

Mestrado Integrado em Bioengenharia

Crescimento, resistência a antibióticos e virulência de bactérias isoladas de sistemas de água potável - efeito da exposição a glifosato

Dissertação de Mestrado

de

Ana Francisca Agante Campos

Desenvolvida no âmbito da unidade curricular de Dissertação

realizada em

Águas do Douro e Paiva



Orientador na FEUP: Prof. Dr. Manuel Simões

Orientador nas Águas do Douro e Paiva: Dr.^a Carolina Tavares

Departamento de Engenharia Química

Setembro de 2021

Agradecimentos

A realização desta dissertação só foi possível graças à colaboração de várias pessoas, às quais quero deixar os meus mais sinceros agradecimentos.

Ao meu orientador da FEUP, Professor Manuel Simões, por me ter acompanhado não só durante o período de realização da minha dissertação, mas também ao longo dos três anos de especialização do curso, contribuindo para o crescimento do meu conhecimento científico, mostrando-se sempre disponível e prestável.

À minha orientadora da empresa, Carolina Tavares, pela imensa disponibilidade e colaboração e por me ter aberto as portas do Laboratório de Lever, permitindo a realização da minha dissertação adequada às necessidades da empresa, algo que desejava desde que descobri o meu interesse por esta área.

À Juliana Rodrigues, responsável técnica da Microbiologia nas Águas do Douro e Paiva, por toda a simpatia, confiança transmitida e incentivo constante no desenvolvimento do meu trabalho, contribuindo, sem dúvida, para que conseguisse chegar ao final desta etapa, orgulhosa do trabalho desenvolvido.

À empresa, Águas do Douro e Paiva, que me acolheu para a realização da minha dissertação e a todos os seus colaboradores que contribuíram de alguma forma para a realização do meu trabalho e que me fizeram sentir integrada no grupo do Laboratório.

A todos os investigadores do laboratório E007 da FEUP que me apoiaram, sempre que necessário, e a todos os que me acompanharam no E-101, por terem tornado os tempos no laboratório mais divertidos.

Às técnicas do laboratório E-103, Carla, Sílvia e Joana, por toda a paciência e por terem sempre uma palavra amiga e motivadora. Vocês são as maiores!

À Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, assim como a todos aqueles que fazem parte dela. Aos professores que acompanharam o meu percurso académico e que, de uma forma ou de outra, me orientaram a seguir este caminho com a vontade de fazer sempre o meu melhor, pela exigência constante.

Aos amigos que me acompanharam nesta jornada e que a tornaram mais fácil e mais especial. Por todas as sessões de estudo menos monótonas que me proporcionaram, por todos os cafezinhos nos intervalos das aulas onde reclamávamos da nossa vida académica, por todos os jantares de curso impecáveis, por todas as histórias fantásticas que vivi com cada um de vocês e muito mais. Foram momentos inesquecíveis e que levo comigo com o maior carinho.

Por fim, mas não menos importante, aos meus pais, irmão e restante família, por me terem tornado na pessoa que sou hoje. Pelos valores transmitidos, apoio, ensinamentos e motivação constante que me fizeram crescer, aprendendo a não desistir daquilo que realmente importa.

Resumo

A água potável é considerada um direito humano essencial, sendo fundamental assegurar a sua qualidade, nomeadamente a qualidade microbiológica. Mesmo após o tratamento da água, os microrganismos conseguem persistir nos sistemas de distribuição e formar biofilmes. Estas estruturas apresentam-se como reservatórios de microrganismos patogénicos, que constituem um perigo para a saúde humana, por expressarem fatores de virulência e por apresentarem frequentemente resistência a antibióticos. Estes microrganismos podem ser afetados pela exposição a contaminantes emergentes, os quais têm vindo a ser detetados frequentemente na água.

Com esta dissertação pretende-se compreender o comportamento de bactérias isoladas a partir da água (local de captação, água tratada e água armazenada), nomeadamente ao nível da virulência e resistência a antibióticos, bem como avaliar os efeitos da exposição a um contaminante emergente, o glifosato, nas características dos microrganismos. Para tal, procedeu-se à avaliação da capacidade de formação de biofilmes, em diferentes condições hidrodinâmicas (0 e 160 rpm). Avaliou-se também a mobilidade dos isolados (*swimming*, *swarming* e *twitching*) e a produção de proteases, gelatinases e sideróforos, recorrendo a meios sólidos específicos. Adicionalmente, a avaliação da suscetibilidade a antibióticos foi efetuada pelo método da difusão em disco, de acordo com as diretrizes do CLSI. A exposição ao glifosato foi realizada durante 3 dias, com uma concentração final de 70 mg/L.

Foram detetadas na água, através de uma caracterização bioquímica, bactérias pertencentes aos filos *Proteobacteria* (33%), *Bacteroidetes* (33%), *Firmicutes* (17%) e *Actinobacteria* (17%). Observou-se uma tendência crescente no tempo de duplicação, na capacidade de formação de biofilmes e na resistência a antibióticos das bactérias da água tratada, comparativamente com as bactérias da água natural. As bactérias da água natural, foram as que evidenciaram maior mobilidade (89% dos isolados evidenciou os três tipos de mobilidade estudados) e maior expressão de proteases, gelatinases e sideróforos. Ao nível da resistência a antibióticos, 56% dos antibióticos testados foram eficazes contra as bactérias Gram negativas. Em contrapartida, apenas 3 antibióticos (SXT, TE e C) foram eficazes contra todos os isolados de bactérias Gram positivas. Os restantes antibióticos apresentaram, no mínimo, 40% de isolados resistentes. Relativamente à exposição das bactérias ao glifosato, as respostas ao nível da virulência e da resistência a antibióticos foram variáveis. Destacando a suscetibilidade aos antibióticos, nuns casos verificou-se o aumento do diâmetro do halo de inibição do crescimento, noutros uma diminuição deste, havendo, ainda, casos em que se verificou uma manutenção da suscetibilidade/resistência ao antibiótico.

Palavras-Chave:

Biofilmes, Virulência, Resistência Antimicrobiana, Contaminantes Emergentes

Abstract

Drinking water is considered an essential human right, and it is essential to ensure its quality, namely the microbiological. Even after water treatment, microorganisms can persist in distribution systems and form biofilms. These structures present themselves as reservoirs of pathogenic microorganisms, which constitute a danger to human health, as they express virulence factors and are often resistant to antibiotics. These microorganisms can be affected by exposure to emerging contaminants, which have been frequently detected in water.

This dissertation firstly intends to understand the behavior of bacteria isolated from water (collection site, treated water and stored water), namely in terms of antibiotic resistance and virulence, and secondly to evaluate the effects from the exposure to an emerging contaminant, glyphosate, on the characteristics of microorganisms. To this end, the capacity to form biofilms was evaluated under different hydrodynamic conditions (0 and 160 rpm). The mobility of the isolates (swimming, swarming, and twitching) and the production of proteases, gelatinases and siderophores were also evaluated, using specific solid media. Additionally, the assessment of antibiotic susceptibility was performed using the disk diffusion method, in accordance with CLSI guidelines. Exposure to glyphosate was carried out for 3 days, with a final concentration of 70 mg/L.

Bacteria belonging to the phyla *Proteobacteria* (33%), *Bacteroidetes* (33%), *Firmicutes* (17%) and *Actinobacteria* (17%) were detected in the water through a biochemical characterization. An increasing trend in the doubling time, the biofilm-forming capacity and the antibiotic resistance of treated water bacteria compared to freshwater bacteria was observed. Bacteria from natural water showed greater mobility (89% of the isolates showed the three types of mobility studied) and greater expression of proteases, gelatinases and siderophores. In what concerns antibiotic resistance, 56% of the tested antibiotics were effective against Gram-negative bacteria. In contrast, only three antibiotics (SXT, TE and C) were effective against all Gram-positive isolates. The remaining antibiotics showed at least 40% of resistant isolates. Regarding the exposure of bacteria to glyphosate, responses in terms of virulence and antibiotic resistance were variable. Highlighting the susceptibility to antibiotics, in some cases there was an increase in the diameter of the growth inhibition halo, in others a decrease in it, and there were also cases in which there was a maintenance of antibiotic susceptibility/resistance.

Declaração

Declara, sob compromisso de honra, que este trabalho é original e que todas as contribuições não originais foram devidamente referenciadas com identificação da fonte.

Ana Francisca Campos

(Ana Francisca Agante Campos)

Porto, 15 de setembro de 2020

Índice

Notação e Glossário	xvii
1 Introdução.....	1
1.1 Enquadramento e Apresentação do Projeto	1
1.2 Apresentação da Empresa	1
1.3 Principais objetivos.....	2
1.4 Organização da Dissertação	2
2 Contexto e Estado da Arte	3
2.1 Importância da água potável e preocupações	3
2.2 Qualidade da água potável	4
2.2.1 Processo de tratamento da água potável.....	4
2.2.1.1 ETA de Lever	5
2.2.2 Água em Portugal	6
2.2.3 Surtos associados à água potável	7
2.3 Microbiologia nos sistemas de distribuição de água potável.....	8
2.3.1 Principais microrganismos	8
2.3.2 Principais problemas e causas.....	8
2.4 Virulência bacteriana	10
2.4.1 Biofilmes	11
2.4.2 Mobilidade	13
2.4.3 Proteases e Gelatinases	14
2.4.4 Sideróforos.....	15
2.5 Resistência a antibióticos	16
2.5.1 GRAs nos sistemas de distribuição de água	17
2.5.2 Classes de antibióticos e mecanismos de ação	18
2.6 Contaminantes emergentes	20
2.6.1 Principais contaminantes encontrados na água	20
2.6.2 Influência da exposição de bactérias aos contaminantes	21
2.7 Conceito “One Health”	22
3 Materiais e Métodos	23
3.1 Amostras (Origem, recolha, transporte e armazenamento)	23
3.2 Isolamento, caracterização e identificação das bactérias	23
3.2.1 Isolamento, purificação e conservação	23

3.2.2	Caraterização Morfológica e Bioquímica.....	24
3.2.2.1	Coloração de Gram.....	24
3.2.2.2	Identificação API.....	24
3.2.2.3	Testes da Catalase e da Oxidase	24
3.2.3	Identificação das estirpes isoladas - caraterização genotípica.....	25
3.3	Condições de cultura e preparação das bactérias	25
3.3.1	Curvas de crescimento em estado planctónico	25
3.4	Produção de fatores de virulência.....	26
3.4.1	Formação de biofilme	26
3.4.1.1	Quantificação da biomassa: coloração com CV	26
3.4.1.2	Enumeração de bactérias cultiváveis: contagem de UFC	26
3.4.2	Mobilidade	27
3.4.3	Produção de Sideróforos, Proteases e Gelatinases.....	27
3.5	Suscetibilidade a antibióticos.....	28
3.6	Exposição das bactérias a glifosato.....	29
3.7	Análise estatística.....	29
4	Resultados e Discussão.....	30
4.1	Caraterização dos microrganismos	30
4.1.1	Caraterização Morfológica	31
4.1.2	Caraterização Bioquímica.....	32
4.1.3	Caraterização Genotípica.....	34
4.2	Crescimento em estado planctónico	35
4.3	Produção de fatores de virulência.....	36
4.3.1	Capacidade de formação de biofilmes.....	36
4.3.2	Proteases, gelatinases e sideróforos	39
4.3.3	Mobilidade	41
4.4	Suscetibilidade a antibióticos.....	43
4.5	Efeitos da exposição ao herbicida glifosato.....	45
5	Conclusões	50
5.1	Principais conclusões.....	50
5.2	Contribuições para a empresa.....	52
5.3	Limitações e sugestões para trabalho futuro	53
	Referências	55

