastewater Effluents," *Environmental Microbiology*, vol. 43, pp. 371-377, 1982.
- [33] CLSI, "Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement," vol. 27, ed, 2007.
- [34] A. S. T. R. S. Moura. (2011, Diversidade molecular e transferência de integrons. Available: <https://ria.ua.pt/bitstream/10773/4268/1/5029.pdf>
- [35] M. C. Rosas Aboim, J. Costa Barbosa, H. L. Costa Coutinho, and A. Soares Rosado. (2004, Avaliação da Diversidade Microbiana em Amostras de Solos: Técnica do PCR/DGGE (Protocolo Laboratorial). Available: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/88960/1/doc-68-protocolo-laboratorial.pdf>
- [36] B. P. Verstraete, W., "The treatment of hospital wastewater: an appraisal," *Journal of water and health*, pp. 405-416, 2006.
- [37] E. B. Nübel U, Felske A, Snaird J, Wieshuber A, Amann RI, Ludwig W, Backhaus H, "Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* 29 detected by temperature gradient gel electrophoresis," *J Bacteriol*, pp. 178:5636-5643 1996.
- [38] G. Muyzer, Waal, E. and Uitterlinden, A., "Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA," *Appl. Environ. Microbiol*, pp. 59: 695-700, 1993.

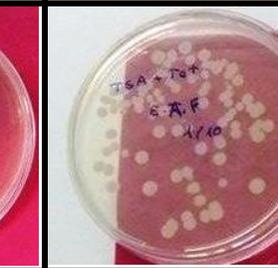
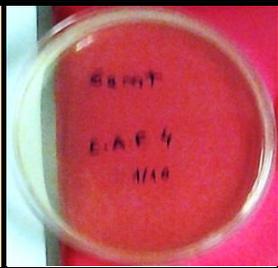
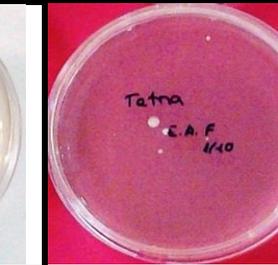
- [39] D. N. E. Sanguinetti CJ, Simpson AJ "Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels," *Biotechniques* vol. 17, pp. 914-921, 1994.
- [40] L. DJ, " 16S/23S rRNA sequencing. Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics," *Stackebrandt E & Goodfellow M, eds*, pp. 142-175, 1991.
- [41] N. Blast, "Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)," ed.
- [42] C. A. Kraft, M. C. Timbury, and D. J. Platt, "Distribution and genetic location of Tn7 in trimethoprim-resistant *Escherichia coli*," *J Med Microbiol.*, pp. 125-31, Sep 1986.
- [43] C. Goldstein, M. D. Lee, S. Sanchez, C. Hudson, B. Phillips, B. Register, *et al.*, "Incidence of class 1 and 2 integrases in clinical and commensal bacteria from livestock, companion animals, and exotics," *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 45, pp. 723-6, Mar 2001.
- [44] A. P. Mondego, "Pesquisa e caracterização de integrões em bactérias isoladas de ambientes naturais e hospitalares," Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, 2006.
- [45] T. Stalder, O. Barraud, M. Casellas, C. Dagot, and M. C. Ploy, "Integron involvement in environmental spread of antibiotic resistance," *Front Microbiol*, vol. 3, p. 119, 2012.
- [46] A. I. Figueiredo, "Influência de agentes antimicrobianos e ambientais nas comunidades bacterianas e nos níveis de resistência a antibióticos numa estação de tratamento de águas residuais," Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa, 2012.
- [47] C. S. Ferreira, "Comparação da microbiota vaginal entre mulheres Portuguesas saudáveis ou com vaginose bacteriana, através de tipagem molecular," Escola de Engenharia, Universidade do Minho, 2014.
- [48] A. Novo, S. Andre, P. Viana, O. C. Nunes, and C. M. Manaia, "Antibiotic resistance, antimicrobial residues and bacterial community composition in urban wastewater," *Water Res*, vol. 47, pp. 1875-87, Apr 1 2013.
- [49] E. Espigares, A. Bueno, M. Espigares, and R. Galvez, "Isolation of *Salmonella* serotypes in wastewater and effluent: Effect of treatment and potential risk," *Int J Hyg Environ Health*, vol. 209, pp. 103-7, Jan 2006.
- [50] L. Guardabassi, D. M.A., L. F. Wong, and A. Dalsgaard, "The effects of tertiary wastewater treatment on the prevalence of antimicrobial resistant bacteria," *Water Research*, vol. 36, pp. 1955-1964, 2002.
- [51] A. Moura, M. Tacao, I. Henriques, J. Dias, P. Ferreira, and A. Correia, "Characterization of bacterial diversity in two aerated lagoons of a wastewater treatment plant using PCR-DGGE analysis," *Microbiol Res*, vol. 164, pp. 560-9, 2009.
- [52] P. Martins da Costa, P. Vaz-Pires, and F. Bernardo, "Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. isolated in inflow, effluent and sludge from municipal sewage water treatment plants," *Water Res*, vol. 40, pp. 1735-40, May 2006.
- [53] F. F. Reinthaler, J. Posch, G. Feierl, G. Wüst, D. Haas, G. Ruckebauer, *et al.*, "Antibiotic resistance of *E. coli* in sewage and sludge," *Water Research*, vol. 37, pp. 1685-1690, 2003.

ANEXOS

ANEXO I - Placas de Crescimento – Afluente (A.)

Nº Amostra	GENTAMICINA	VANCOMICINA	RIFAMPICINA	AMPICILICNA	CIPROFLOXACINA	CLORANFENICOL	TETRACICLINA
1 (7/1/2014)							
2 (25/3/2014)							
3 (22/4/2014)							
4 (21/5/2014)							
5 (18/6/2014)							

ANEXO II - Placas de Crescimento – Efluente Antes do Tratamento de Desinfecção (E.A.F)

Nº Amostra	GENTAMICINA	VANCOMICINA	RIFAMPICINA	AMPICILICNA	CIPROFLOXACINA	CLORANFENICOL	TETRACICLINA
<p align="center">3 (22/4/2014)</p>							
<p align="center">4 (21/5/2014)</p>							
<p align="center">5 (18/6/2014)</p>							

ANEXO III - Placas de Crescimento – Efluente final(E.F)

Nº Amostra	GENTAMICINA	VANCOMICINA	RIFAMPICINA	AMPICILICNA	CIPROFLOXACINA	CLORANFENICOL	TETRACICLINA
1 (7/1/2014)							
2 (25/3/2014)							
3 (22/4/2014)							
4 (21/5/2014)							
5 (18/6/2014)							