Anexo 1	Infraestruturas da AdDP	I
Anexo 2	Composição dos meios de cultura.....	III
2.1	R2A <i>broth</i>	III
2.2	Gelatinases	III
2.3	Sideróforos	IV
Anexo 3	Identificação dos Isolados	V
3.1	Caraterização morfológica e bioquímica	V
3.2	Escolha das galerias API.....	VII
3.3	Resultados obtidos <i>apiweb</i> TM	VIII
3.3.1	Isolados do Rio Douro.....	VIII
3.3.2	Isolados da ETA de Lever	X
3.3.3	Isolados do Reservatório de Pedrouços	XI
3.3.4	Isolados do Reservatório de Vila Nova	XII
Anexo 4	Curvas de crescimento.....	XIV
4.1	Cálculo da taxa específica de crescimento	XIV
4.2	Resultados obtidos.....	XIV
Anexo 5	Fatores de Virulência	XVI
5.1	Resultados: capacidade de formação de biofilmes	XVI
5.2	Resultados: mobilidade	XVII
Anexo 6	Suscetibilidade aos antibióticos	XIX
6.1	Classificação dos isolados: intervalos de referência	XIX
6.2	Diâmetros dos halos obtidos	XX
Anexo 7	Resultados da exposição a glifosato	XXIII
7.1	Produção de proteases, gelatinases e sideróforos.....	XXIII
7.2	Mobilidade.....	XXIV
7.3	Suscetibilidade aos antibióticos.....	XXV
Anexo 8	Ensaio de Coagregação.....	XXVI
8.1	Materiais e Métodos	XXVI
8.2	Resultados.....	XXVII
Anexo 9	Fotografias	XXVIII

Lista de Figuras

<i>Figura 1. Cobertura de água potável: a) progresso conseguido (2015-2020) e progresso necessário (2020-2030) a nível mundial; b) percentagem da população mundial com um serviço gerido com segurança. Adaptado de WHO and UNICEF (2021).</i>	4
<i>Figura 2. Distribuição da população, a nível mundial, com serviços de água geridos com segurança. Adaptado de WHO and UNICEF (2021).</i>	4
<i>Figura 3. Processo de tratamento na ETA de Lever. Baseado em Águas do Douro e Paiva (2017a).</i>	5
<i>Figura 4. Distribuição geográfica da percentagem de água segura, em Portugal. Retirado de Martins et al. (2020).</i>	6
<i>Figura 5. Causas associadas aos incumprimentos verificados na torneira do consumidor, em 2019. Retirado de Martins et al. (2020).</i>	6
<i>Figura 6. Número de surtos associados à água potável e número de casos de doença. Adaptado de Moreira & Bondelind (2017).</i>	7
<i>Figura 7. O processo de formação do biofilme envolve várias etapas: 1 - adesão reversível; 2- adesão irreversível; 3- proliferação e formação de microcolónias; 4 - maturação; e 5 - desprendimento/dispersão. Retirado de Sauer (2003).</i>	12
<i>Figura 8. Principais tipos de mobilidade: swimming, swarming, twitching, gliding and sliding. Retirado de Kearns (2010).</i>	13
<i>Figura 9. Mecanismos de resistência das bactérias aos antibióticos. Retirado de Abreu et al. (2012).</i>	16
<i>Figura 10. Crescimento das bactérias, em diferentes microambientes, nos sistemas de distribuição de água: sólidos suspensos, depósitos soltos ou biofilmes. Retirado de Sanganyado & Gwenzi (2019).</i>	18
<i>Figura 11. Mecanismos de transferência horizontal de genes entre as bactérias: transformação (cima), transdução (centro) ou conjugação (baixo). Retirado de Furuya & Lowy (2006).</i>	18
<i>Figura 12. Fontes de libertação de CEs para o meio ambiente. Retirado de Alderton et al. (2021).</i>	20
<i>Figura 13. Representação do conceito de “One Health”, na Suécia. Retirado de Lerner & Berg (2015).</i>	22
<i>Figura 14. Identificação com recurso a galerias API: classificação das identificações obtidas. Grupo A - identificação “Muito Boa” ou “Excelente”; Grupo B - identificação “Aceitável” ou “Boa”; Grupo C - identificação “Incorreta”; e Grupo D - perfil “Duvidoso” ou com “Fracá Discriminação”.</i>	32
<i>Figura 15. Curvas de crescimento obtidas pela representação da DO (610 nm) vs tempo (min) para os isolados do Rio Douro (a), da ETA de Lever (b), do Reservatório de Pedrouços (c) e do Reservatório de Vila Nova (c).</i>	35
<i>Figura 16. Classificação de Stepanović et al. (2000) dos isolados quanto à capacidade de formação de biofilmes, sem agitação (a) ou com agitação de 160 rpm (b). Número de isolados não produtores (0),</i>	

<i>fracamente produtores (+), moderadamente produtores (++) ou fortemente produtores (+++) de biofilme.</i>	<i>36</i>
<i>Figura 17. Percentagem, por antibiótico, de isolados Gram negativos (a) e Gram positivos (b) classificados como resistentes.</i>	<i>44</i>
<i>Figura 18. Curvas de crescimento obtidas pela representação da DO (610 nm) vs tempo (min) para os isolados do Rio Douro e da ETA de Lever (a), do Reservatório de Pedrouços (b) e do Reservatório de Vila Nova (c), para as células expostas ao glifosato e para as células do controlo.</i>	<i>46</i>
<i>Figura A1. 1. Mapa de Infraestruturas da empresa Águas do Douro e Paiva. Adaptado de Águas do Douro e Paiva (2017c).</i>	<i>I</i>
<i>Figura A1. 2. Representação do abastecimento dos reservatórios.</i>	<i>II</i>
<i>Figura A3. 1. Fluxogramas para seleção da galeria API mais indicada para os bacilos Gram negativos (a) e para os cocos Gram positivos (b).</i>	<i>VII</i>
<i>Figura A9. 1. Exemplos de morfologias de colónias obtidas.</i>	<i>XXVIII</i>
<i>Figura A9. 2. Exemplo de halo de mobilidade (mobilidade do tipo swarming).</i>	<i>XXVIII</i>
<i>Figura A9. 3. Exemplos de um resultado positivo (a) e de um resultado negativo (b) para a produção de gelatinases.</i>	<i>XXIX</i>
<i>Figura A9. 4. Exemplos de um resultado positivo (a) e de um resultado negativo (b) para a produção de proteases.</i>	<i>XXIX</i>
<i>Figura A9. 5. Exemplos de um resultado negativo (a) e de resultados positivos para a produção de sideróforos do tipo hidroxamatos (b) e do tipo catecóis (c).</i>	<i>XXX</i>
<i>Figura A9. 6. Exemplos de galerias API 20 E, após incubação.</i>	<i>XXX</i>
<i>Figura A9. 7. Exemplos de galerias API 20 NE, após incubação.</i>	<i>XXXI</i>
<i>Figura A9. 8. Exemplos de galerias API Staph, após incubação.</i>	<i>XXXI</i>
<i>Figura A9. 9. Exemplos de galerias API 20 Strep, após incubação.</i>	<i>XXXI</i>

Lista de Tabelas

<i>Tabela 1. Classes de antibióticos e alguns exemplos.</i>	<i>19</i>
<i>Tabela 2. Lista de antibióticos testados e respetivo conteúdo dos discos.</i>	<i>28</i>
<i>Tabela 3. Resultados das caracterizações genotípicas e bioquímicas.</i>	<i>34</i>
<i>Tabela 4. Tempos de duplicação, em horas, obtidos para os isolados das diferentes fontes de água. .</i>	<i>35</i>
<i>Tabela 5. Isolados classificados como moderadamente ou fortemente produtores de biofilme, de acordo com a classificação de Stepanović et al. (2000).</i>	<i>37</i>
<i>Tabela 6. Valores médios, por local e tipo de amostragem, da quantificação da biomassa e da culturabilidade dos biofilmes formados.</i>	<i>37</i>
<i>Tabela 7. Produção de proteases, gelatinases e sideróforos pelos isolados dos reservatórios.....</i>	<i>39</i>
<i>Tabela 8. Produção de proteases, gelatinases e sideróforos pelos isolados do Rio Douro e da ETA de Lever.....</i>	<i>40</i>
<i>Tabela 9. Mobilidade dos isolados do Rio Douro e da ETA de Lever.....</i>	<i>41</i>
<i>Tabela 10. Mobilidade dos isolados dos reservatórios.....</i>	<i>41</i>
<i>Tabela 11. Efeitos da exposição ao glifosato nos tempos de duplicação e na quantidade de biomassa e culturabilidade dos biofilmes.</i>	<i>46</i>
<i>Tabela 12. Antibióticos e isolados para os quais se verificam alterações significativas nos diâmetros dos halos após exposição ao glifosato.</i>	<i>48</i>
<i>Tabela A2. 1. Composição do meio de cultura R2A broth: compostos e respetivas quantidades.</i>	<i>III</i>
<i>Tabela A2. 2. Composição do meio de cultura gelatin agar.</i>	<i>III</i>
<i>Tabela A2. 3. Composição da solução de ferro III.</i>	<i>IV</i>
<i>Tabela A2. 4. Composição da solução de HDTMA.</i>	<i>IV</i>
<i>Tabela A2. 5. Composição da solução de CAS-Fe.....</i>	<i>IV</i>
<i>Tabela A3. 1. Resumo das características morfológicas e bioquímicas dos isolados estudados.</i>	<i>V</i>
<i>Tabela A3. 2. Resultados devolvidos pela ferramenta apiweb para os isolados do Rio Douro.</i>	<i>VIII</i>
<i>Tabela A3. 3. Resultados devolvidos pela ferramenta apiweb para os isolados da ETA de Lever.</i>	<i>X</i>
<i>Tabela A3. 4. Resultados devolvidos pela ferramenta apiweb para os isolados do Reservatório de Pedrouços.</i>	<i>XI</i>
<i>Tabela A3. 5. Resultados devolvidos pela ferramenta apiweb para os isolados do Reservatório de Vila Nova.....</i>	<i>XII</i>
<i>Tabela A4. 1. Resultados obtidos para a taxa específica de crescimento e para o tempo de duplicação dos isolados do Rio Douro e da ETA de Lever.</i>	<i>XIV</i>

<i>Tabela A4. 2. Resultados obtidos para a taxa específica de crescimento e para o tempo de duplicação dos isolados dos reservatórios.</i>	<i>XV</i>
<i>Tabela A5. 1. Quantidade de biomassa e culturabilidade dos biofilmes formados para 0 e 160 rpm. .</i>	<i>XVI</i>
<i>Tabela A5. 2. Valores dos diâmetros dos halos de mobilidade para os isolados do Rio Douro e da ETA de Lever.</i>	<i>XVII</i>
<i>Tabela A5. 3. Valores dos diâmetros dos halos de mobilidade para os isolados dos reservatórios. ...</i>	<i>XVIII</i>
<i>Tabela A6. 1. Exemplo da seleção dos intervalos de referência para classificação dos isolados quanto à suscetibilidade a antibióticos.</i>	<i>XIX</i>
<i>Tabela A6. 2. Intervalos de referência considerados para a classificação dos isolados Gram negativos como suscetíveis (S), com resistência intermédia (I) ou como resistentes (R).</i>	<i>XIX</i>
<i>Tabela A6. 3. Intervalos de referência considerados para a classificação dos isolados Gram positivos como suscetíveis (S), com resistência intermédia (I) ou como resistentes (R).</i>	<i>XX</i>
<i>Tabela A6. 4. Valores dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento para os isolados do Rio Douro.</i>	<i>XX</i>
<i>Tabela A6. 5. Valores dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento para os isolados da ETA de Lever.</i>	<i>XXI</i>
<i>Tabela A6. 6. Valores dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento para os isolados do Reservatório de Pedrouços.</i>	<i>XXI</i>
<i>Tabela A6. 7. Valores dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento para os isolados do Reservatório de Vila Nova.</i>	<i>XXII</i>
<i>Tabela A7. 1. Efeitos da exposição ao glifosato na produção de proteases, gelatinases e sideróforos.</i>	<i>XXIII</i>
<i>Tabela A7. 2. Efeitos da exposição ao glifosato nos diâmetros dos halos de mobilidade.</i>	<i>XXIV</i>
<i>Tabela A7. 3. Efeitos da exposição ao glifosato nos diâmetros dos halos de inibição do crescimento para os antibióticos testados.</i>	<i>XXV</i>
<i>Tabela A8. 1. Resultados obtidos para os ensaios de coagregação efetuados com os isolados do Rio Douro.</i>	<i>XXVII</i>
<i>Tabela A8. 2. Resultados obtidos para os ensaios de coagregação efetuados com os isolados da ETA de Lever.</i>	<i>XXVII</i>

Notação e Glossário

t_d tempo de duplicação

h

Letras gregas

μ Taxa específica de crescimento celular

(s)⁻¹

Lista de Siglas

AdDP	Águas do Douro e Paiva	ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
ag.	Água	LNZ	Linezolida
AK	Amicacina	MH	<i>Mueller-Hinton</i>
AZM	Azitromicina	MN	Minociclina
BRA	Bactéria Resistente a Antibióticos	MRP	Meropenem
bio.	Biofilme	OMS	Organização Mundial de Saúde
C	Cloranfenicol	P	Penicilina
CAS	<i>Chrome Azurol S</i>	QDA	Quinupristina-dalfopristina
CAZ	Ceftazidima	PCA	<i>Plate Count Agar</i>
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>	QS	<i>Quorum-Sensing</i>
CE	Contaminante Emergente	RD	Rifampicina
CIN	Cinoxacina	RP	Reservatório de Pedrouços
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>	RVN	Reservatório de Vila Nova
CN	Gentamicina	SPE	Substância Polimérica Extracelular
CPT	Ceftarolina	SXT	Trimetoprim-sulfametoxazol
CV	Cristal Violeta	TC	Ticarcilina
DO	Densidade Ótica	TE	Tetraciclina
E	Eritromicina	TEC	Teicoplanina
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i>	TTC	Ticarcilina-ácido clavulânico
ETA	Estação de Tratamento de Água	TZP	Piperacilina-tazobactam
F	Nitrofurantoína	UFC	Unidades Formadoras de Colônias
FV	Fator de Virulência	UNICEF	<i>United Nations International Children's Emergency Fund</i>
GAT	Gatifloxacina	VA	Vancomicina
GRA	Gene de Resistência a Antibióticos	WHO	<i>World Health Organization</i>

1 Introdução

1.1 Enquadramento e Apresentação do Projeto

O acesso a uma água segura é importante para a saúde pública, sendo considerada uma necessidade humana fundamental (WHO, 2019a). É, portanto, de extrema importância o controlo do crescimento microbiano nos sistemas de distribuição de água, alcançado, muitas vezes, pela adição de desinfetantes (Berry et al., 2006). No entanto, sabe-se que, mesmo na presença de um desinfetante, os microrganismos conseguem sobreviver e formar biofilmes. Estes são muito comuns nos sistemas de distribuição e podem constituir uma forma de proteção contra condições ambientais extremas. Assim, a formação de biofilmes suscita uma grande preocupação ao nível da água potável, pelo seu papel como reservatórios de microrganismos patogénicos (September et al., 2007; Wingender & Flemming, 2011).

Os microrganismos patogénicos, por expressarem fatores de virulência (FV) são capazes de colonizar e invadir o hospedeiro, danificando os tecidos ou combatendo as respostas imunes, o que leva ao desenvolvimento de doenças no ser humano (Beceiro et al., 2013). Para além dos FV que podem expressar, há uma preocupação crescente com o aumento da resistência a agentes antimicrobianos, que pode limitar as opções terapêuticas em caso de infeção com uma bactéria deste tipo, dificultando ou até mesmo impossibilitando o tratamento (CDC, 2020b). Recentemente, tem-se verificado um aumento na deteção de contaminantes emergentes (CEs), como produtos farmacêuticos, produtos de higiene pessoal e herbicidas, nas águas naturais que podem ter impacto nos microrganismos presentes nestes ambientes (EPA, 2008; Gomes et al., 2020).

1.2 Apresentação da Empresa

Águas do Douro e Paiva (AdDP) é uma empresa que pertence ao grupo Águas de Portugal, responsável pela construção, gestão e concessão do sistema multimunicipal de abastecimento do sul do Grande Porto, em regime de exclusividade, por um prazo de 20 anos (Águas do Douro e Paiva, 2017d). A empresa rege-se pelos seguintes princípios: satisfação do cliente, motivação dos colaboradores, eficiência dos processos, melhoria contínua e inovação, bem como transparência e comunicação (Águas do Douro e Paiva, 2017e).

A água é captada e tratada, seguindo-se o abastecimento para consumo público a 1,7 milhões de habitantes residentes em 20 municípios, abrangendo uma área de 2.715 km²: Amarante, Arouca, Baião, Castelo de Paiva, Cinfães, Espinho, Felgueiras, Gondomar, Lousada, Maia, Matosinhos, Oliveira de Azeméis, Ovar, Paços de Ferreira, Paredes, Porto, Santa Maria da Feira, São João da Madeira, Valongo e Vila Nova de Gaia. Um conjunto de cinco estações de tratamento de água (Ferro, Ferreira, Pousada, Castelo de Paiva e Lever) e um laboratório,

localizado em Lever, garantem o fornecimento de água segura a todos os municípios (Águas do Douro e Paiva, 2017d, 2017c).

A ETA de Lever é responsável pelo tratamento de água para cerca de 85% da população abrangida por todo o sistema da AdDP (Águas do Douro e Paiva, 2017a). O laboratório, responsável pelo controlo de qualidade da água, encontra-se localizado na maior infraestrutura da empresa, a ETA de Lever. Este laboratório controla e assegura não só a qualidade da água para consumo humano, fornecida pela empresa, como também as águas naturais (subterrânea e superficial) e a água das diferentes etapas do processo das várias ETAs das AdDP (Águas do Douro e Paiva, 2017b).

1.3 Principais objetivos

O objetivo principal do presente trabalho foi compreender o comportamento de bactérias isoladas da água, desde a captação até ao armazenamento. Para tal, pretendia-se compreender a variabilidade de bactérias que surgem nas diferentes fontes de água (água natural, água tratada e água armazenada), bem como as características a elas associadas. Assim, pretendia-se avaliar a resistência a antibióticos e a virulência de bactérias isoladas a partir da água de diversas fontes e a partir de biofilmes presentes nas paredes dos reservatórios. Pretendia-se ainda estudar a influência das condições hidrodinâmicas (estagnação e agitação elevada) na capacidade de formação de biofilmes por parte das bactérias isoladas.

Um outro objetivo do trabalho foi a avaliação dos efeitos nos microrganismos, ao nível da virulência bacteriana e da resistência a antibióticos, da exposição a um contaminante emergente: o glifosato.

1.4 Organização da Dissertação

Este trabalho encontra-se dividido em cinco capítulos. No **Capítulo 1 - Introdução**, são apresentados o projeto desenvolvido e a empresa parceira, bem como os principais objetivos do trabalho. No **Capítulo 2 - Contexto e Estado de Arte**, está presente uma breve contextualização e revisão da literatura, focadas essencialmente na importância da água e qualidade da mesma, nos problemas frequentemente associados aos sistemas de distribuição de água potável e, ainda, na crescente preocupação com os contaminantes emergentes. No **Capítulo 3 - Materiais e Métodos**, são descritas as metodologias aplicadas neste trabalho. No **Capítulo 4 - Resultados e Discussão**, são apresentados os resultados obtidos e a discussão dos mesmos, analisando-os e comparando-os com outros estudos existentes na literatura. No **Capítulo 5 - Conclusões**, são apresentadas as principais conclusões, bem como as limitações associadas a este trabalho e, ainda, sugestões para trabalho futuro.

2 Contexto e Estado da Arte

2.1 Importância da água potável e preocupações

A água potável é um direito humano e é essencial para a vida e saúde humanas, para o desenvolvimento económico e para a segurança alimentar (Benneyworth et al., 2016; UN-Water, 2021). A água é fundamental para satisfazer as necessidades diárias, tais como, a hidratação, a higiene pessoal, cozinhar, entre outras (Martínez-Santos, 2017). Uma água limpa e segura é um recurso indispensável, tornando-se cada vez mais escasso devido ao crescimento da população mundial, havendo um maior consumo e uma maior poluição deste bem essencial (Novak Babič et al., 2020). De acordo com as Diretrizes da Organização Mundial de Saúde (OMS) água potável segura é aquela que não representa nenhum risco significativo para a saúde durante uma vida inteira de consumo, independentemente da fase de vida em que a pessoa se encontra (bebé, criança, adulto ou idoso) e/ou fragilidades de cada ser humano (isto é, se a pessoa está ou não debilitada) (WHO, 2017a). Em termos práticos, uma água segura deve estar isenta de microrganismos perigosos e de outras substâncias tóxicas que constituam um risco potencial para a saúde humana (Martínez-Santos, 2017; Official Journal of the European Communities, 1998).

Um dos grandes objetivos globais no que concerne à água potável é o alcance de um fornecimento de água gerido com segurança a toda a população mundial, até 2030 (WHO and UNICEF, 2017). De acordo com o relatório do progresso de água potável, saneamento e higiene nos domicílios (WHO and UNICEF, 2021), entre 2015 e 2020, houve um aumento na proporção de população global com acesso a um serviço de água potável seguro, de 70% para 74%, no entanto, a este ritmo, não será possível atingir o objetivo estabelecido para 2030, sendo necessário quadruplicar as taxas de progresso atuais (Figura 1-a)). Em 2020, 2 biliões de pessoas (1 em cada 4) ainda careciam de um serviço de água potável gerido com segurança (Figura 1-b)). Ainda no mesmo relatório, é constatado que, das pessoas que não tinham sequer acesso a serviços básicos, 8 em 10 vivem em áreas rurais, principalmente em países menos desenvolvidos (Figura 2).

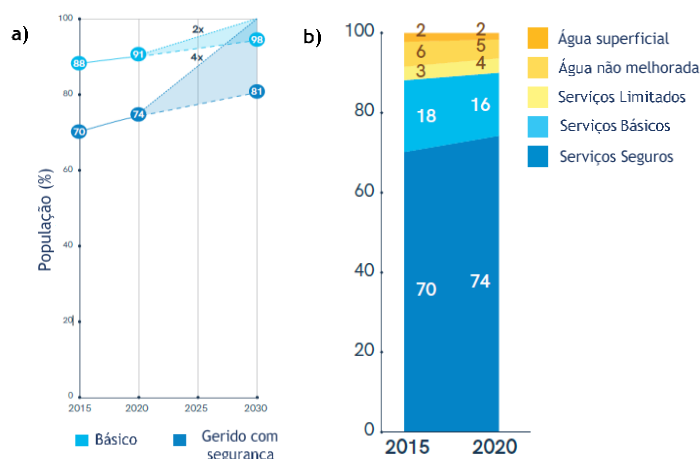


Figura 1. Cobertura de água potável: a) progresso conseguido (2015-2020) e progresso necessário (2020-2030) a nível mundial; b) percentagem da população mundial com um serviço gerido com segurança. Adaptado de WHO and UNICEF (2021).

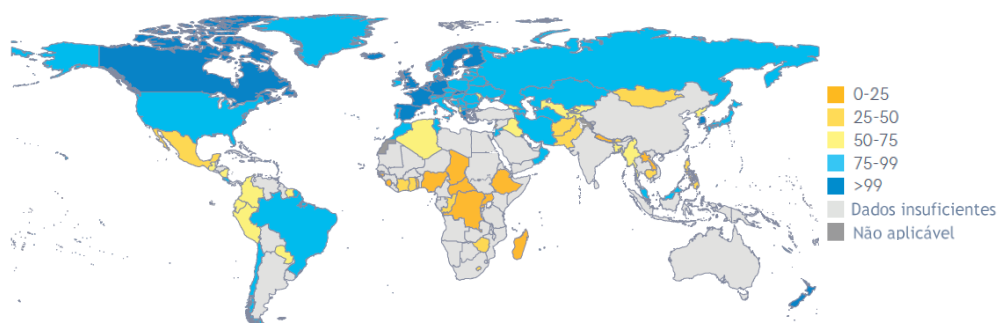


Figura 2. Distribuição da população, a nível mundial, com serviços de água geridos com segurança. Adaptado de WHO and UNICEF (2021).

2.2 Qualidade da água potável

De forma a fornecer água potável à população, os sistemas públicos responsáveis recorrem a vários métodos de tratamento da água, uma vez que as fontes utilizadas estão sujeitas a contaminação e é necessário remover os agentes que possam ser causadores de doenças (CDC, 2015). Assim, as estações de tratamento de água funcionam com o objetivo de garantir a qualidade da água potável, tendo em conta diversos parâmetros presentes nas diretrizes nacionais e/ou internacionais, principalmente os parâmetros microbiológicos e químicos, relevantes para a saúde (Hoeger et al., 2005).

2.2.1 Processo de tratamento da água potável

Tipicamente, no tratamento convencional de água potável recorre-se a processos físico-químicos que visem a redução e/ou eliminação de microrganismos, principalmente os patogénicos, a redução da turbidez, remoção dos nutrientes e o controlo das propriedades

organolépticas da água (Benner et al., 2013). Os processos mais comuns no tratamento da água incluem filtração, coagulação/floculação e desinfecção, no entanto, cada estação de tratamento de água (ETA) deve adaptar os seus processos de forma a satisfazer vários objetivos dos quais se destacam: eliminação dos contaminantes que surgem na água bruta captada, tratamento de resíduos e minimização dos custos associados (Abu Hasan et al., 2020; Boccelli et al., 2007; Piri et al., 2010).

2.2.1.1 ETA de Lever

A ETA de Lever possui no processo de tratamento meios tecnológicos sofisticados, atingindo produções de cerca de 400 mil m³ de água por dia (Águas do Douro e Paiva, 2017a).

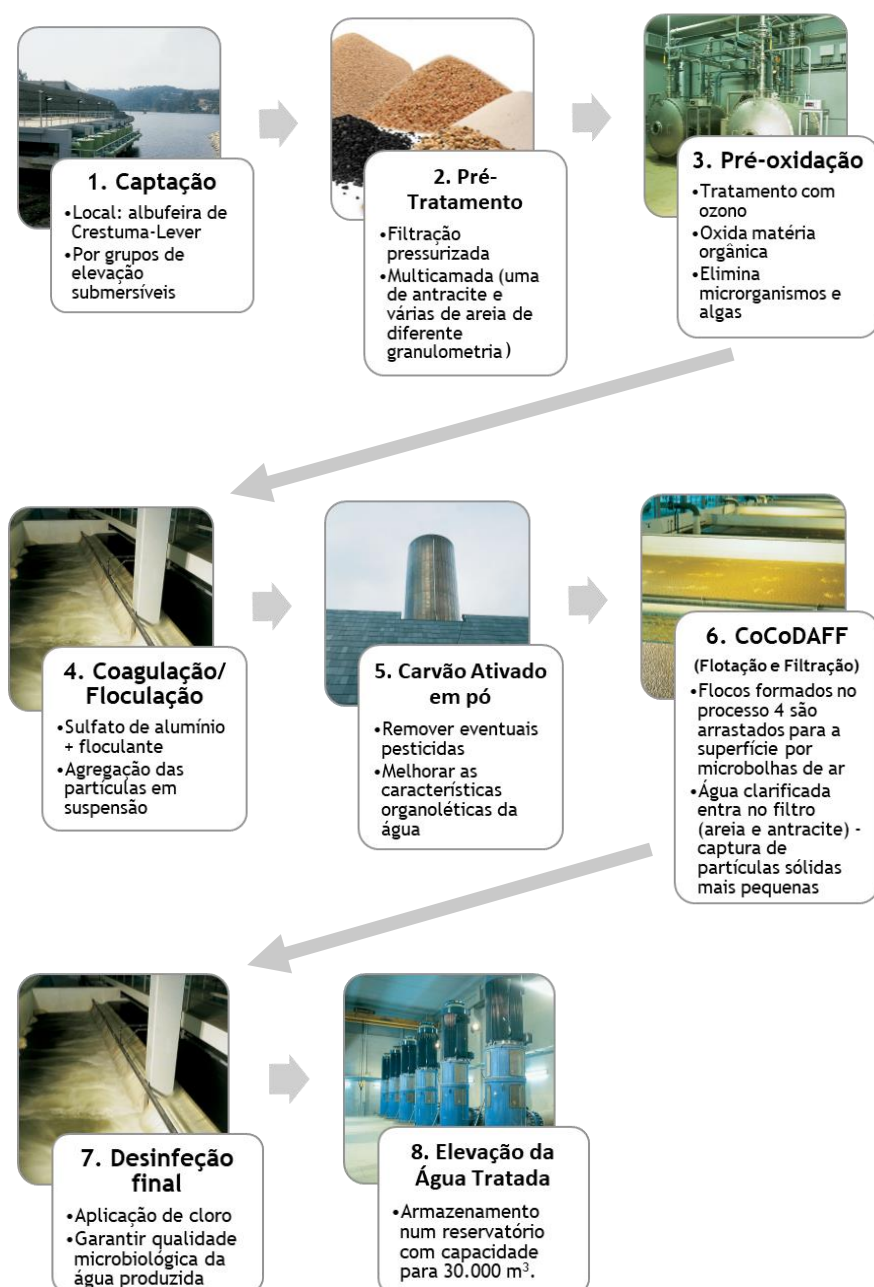


Figura 3. Processo de tratamento na ETA de Lever. Baseado em Águas do Douro e Paiva (2017a).

2.2.2 Água em Portugal

Em Portugal, têm-se verificado melhorias constantes e sustentadas na qualidade da água para consumo humano (REA, 2018). Em 2019, segundo o Relatório Anual dos Serviços de Águas e Resíduos em Portugal (Martins et al., 2020), obteve-se, em média para Portugal continental, um indicador de água segura igual a 98.66%. Dos 278 concelhos, 204 (73%) apresentaram um bom desempenho: percentagem de água segura igual ou superior a 99%; enquanto 37 (13%) registaram um indicador de 100% de água segura (Figura 4). Neste relatório, define-se água segura através do produto entre a percentagem de análises realizadas e a percentagem de análises em cumprimento do valor paramétrico. Ainda no mesmo relatório, destaca-se que a percentagem global de cumprimento dos valores paramétricos na água da torneira do consumidor se manteve acima de 98,7%, em 2019, estando a maioria dos incumprimentos associada a problemas de contaminação da água bruta na origem (47%) e a falhas no sistema de tratamento (23%) (Figura 5) (Martins et al., 2020).

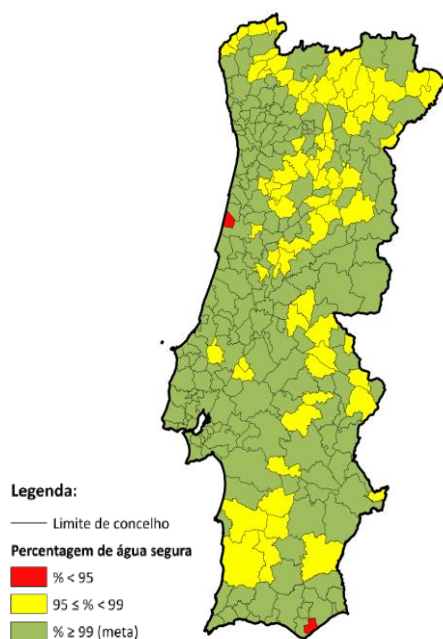


Figura 4. Distribuição geográfica da percentagem de água segura, em Portugal. Retirado de Martins et al. (2020).

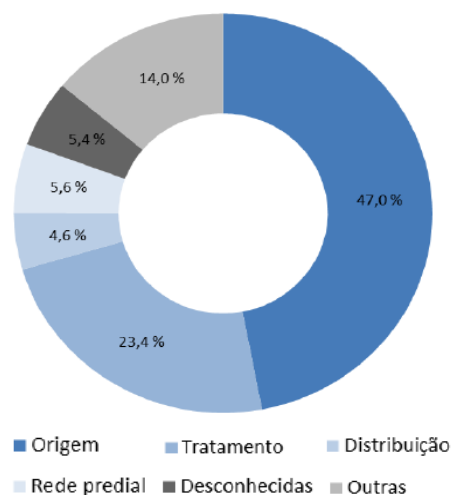


Figura 5. Causas associadas aos incumprimentos verificados na torneira do consumidor, em 2019. Retirado de Martins et al. (2020).

É de extrema importância garantir o fornecimento de uma água segura à população, uma vez que esta tem uma grande influência na saúde pública, particularmente ao nível da qualidade microbiológica. Uma má qualidade microbiológica provavelmente levará a surtos de doenças infecciosas, podendo causar epidemias graves (WHO, 2000). De facto, apesar dos avanços conseguidos na gestão da água e do saneamento, continuam a ocorrer surtos associados à água potável (Hyllestad et al., 2020).

2.2.3 Surtos associados à água potável

As infecções transmitidas pela água são causadas através da ingestão ou contacto com a água contaminada, podendo a contaminação ser causada por uma variedade de agentes infecciosos que incluem bactérias, vírus, protozoários e helmintes (Ramírez-Castillo et al., 2015). Existem mais de 500 microrganismos patogénicos que são transmitidos pela água, identificados pela Agência de Proteção Ambiental (*Environmental Protection Agency - EPA*) dos Estados Unidos (Ashbolt, 2015). A concentração destes microrganismos patogénicos na água está sujeita a variações temporais, o que dificulta a sua deteção. Assim sendo, picos temporários podem levar a casos esporádicos ou a surtos, refletindo-se na saúde humana tanto por efeitos agudos como crónicos (WHO, 2019b). Para que um evento seja considerado um surto associado à água é necessário que se verifiquem pelo menos 2 casos epidemiologicamente ligados, no que diz respeito ao tempo, local de exposição e características da doença, e a exposição à água deve ser indicada como a fonte provável da doença (Benedict et al., 2017).

Entre 2000 e 2013, de acordo com um relatório do *Joint Research Centre* (Sanseverino et al., 2018), foram reportados por 53 países da Região Europeia da OMS, na base de dados *Global Infectious Disease and Epidemiology Network (GIDEON)*, 185 surtos relacionados com a água, principalmente por contaminação durante o abastecimento, resultando em 18 doenças diferentes. Os principais microrganismos associados a estes surtos foram *Leptospira*, *Cryptosporidium*, *Giardia* e *Legionella*.

Tipicamente, as principais causas associadas aos surtos relacionados com a água têm sido atribuídas à contaminação da fonte de água bruta e a barreiras higiénicas inadequadas no processo de tratamento, embora estas últimas já apresentem melhorias pela utilização de uma abordagem de barreira múltipla em muitas estações de tratamento. Porém, a rede de distribuição tem sido sinalizada por apresentar risco de contaminação entre a estação de tratamento de água e as residências, surgindo também como uma causa frequente para os surtos associados à água (Figura 6) (Hyllestad et al., 2020).

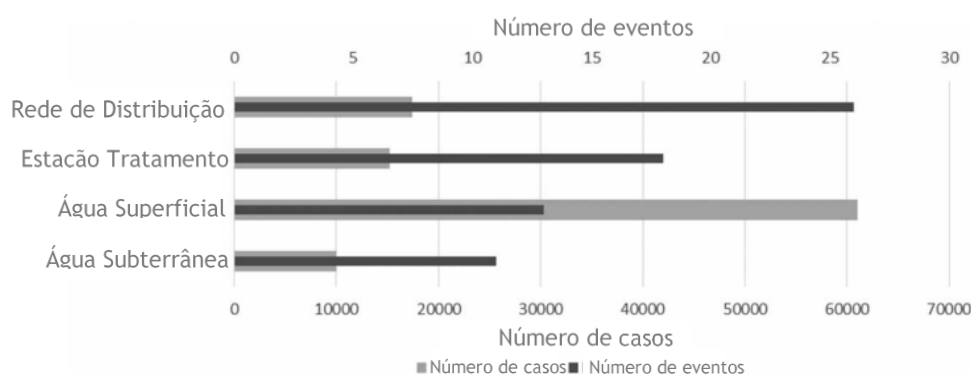


Figura 6. Número de surtos associados à água potável e número de casos de doença. Adaptado de Moreira & Bondelind (2017).

2.3 Microbiologia nos sistemas de distribuição de água potável

Numa ETA, pretende-se a produção de água potável que esteja isenta de microrganismos patogénicos e de parasitas, no entanto, sabe-se que esta não é estéril (Bitton, 2014; Gomes et al., 2020).

2.3.1 Principais microrganismos

As bactérias são os microrganismos que são encontrados em maior quantidade tanto na água da torneira como nos biofilmes dos sistemas de distribuição da água (Novak Babič et al., 2020). As bactérias predominantes na água são pertencentes aos filos *Proteobacteria* (principalmente das classes *Alpha*-, *Beta*- e *Gamma*-), *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* e *Firmicutes*. A um nível mais específico, ao nível do género, as bactérias mais comuns na água potável são as seguintes (Vaz-Moreira et al., 2014; Wingender & Flemming, 2011; Zhu et al., 2020):

- | | | |
|--------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| ▪ <i>Acidovorax</i> ; | ▪ <i>Legionella</i> ; | ▪ <i>Acinetobacter</i> ; |
| ▪ <i>Curvibacter</i> ; | ▪ <i>Rhodococcus</i> ; | ▪ <i>Aeromonas</i> ; |
| ▪ <i>Sphingomonas</i> ; | ▪ <i>Gordonia</i> ; | ▪ <i>Methylobacterium</i> ; |
| ▪ <i>Pseudomonas</i> ; | ▪ <i>Flavobacterium</i> ; | ▪ <i>Mycobacterium</i> ; |
| ▪ <i>Brevundimonas</i> ; | ▪ <i>Clostridium</i> ; | ▪ <i>Bacillus</i> |

De grande preocupação para a saúde, é a presença de microrganismos patogénicos oportunistas nos sistemas de distribuição de água, como *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium avium* e *Pseudomonas aeruginosa*, que causam infeções na população, principalmente em indivíduos mais suscetíveis (sistema imunitário deprimido) (Falkinham et al., 2015; Wang et al., 2018). Estes microrganismos tipicamente apresentam fatores de virulência, que permitem superar os mecanismos de defesa do hospedeiro, e resistência a agentes antimicrobianos, que permite a adaptação e a sobrevivência em ambientes competitivos (Beceiro et al., 2013).

2.3.2 Principais problemas e causas

A água, desde a origem até ao consumidor, está sujeita a diversas fontes de contaminação microbiológica que podem provocar a deterioração da sua qualidade, associada a turbidez, sabor e odor indesejáveis, e causar um mau funcionamento do processo, como o entupimento da tubagem, incrustação biológica e corrosão (Bertelli et al., 2018; Prest et al., 2016). De facto, sabe-se que há uma flutuação no número de bactérias ao longo do percurso da água, atingindo os valores mais baixos nos reservatórios logo após o tratamento (10^2 UFC/mL) e aumentando novamente na torneira do consumidor (10^2 a 10^5 UFC/mL) (Novak

Babič et al., 2020). Isto evidencia uma dinâmica microbiológica espacial e temporal ao longo do tratamento e distribuição da água que pode ser afetada por diversos fatores: (i) características da água não tratada; (ii) processo de tratamento e sua eficiência; (iii) implementação de desinfetante e tipo de desinfetante; (iv) materiais e idade das tubagens/reservatórios e (v) tempo de residência (idade da água) (Prest et al., 2016).

A qualidade da água natural depende do tipo de fonte da água e da região onde é captada, sendo influenciada por causas naturais (taxa de precipitação, estação do ano, etc.) e por causas antropogénicas (tipo de atividade exercida - agricultura/ indústria, níveis de poluição, etc.) (Palansooriya et al., 2019; Wang, 2016). O processo de tratamento da água deve, sempre que possível, ter em conta as características da água natural e possíveis alterações que possam ocorrer nesta, de forma a garantir a qualidade da água potável a distribuir ao consumidor (Santana et al., 2014). Os processos de tratamento convencionais foram projetados para remover sólidos de diferentes dimensões, matéria orgânica e microrganismos (incluindo os patogénicos), no entanto, não são capazes de remover alguns poluentes (pesticidas, fármacos, produtos de higiene, etc.) que têm surgido com frequência nas águas. Estes resultam, entre outros fatores, do crescimento da população e suas atividades e das alterações climáticas e, por constituírem uma ameaça para a saúde humana, requerem um processo de tratamento da água mais avançado (Teodosiu et al., 2018).

Após tratamento, a água segue por uma rede de tubagens e reservatórios para distribuição aos consumidores, onde pode deteriorar-se por reações entre a própria água e entre a água e as superfícies das tubagens, no entanto, é importante manter a sua qualidade, principalmente a microbiológica. Um dos principais problemas nos sistemas de distribuição está relacionado com o desenvolvimento bacteriano que pode levar à proliferação de microrganismos patogénicos oportunistas e à corrosão das infraestruturas, para além da alteração das propriedades organoléticas da água (cor, cheiro e sabor) (Li et al., 2018; Masters et al., 2015a). Apesar da desinfecção realizada no final do tratamento e de tipicamente ser mantida uma concentração residual de desinfetante para prevenir o crescimento microbiano, uma grande diversidade de microrganismos consegue persistir num ambiente limitado e pouco nutritivo, encontrando-se tanto em suspensão como nas superfícies das tubagens, em biofilmes (Potgieter et al., 2018; Wu et al., 2015). A maior parte (95%) dos microrganismos presentes nos sistemas de distribuição de água encontra-se em biofilmes, sendo que estas estruturas apresentam um ambiente protetivo perante condições de stress (provocadas, por exemplo, pela aplicação de desinfetantes) e baixos níveis de nutrientes (Gomes et al., 2020; Maes et al., 2019; Zhu et al., 2020). Os biofilmes funcionam como reservatórios de microrganismos patogénicos, incluindo os oportunistas, podendo libertá-los para a água através de fenómenos de desprendimento, afetando diretamente a densidade celular na fase aquosa (Manuel et al., 2006; Waak et al., 2018).

É, portanto, de extrema importância controlar o desenvolvimento dos biofilmes nos sistemas de distribuição da água potável. É necessário evitar zonas de estagnação ou elevados tempos de residência da água nas tubagens e a acumulação de sedimentos, uma vez que estas condições favorecem a formação de biofilmes (Simões & Simões, 2013). Outros aspetos a ter em conta são as características das tubagens e a idade das instalações (Douterelo et al., 2016; Waines et al., 2011). Os sistemas de distribuição antigos são mais vulneráveis, havendo uma maior necessidade de realizar reparações devido a perdas de pressão na rede, causadas por exemplo por fissuras nas tubagens, o que pode levar ao aparecimento de microrganismos nas mesmas (Ashbolt, 2015). Diferentes materiais apresentam diferentes graus de rugosidade e atividade química, o que tem impacto na formação de biofilmes, e, para além disso, apresentam diferentes taxas de corrosão, o que pode influenciar na eficácia do desinfetante, já que os produtos da corrosão reagem com este, reduzindo o seu efeito na água (LeChevallier, 1999; Zhu et al., 2014).

A aplicação de desinfetante e o tipo de desinfetante são também fatores a ter em conta no controlo da formação de biofilmes nas redes de distribuição. É frequente o uso de uma concentração residual de um desinfetante, sendo o cloro o mais utilizado, para prevenir o crescimento de bactérias em suspensão e limitar a formação de biofilme (Kormas et al., 2010). Em alternativa, têm sido utilizadas cloraminas que formam menos subprodutos halogenados da desinfecção e têm-se mostrado mais efetivas na redução da carga microbiana na água, devido à sua maior reatividade seletiva, que permite uma maior penetração no biofilme (Masters et al., 2015b; Waak et al., 2019). Porém, ao longo do percurso, com o aumento da idade da água, os desinfetantes podem dissipar-se, podendo ser encontradas concentrações mais baixas em partes do sistema de distribuição mais a jusante. Estas doses subletais de desinfetante podem exercer uma pressão seletiva que terá implicações na composição bacteriana da água potável, com microrganismos mais resilientes (Fish et al., 2020; Masters et al., 2015b).

2.4 Virulência bacteriana

A virulência é uma medida relativa da patogenicidade de um microrganismo e a expressão de fatores de virulência (FV) permite que os microrganismos patogénicos colonizem o hospedeiro, provocando danos nos tecidos e inflamação local e sistémica (Chen et al., 2005; Leitão, 2020). O conhecimento dos FV é importante para conseguir uma prevenção e um controlo eficaz das doenças infecciosas, sendo fulcrais para o desenvolvimento de novas moléculas terapêuticas e estratégias para combater as infeções microbianas (Liu et al., 2019). De facto, as terapias antivirulentas constituem uma alternativa para as abordagens tradicionais, que se baseiam na interrupção do crescimento celular, o que exerce um grande

stress nas bactérias alvo, originando rapidamente bactérias resistentes (Rasko & Sperandio, 2010; Silva et al., 2016). Para além disso, vários FV são geneticamente conservados apenas entre microrganismos intimamente relacionados, o que permite desenvolver medicamentos com espectro de ação limitado, neutralizando apenas as bactérias patogénicas e preservando o microbioma humano (Watkins & Unnikrishnan, 2020).

A aquisição de FV, que levam ao aparecimento de formas patogénicas, é conseguida principalmente através da transferência horizontal de genes (Meena et al., 2019). Os FV, por interações diretas com os tecidos do hospedeiro ou ocultando a superfície bacteriana dos mecanismos de defesa deste, permitem que o microrganismo seja dotado de capacidades como entrar e colonizar tecidos do hospedeiro, neutralizar as respostas imunes e crescer num ambiente hostil (Casadevall & Pirofski, 2009; Wu et al., 2008). A expressão dos diversos FV é regulada pelas bactérias patogénicas em resposta a vários sinais ambientais dentro do hospedeiro, como a disponibilidade de ferro, as concentrações de oxigénio, a temperatura, a osmolaridade e o pH, que afetam o crescimento e a persistência dos microrganismos. Para além disso, as bactérias têm que conseguir responder a variações nas concentrações de moléculas produzidas pelo hospedeiro para a sua defesa (espécies reativas de oxigénio e nitrogénio, por exemplo) (Johnson, 2018).

Os FV das bactérias podem ser classificados de acordo com a sua função e mecanismo de virulência em (i) proteínas da membrana, (ii) cápsulas polissacarídeas, (iii) proteínas secretadas (toxinas), (iv) componentes da parede celular ou membrana externa e (v) outros (proteínas que permitem a formação de biofilmes, sideróforos, mobilidade, etc.) (Wu et al., 2008).

2.4.1 Biofilmes

Os biofilmes consistem em comunidades microbianas tridimensionais, complexas e organizadas, compostas por células incorporadas numa matriz gelatinosa de substâncias poliméricas extracelulares (SPEs). São compostas principalmente por polissacarídeos e proteínas, podendo conter também lípidos e DNA extracelular. As SPEs constituem a parte mais extensa do biofilme, apresentando funções como o fornecimento de estrutura e de estabilidade mecânica (Fish et al., 2017; Flemming et al., 2002; Liu et al., 2016).

O desenvolvimento de um biofilme ocorre num processo sequencial (Figura 7), que inclui o transporte de microrganismos para uma superfície e a sua adesão reversível (1), a produção de SPEs e a adesão irreversível das células (2), a formação de microcolónias, proliferando o biofilme (3), a maturação do biofilme até se atingir o máximo de densidade celular (4) e o desprendimento/dispersão de células do biofilme (5), havendo um equilíbrio entre o crescimento e a dispersão (Gomes et al., 2016; Verderosa et al., 2019). No processo de adesão e formação de microcolónias, pode ocorrer o fenómeno de coagregação, que

consiste num processo altamente específico de reconhecimento e aderência de bactérias a si mesmas (autoagregação) ou a outras geneticamente diferentes, podendo a coagregação estar associada ao desenvolvimento de biofilmes multiespécies complexos (Afonso et al., 2021; Datta et al., 2017). Relativamente à dispersão, esta pode ocorrer de forma ativa, por alterações nas condições ambientais (falta de nutrientes e/ou oxigénio, alteração da temperatura, etc.), e de forma passiva, que depende de fatores como as tensões de corte exercidas pela circulação de água nas tubagens (Toyofuku et al., 2015). É nesta fase que, no caso dos biofilmes formados nos sistemas de distribuição de água potável, se podem libertar microrganismos (incluindo microrganismos patogénicos) para a água, podendo constituir um perigo para a saúde humana, principalmente para os indivíduos com o sistema imunitário comprometido (Wingender & Flemming, 2011). As células que se desprendem dos biofilmes podem iniciar um novo ciclo, aderindo a uma nova superfície (Toyofuku et al., 2015).

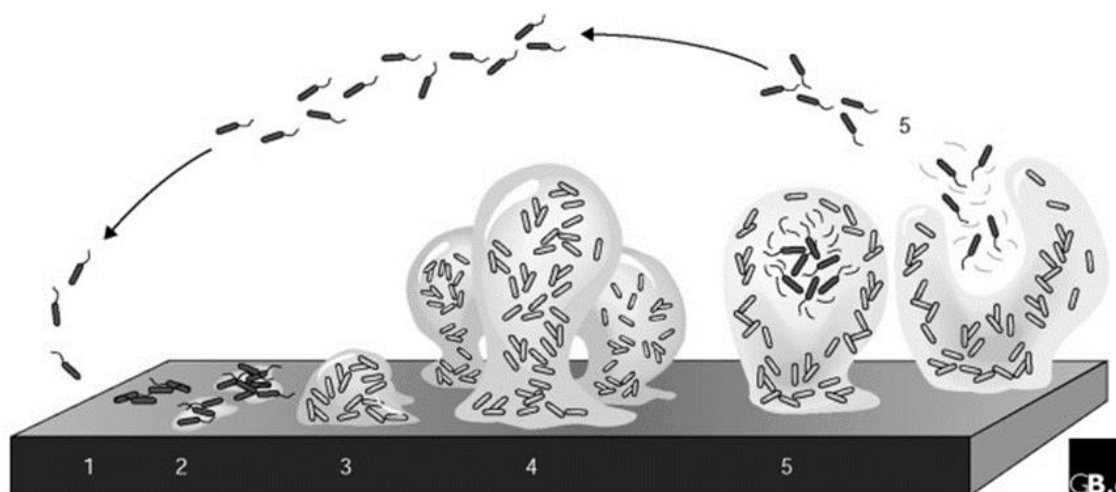


Figura 7. O processo de formação do biofilme envolve várias etapas: 1 - adesão reversível; 2 - adesão irreversível; 3 - proliferação e formação de microcolônias; 4 - maturação; e 5 - desprendimento/dispersão. Retirado de Sauer (2003).

Nos biofilmes, os microrganismos podem encontrar-se em estado ativo ou dormente (uma importante estratégia para a sobrevivência) e encontram-se mais protegidos do meio ambiente, o que pode desencadear respostas de stress, perante condições desfavoráveis (Gomes et al., 2020; Zhang et al., 2018). As células em biofilme tipicamente apresentam uma maior resistência do que as células em estado planctónico, sendo os biofilmes de maior diversidade bacteriana mais resistentes e adaptáveis (Tsvetanova, 2020). A matriz de SPEs funciona como uma barreira e tem um papel fundamental nesta maior resistência das células sésseis. Esta atrasa ou previne o contacto dos agentes antimicrobianos com os microrganismos alvo, através da limitação da difusão do agente antimicrobiano e/ou por interação química com as proteínas e polissacarídeos extracelulares (Simões et al., 2010).

Outro aspeto relevante no desenvolvimento dos biofilmes é a interação que as células estabelecem entre si através da secreção de pequenas moléculas sinalizadoras, conceito de

quorum sensing (QS), que fornece um mecanismo para que as bactérias monitorem a presença umas das outras e modulem a expressão genética em resposta a mudanças na densidade populacional (Camilli & Bassler, 2006; Capelletti & Moraes, 2016). O sistema QS permite que as bactérias respondam coletivamente às alterações ambientais, sincronizando as suas atividades, através da sinalização para o desenvolvimento de FV e de um mecanismo de defesa (Brindhadevi et al., 2020; Mangwani et al., 2016).

Uma outra preocupação relacionada com a formação de biofilmes está associada ao facto desta modalidade facilitar a transferência de genes entre as bactérias, o que pode levar a um aumento de estirpes virulentas, já que as bactérias associadas aos biofilmes têm mostrado uma maior resistência a antibióticos e a secreção de diferentes fatores de virulência (Gupta et al., 2016).

2.4.2 Mobilidade

A mobilidade bacteriana apresenta uma diversidade de papéis na patogenicidade: (i) alcance do local ideal no hospedeiro, (ii) colonização ou invasão dos tecidos, (iii) manutenção no local da infecção e (iv) dispersão após infecção (Chaban et al., 2015). Assim, a mobilidade representa uma vantagem específica para as bactérias, já que permite que estas alcancem o ambiente mais favorável à sua sobrevivência, moldando a competição entre espécies, a potencial virulência e o desenvolvimento de biofilmes (Mattingly et al., 2018; Soutourina et al., 2001). Os principais tipos de mobilidade são *swimming*, em meios aquosos, e *swarming*, *twitching*, *gliding* e *sliding*, em meios sólidos ou semissólidos, estando estes representados na Figura 8 (Nan & Zusman, 2016; Wu et al., 2020).

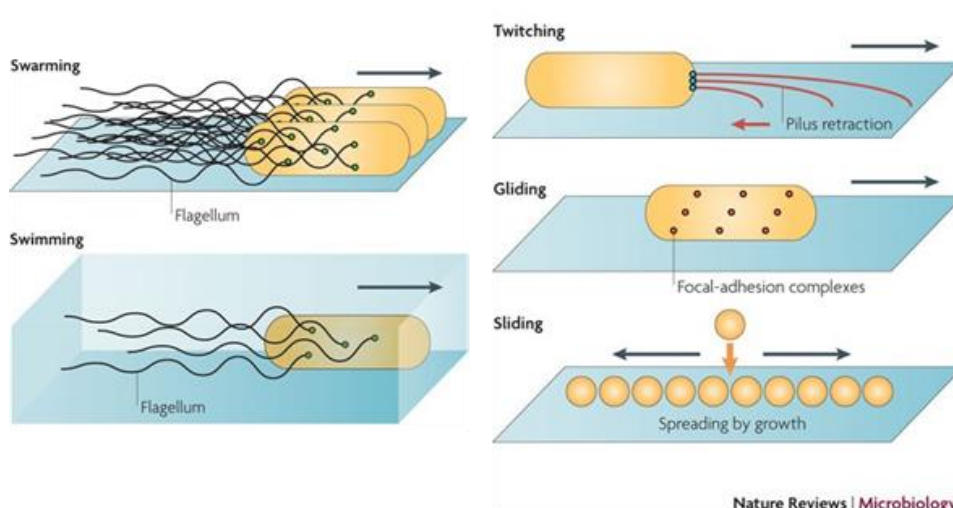


Figura 8. Principais tipos de mobilidade: *swimming*, *swarming*, *twitching*, *gliding* and *sliding*. Retirado de Kearns (2010).

Os tipos de mobilidade *swimming* e *swarming* são dependentes de flagelos rotativos, sendo que o primeiro é um movimento individual e em ambientes líquidos, ao contrário do

segundo, que resulta de uma atividade multicelular ao longo de uma superfície. A mobilidade do tipo *swarming* envolve ainda *pili* do tipo IV e a secreção de surfactantes, os ramnolípidos (Calvio et al., 2005; Kearns, 2010; Otton et al., 2017). O tipo de mobilidade *twitching* é conseguido à custa da extensão e retração de *pili* do tipo IV, permitindo que as bactérias se movam em ambientes com baixo teor de água e/ou colonizem superfícies hidratadas (Mattick, 2002). Relativamente ao tipo de mobilidade *gliding*, esta é definida como um movimento suave das células, geralmente ao longo do seu eixo, sem o auxílio de estruturas propulsivas, como flagelos ou *pili* (Nan, 2017). O tipo de mobilidade *sliding* é um movimento passivo, conseguido à custa das forças expansivas da crescente população bacteriana e pelas propriedades da superfície celular (atrito entre as células e a superfície, por exemplo) (Hölscher & Kovács, 2017; Shi et al., 2011).

A mobilidade está intimamente relacionada com o desenvolvimento de biofilme, correspondendo à primeira fase da sua formação e afetando o desprendimento das células do biofilme. De facto, a mobilidade é relevante para o transporte das células até às superfícies das tubagens, no caso da água potável, e também permite que as bactérias superem as forças eletrostáticas que se estabelecem entre as células e as superfícies colonizadas (Prüß, 2017; Tsagkari & Sloan, 2018). Esta capacidade de as bactérias formarem biofilmes e se moverem é muitas vezes afetada por alterações nas vias metabólicas, bem como pela resposta a fatores de stress (Rossi et al., 2018).

As bactérias com mobilidade do tipo *swimming* dependem dos gradientes químicos (quimiotaxia) do meio envolvente, pelo que monitorizam as alterações nas condições do meio em que se encontram e adaptam o seu padrão de mobilidade, de forma a encontrar as condições mais favoráveis (Colin et al., 2021). As mobilidades que ocorrem em superfícies (*swarming*, *twitching*, *sliding* e *gliding*), para além da regulação dos motores necessários (flagelos e *pili*), dependem fortemente de fatores ambientais, como a humidade, nutrientes e compostos autoproduzidos, e ainda das ações e movimentos das células da vizinhança (Mattingly et al., 2018).

2.4.3 Proteases e Gelatinases

As proteases bacterianas têm papéis vitais na viabilidade celular, resposta ao stress e patogenicidade. As proteases secretadas pelas bactérias têm o potencial de degradar as proteínas do hospedeiro, o que permite facilitar a sua penetração e disseminação no hospedeiro e colonizá-lo, combatendo os seus mecanismos de defesa (Culp & Wright, 2017; Figaj et al., 2019; Kaman et al., 2014). Podem ser divididas em vários grupos, tendo em conta os resíduos catalíticos: serina, treonina, cisteína, ácido aspártico, ácido glutâmico, asparagina e metaloproteases (Agbowuro et al., 2018).

O estudo das proteases é essencial para a descoberta de novos medicamentos, uma vez que estes FV têm um papel fundamental na propagação de doenças infecciosas, devido ao seu papel significativo no ciclo de vida bacteriano (Razzaq et al., 2019).

A gelatinase é uma protease capaz de hidrolisar a gelatina, o colagénio, a caseína, a hemoglobina e outros péptidos bioativos (Cevahir et al., 2008). As gelatinases são então metaloproteases e existem dois tipos: a gelatinase A (MMP-2) e gelatinase B (MMP-9) (Galasso et al., 2012). As gelatinases, para além da sua contribuição na formação de biofilme (inativação do gene que codifica para a gelatinase permite prevenir a formação de biofilme), contribuem para a virulência bacteriana através da degradação dos compostos do hospedeiro acima mencionados (Hancock & Perego, 2004; Thurlow et al., 2010).

2.4.4 Sideróforos

O ferro é um requisito essencial para o crescimento da maioria dos microrganismos, uma vez que é um cofator de várias enzimas que estão envolvidas em processos bioquímicos fundamentais, como a respiração, a fixação de nitrogénio, a biossíntese de DNA e a regulação dos genes (Santos et al., 2020). No ser humano, o ferro apresenta um papel fundamental. A sua utilidade biológica reside na capacidade de alternar entre dois estados de oxidação: ferroso (Fe^{2+}) ou férrico (Fe^{3+}), podendo servir como um catalisador *redox*. Na presença de espécies reativas de oxigénio, o ferro pode catalisar a reação de Fenton para gerar radicais hidroxilo que danificam lípidos, DNA e proteínas (Cassat & Skaar, 2013). Adicionalmente, o ferro é um cofator de hemoproteínas que estão envolvidas em funções biológicas importantes, como a ligação e o transporte de oxigénio (hemoglobinas), o metabolismo do oxigénio (catalases e peroxidases), e a respiração celular e o transporte de eletrões (citocromos) (Pantopoulos et al., 2012).

De forma a superar as restrições de ferro, um aspeto central da defesa do hospedeiro (que limita o ferro disponível através de proteínas como a transferrina e a ferritina), as bactérias desenvolveram diferentes mecanismos para adquirir este nutriente essencial, tal como a produção de sideróforos (Casadevall & Pirofski, 2009; Dale et al., 2004).

Os sideróforos são moléculas de baixo peso molecular, quelantes de ferro com alta afinidade e são fatores essenciais de virulência em muitas bactérias patogénicas (Holden & Bachman, 2015). Através da produção destas moléculas, as bactérias patogénicas conseguem competir pelo ferro do hospedeiro humano, que é obtido por ingestão alimentar, perturbando a sua homeostase (Holden & Bachman, 2015; Kalidasan et al., 2018). Os sideróforos podem ser classificados, dependendo do grupo funcional, em: (i) catecóis, (ii) hidroxamatos, (iii) carboxilatos e (iv) mistos (mistura de grupos funcionais) (Ahmed & Holmström, 2014). Os microrganismos secretam um ou mais tipos de sideróforos, dependendo da espécie e da severidade da falta de ferro (Aznar & Dellagi, 2015).

2.5 Resistência a antibióticos

Recentemente, tem-se vindo a assistir a um aumento dramático de bactérias multirresistentes, sendo que o ambiente aquático, incluindo a água potável, tem sido considerado como uma grande fonte de genes de resistência a antibióticos (GRAs) (Hu et al., 2019; Roca et al., 2015). Esta resistência crescente representa um risco muito elevado para a saúde, uma vez que se verifica uma diminuição da efetividade dos tratamentos com antibióticos, levando ao aumento da severidade, incidência e custos com as infeções (McEwen & Collignon, 2018). No caso da água potável, a presença de GRAs constitui uma ameaça para o ser humano através de diferentes vias: (i) ingestão direta da água contendo microrganismos patogénicos resistentes; (ii) transmissão de pessoa para pessoa após ingestão da água contaminada e (iii) transferência horizontal dos GRAs das bactérias ambientais para os microrganismos patogénicos (Gomes et al., 2020). Estima-se que, até 2050, as infeções por bactérias resistentes a antibióticos (BRAs) sejam responsáveis por 10 milhões de mortes em todo o mundo (Amarasiri et al., 2020).

As bactérias apresentam diversos mecanismos de resistência a agentes antimicrobianos, representados na Figura 9: (i) modificações enzimáticas ou destruição da molécula do agente antimicrobiano; (ii) impedir a ação do antibiótico no alvo e (iii) aumento do efluxo do agente antimicrobiano. No caso das bactérias Gram negativas, existe ainda outro mecanismo que consiste na alteração da permeabilidade da membrana externa (Martínez & Baquero, 2014; Poole, 2002; Stewart, 2002).

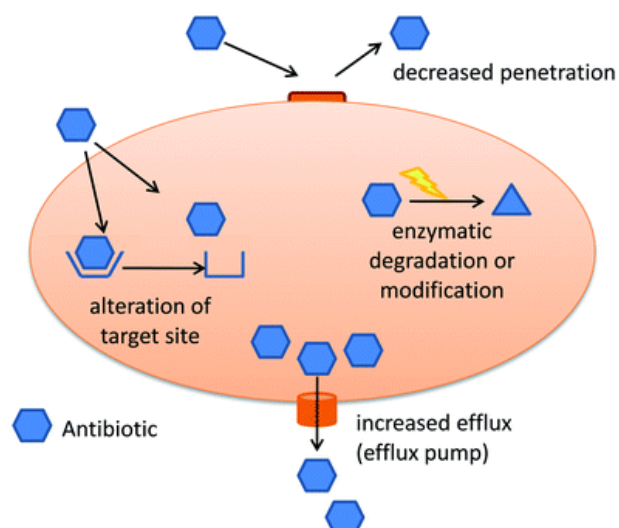


Figura 9. Mecanismos de resistência das bactérias aos antibióticos. Retirado de Abreu et al. (2012).

A modificação da molécula do antibiótico é uma estratégia que leva à ineficácia do antibiótico, sendo este mecanismo muito comum nas bactérias, especialmente no caso de antibióticos como os aminoglicosídeos, os β -lactâmicos e cloranfenicol (Peterson & Kaur, 2018). Outro mecanismo de resistência, este relacionado com o alvo, consiste em impedir que o antibiótico atinja o alvo (proteção do alvo) ou em modificar a molécula alvo, reduzindo a

afinidade para o antibiótico. A proteção do alvo é frequente perante a exposição a antibióticos como tetraciclina, fluoroquinolonas e ácido fusídico, enquanto a modificação do alvo é comum em antibióticos como rifampicina, oxazolidinonas, trimetopim-sulfametoxazol, β -lactâmicos, entre outros (Munita & Arias, 2016). No caso do mecanismo de efluxo do antibiótico, este efluxo é conseguido à custa de bombas de efluxo dependentes de energia e que são capazes de operar contra uma grande quantidade de classes de antibióticos (Blanco et al., 2016). Tal como referido anteriormente, as bactérias Gram negativas apresentam ainda um mecanismo relacionado com a presença de uma membrana externa que constitui uma barreira entre o ambiente e a bactéria. Esta membrana é composta por fosfolípidos e lipopolissacarídeos que formam uma camada hidrofóbica, impermeável a compostos hidrofílicos. Assim, há um menor influxo de compostos tóxicos para o interior da célula, deixando estas bactérias mais protegidas (Knopp & Andersson, 2015; Macnair & Brown, 2020).

Os mecanismos de resistência das bactérias aos antibióticos podem ser resultado de: (i) resistência intrínseca, (ii) resistência adquirida ou (iii) resistência adaptativa. A resistência intrínseca corresponde a propriedades que são inerentes ao próprio microrganismo, a resistência adquirida envolve a transferência horizontal de elementos genéticos e/ou mutações em genes celulares e a resistência adaptativa é uma resistência induzida e dependente da presença contínua do agente antimicrobiano ou de outro estímulo ambiental (Cox & Wright, 2013; Fernández & Hancock, 2012; Giedraitienė et al., 2011).

2.5.1 GRAs nos sistemas de distribuição de água

Os processos comuns de tratamento de água, incluindo alguns processos mais avançados (como a filtração com carvão ativado biológico e ozono) não são capazes de remover totalmente as BRAs e os GRAs que se encontram na água de onde é feita a captação (Zhang et al., 2016). Um estudo mostrou que, comparando o tratamento avançado da água potável com os processos convencionais, o primeiro não acrescentou benefícios significativos para a remoção de GRAs (Xu et al., 2016). De facto, a eficiência dos processos de tratamento da água na remoção destas bactérias e genes de resistência é influenciada por diversos fatores, como a pressão seletiva (presença de antibióticos, desinfetantes, etc.), a limitação de nutrientes, os tipos de GRAs e a forma em que existem (diferentes resistências das bactérias onde se encontram os genes), entre outros. Estes fatores, quando combinados, complicam o processo de remoção dos GRAs (Zhang et al., 2021). Porém, o tratamento da água apresenta um papel muito importante na remoção de GRAs da água, já que a quantidade destes genes reduz de forma significativa quando comparada a água da fonte com a da torneira do consumidor (Su et al., 2018). Em contrapartida, sabe-se que a quantidade de BRAs e GRAs é maior na água que chega à torneira do consumidor do que na água no final do processo de tratamento, pelo que se considera que os sistemas de distribuição da água são um

Crescimento, resistência a antibióticos e virulência de bactérias isoladas de sistemas de água potável - efeito da exposição a glifosato

reservatório para a disseminação de microrganismos patogênicos resistentes aos antibióticos (Gomes et al., 2020; Su et al., 2018).

As bactérias nos sistemas de distribuição de água potável crescem principalmente em três microambientes diferentes, tal como representado na Figura 10: (i) sólidos suspensos, (ii) depósitos soltos ou (iii) biofilmes, sendo o último aquele que funciona como reservatório da resistência a antibióticos na água (Sanganyado & Gwenzi, 2019).

Nos biofilmes, há uma maior densidade celular e uma menor distância entre as bactérias, comparando com o estado planctônico, o que facilita a transferência horizontal de genes, permitindo a transmissão dos GRAs entre as várias bactérias que constituem o biofilme (resistência adquirida) (Chen et al., 2020). Esta transferência horizontal de genes pode ocorrer por transformação, transdução ou conjugação, processos representados na Figura 11, sendo o último o mais eficiente na disseminação da resistência aos antibióticos entre as bactérias (Balcázar et al., 2015).

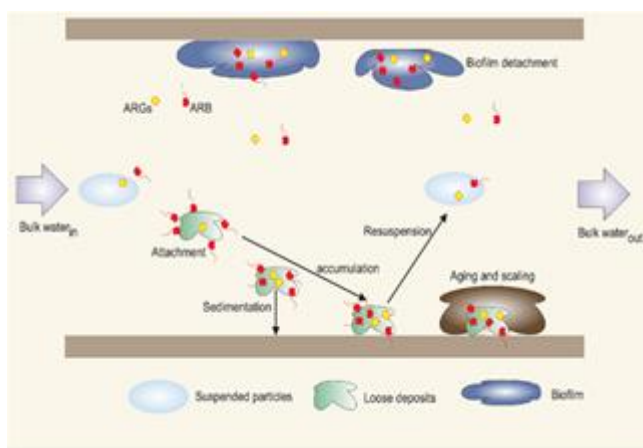


Figura 10. Crescimento das bactérias, em diferentes microambientes, nos sistemas de distribuição de água: sólidos suspensos, depósitos soltos ou biofilmes. Retirado de Sanganyado & Gwenzi (2019).

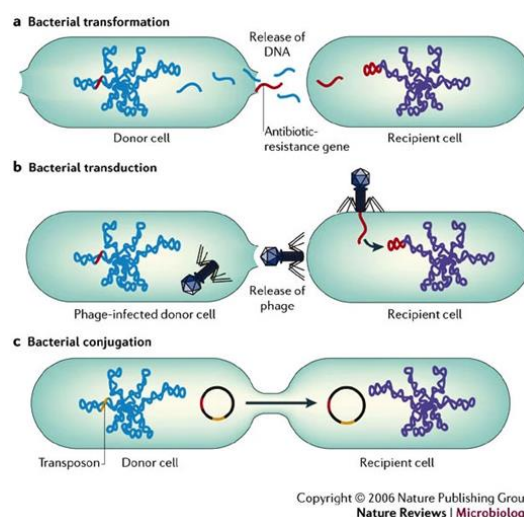


Figura 11. Mecanismos de transferência horizontal de genes entre as bactérias: transformação (cima), transdução (centro) ou conjugação (baixo). Retirado de Furuya & Lowy (2006).

2.5.2 Classes de antibióticos e mecanismos de ação

Existem várias formas de classificar os antibióticos, mas as mais comuns baseiam-se nas estruturas moleculares, no modo de ação e no espectro de atividade (Etebu & Ariekpar, 2016). Com base na estrutura molecular, os antibióticos podem ser classificados em diversas classes, de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (CLSI, 2015b), estando alguns exemplos de classes e de antibióticos apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Classes de antibióticos e alguns exemplos.

Classe	Subclasse	Exemplos
Penicilinas (B-lactâmicos)	Penicilinas lábeis à penicilinase	Ampicilina Penicilina Ticarcilina
	Penicilinas resistentes à penicilinase	Cloxacilina Dicloxacilina Oxacilina
Combinação B-lactam/inibidores B-lactamase (B-lactâmicos)	---	Amoxicilina-ácido clavulânico Piperacilina-tazobactam Ticarcilina-ácido clavulânico
Cefalosporinas (B-lactâmicos)	1ª geração	Cefazolina Cefapirina Cefradina
	2ª geração	Cefonicida
	3ª geração	Cefoperazona Ceftazidima
	4ª geração	Cefepima
	Cefalosporinas com atividade anti-MRSA (MRSA - <i>Methicilin-resistant Staphylococcus aureus</i>)	Ceftarolina
Monobactâmicos (B-lactâmicos)	---	Aztreonam
Carbapenêmicos (B-lactâmicos)	---	Meropenem
Aminoglicosídeos	---	Amicacina Gentamicina Netilmicina
Glicopeptídeos	Glicopeptídeos	Vancomicina
	Lipoglicopeptídeos	Teicoplanina Ramoplanina
Lipopeptídeos	---	Daptomicina Colistina
Macrólidos	---	Azitromicina Eritromicina
Quinolonas	Quinolonas	Cinoxacina
	Fluoroquinolonas	Ciprofloxacina Gatifloxacina Levofloxacina
Tetraciclinas	---	Minociclina Tetraciclina
Inibidores da via metabólica do ácido fólico	---	Sulfonamidas Trimetoprim-sulfametoxazol
Outros	Rifampicina (ansamicinas) Quinupristina-dalfopristina (streptograminas) Linezolida (oxazolidinonas) Nitrofurantoína (nitrofuranos) Cloranfenicol (fenicol)	

Os antibióticos podem ser considerados como bactericidas, quando matam a bactéria, ou como bacteriostáticos, quando inibem o crescimento das bactérias sem as matar. A atuação dos antibióticos geralmente ocorre por inibição da síntese da parede celular ou de ácidos nucleicos, inibição da função do ribossoma ou da função da membrana celular e inibição do metabolismo do ácido fólico (essencial para a síntese de DNA e RNA) (Nemeth et al., 2015; Wenzel, 2020).

2.6 Contaminantes emergentes

2.6.1 Principais contaminantes encontrados na água

Os contaminantes emergentes (CEs) são produtos químicos, sintéticos ou naturais, ou até microrganismos que tipicamente não são monitorizados, mas que têm o potencial de entrar no meio ambiente e causar efeitos ecológicos e/ou na saúde humana (Houtman, 2010; Rosenfeld & Feng, 2011).

Devido a várias atividades antropogênicas, como a agricultura, a indústria e a utilização de compostos químicos nas casas (Figura 12), tem-se verificado um aumento de CEs na água que provocam uma preocupação pública considerável, principalmente nos casos em que não estão legislados os valores limite (Schriks et al., 2010). Os CEs não são removidos pelas estações de tratamento de águas residuais, pelo que são disseminados para as águas superficiais ou para os solos (devido à reutilização das lamas como fertilizantes). Desta forma, e como as ETAs também não estão preparadas para fazerem a remoção completa dos CEs, estes atingem a água potável (Alderton et al., 2021; Gomes et al., 2020).

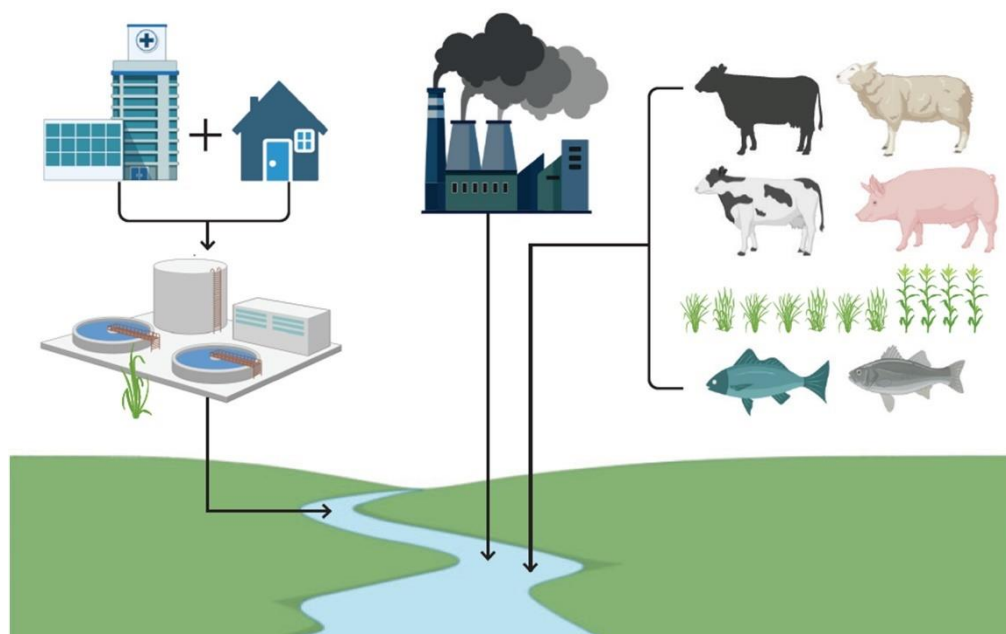


Figura 12. Fontes de liberação de CEs para o meio ambiente. Retirado de Alderton et al. (2021).

De facto, tem-se observado uma grande variedade de produtos químicos em águas superficiais e subterrâneas pertencentes a diferentes classes, tais como produtos farmacêuticos, pesticidas, produtos de higiene pessoal, subprodutos de desinfecção, surfactantes, entre outros (Gomes et al., 2020; Riva et al., 2018). Tal como a libertação de antibióticos, a libertação de herbicidas (um tipo de CE) na água tem despertado uma maior atenção nos últimos anos, já que estes podem ser aplicados diretamente na superfície do solo e, consequentemente, atingir os cursos de água (Gomes et al., 2020).

Um dos herbicidas mais usados no mundo é o glifosato por ser considerado ambientalmente benigno, não tóxico e seguro para os animais. No entanto, têm surgido recentemente preocupações relativamente aos efeitos colaterais prejudiciais do glifosato, devido ao uso intensivo do deste herbicida e à sua acumulação no ambiente (Kissane & Shephard, 2017; Rossi et al., 2021a; Van Bruggen et al., 2018).

2.6.2 Influência da exposição de bactérias aos contaminantes

A exposição a concentrações ambientais relevantes de CEs provoca alterações significativas na comunidade microbiana, como alterações na taxa respiratória, na produção de substâncias poliméricas extracelulares (SPEs) e na atividade enzimática (Gomes et al., 2020). De facto, entre as principais preocupações da exposição de bactérias a CE, estão a bioacumulação, a biomagnificação e o desenvolvimento de genes de resistência bacteriana, que podem afetar a eficácia dos antibióticos e que apresentam potencial de propagação no meio ambiente (Reichert et al., 2019).

A bioacumulação e a biomagnificação são dois conceitos relevantes pelo facto de os contaminantes se poderem acumular em alguns organismos ou tecidos e propagar pela cadeia alimentar, amplificando a sua presença e, consequente, exposição (Gomes et al., 2020).

No que diz respeito ao desenvolvimento de genes de resistência, alguns dos contaminantes envolvidos são: produtos biocidas, como os agentes antibacterianos (triclosan e triclocarban), agentes antifúngicos, herbicidas, surfactantes, e agentes farmacêuticos, como salicilatos, fluoxetina, ibuprofeno e carbamazepina (Alderton et al., 2021). Efetivamente, a exposição a novos produtos químicos gera um mecanismo de adaptação microbiano onde diferentes processos, como a indução de diferentes vias enzimáticas ou a metabolização de diferentes intermediários, podem estar envolvidos (Amariei et al., 2020).

2.7 Conceito “One Health”

A crescente poluição ambiental, o desenvolvimento da resistência a antibióticos e o desenvolvimento de doenças multifatoriais e crônicas, têm ameaçado a saúde humana e animal (Destoumieux-Garzón et al., 2018). É, portanto, evidente a necessidade de existir uma abordagem colaborativa e multidisciplinar, ultrapassando as fronteiras da saúde animal, humana e ambiental, de forma a compreender a ecologia de cada zoonose, com o objetivo de realizar uma avaliação de risco e desenvolver planos de resposta e controle (Mackenzie & Jeggo, 2019).

Assim, surge o conceito de “Uma Só Saúde” (“One Health”) onde se reconhece que a saúde humana está relacionada com a saúde animal e ambiental. Este conceito encoraja um trabalho colaborativo entre várias áreas e especialistas, com o intuito de alcançar o maior impacto possível na melhoria das saúdes humana e animal (CDC, 2020a, 2020c; Instituto Ricardo Jorge, 2018). Com esta abordagem de “Uma Só Saúde” pretende-se a criação e implementação de programas, políticas, legislações e pesquisas para alcançar melhores resultados de saúde pública (WHO, 2017b). Este conceito, na Suécia, foi representado por um “guarda-chuva” (Figura 13), que engloba os principais aspetos desta abordagem (Lerner & Berg, 2015).

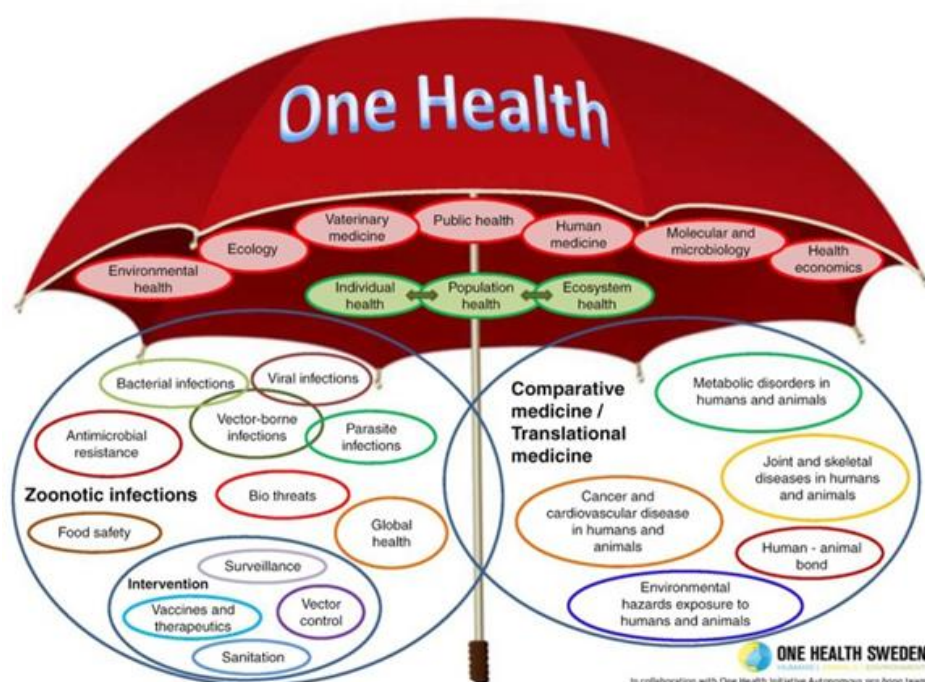


Figura 13. Representação do conceito de “One Health”, na Suécia. Retirado de Lerner & Berg (2015).

O conceito de “Uma Só Saúde” é de extrema importância no que concerne à segurança da água potável, já que uma grande parte das doenças infecciosas nos humanos são de origem animal ou com ligação zoonótica. Isto deve-se essencialmente ao facto de a água ser um canal comum entre os animais selvagens e domésticos e as exposições do ser humano às doenças animais (Reynolds, 2018).

3 Materiais e Métodos

3.1 Amostras (Origem, recolha, transporte e armazenamento)

Neste estudo foram analisadas amostras de água natural doce superficial, provenientes do Rio Douro (na albufeira de Crestuma-Lever), e de água de consumo humano, provenientes da ETA de Lever (à saída da ETA) e de dois reservatórios: Reservatório de Pedrouços (RP) e Reservatório de Vila Nova (RVN). Nos reservatórios procedeu-se ainda à amostragem de biofilme. As colheitas foram realizadas no dia 5 de novembro de 2020.

No Anexo 1, podem ser consultados o mapa das infraestruturas (Figura A1. 1), bem como um esquema representativo do abastecimento dos RP e RVN (Figura A1. 2).

A amostragem, o transporte e o armazenamento das amostras foram realizadas de acordo com as regras estabelecidas no PRO 9.031 - Colheita de Amostras - Águas do Douro e Paiva, estando este procedimento elaborado de acordo com as seguintes normas da *International Organization for Standardization* (ISO): ISO 5667-3:2018 - *Water quality – Sampling— Part 3: Preservation and handling of water samples* (requisitos gerais para amostragem, preservação, manuseamento, transporte e armazenamento); ISO 5667-5:2006 - *Water quality – Sampling – Part 5: Guidance on sampling of drinking water from treatment works and piped distribution systems* (amostragem de água tratada); ISO 5667-6:2014 - *Water quality – Sampling – Part 6: Guidance on sampling of rivers and streams* (amostragem de água do rio); e ISO 11731:2017 - *Water quality – Enumeration of Legionella* (amostras de biofilme) (International Organization for Standardization, 2006, 2014, 2017, 2018a).

As amostras de água de consumo humano foram colhidas em frascos que contêm tiosulfato de sódio, de forma a neutralizar o cloro. A colheita dos biofilmes foi realizada com uma zaragatoa estéril, seguindo-se a ressuspensão em salina estéril (0.85%).

3.2 Isolamento, caracterização e identificação das bactérias

3.2.1 Isolamento, purificação e conservação

O isolamento das bactérias foi efetuado pelo método de filtração em membrana, de acordo com ISO 8199:2018 - *Water quality – General requirements and guidance for microbiological examinations by culture* (International Organization for Standardization, 2018b). Foi utilizado o meio R2A agar (*Biogerm*), incubando as placas à temperatura ambiente $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$, durante 3 dias. Procedeu-se à subcultura das bactérias, sob as mesmas condições, e ao armazenamento a -80°C , em R2A *broth* (composição no Anexo 2 - Tabela A2. 1), contendo 20% (v/v) de glicerol (*Merck*) (Chen et al., 2007; Chen et al., 2017).

3.2.2 Caraterização Morfológica e Bioquímica

Após isolamento das bactérias, analisaram-se as colónias, em placas de R2A agar, relativamente à cor, forma, margens, elevação, transparência e brilho (Al-Dhabaan, 2019). Foram ainda observadas características da célula (morfologia e estrutura da parede celular) através da realização da Coloração de Gram, uma coloração diferencial que permite distinguir diferentes tipos de bactéria, tendo em conta a estrutura da parede celular (Moyes et al., 2009). Para a caraterização bioquímica dos isolados, recorreu-se a galerias API e, adicionalmente, efetuaram-se os testes da catalase e da oxidase.

3.2.2.1 Coloração de Gram

O esfregaço e a aplicação dos reagentes da coloração de Gram (*Merck*) foram efetuados de acordo com as recomendações do fornecedor. As bactérias Gram positivas apresentaram cor azul a roxa, enquanto as Gram negativas apresentaram uma cor entre rosa e vermelho.

3.2.2.2 Identificação API

Da gama de galerias API disponíveis para o trabalho (API 20 E, API 20 NE, API 20 Strep e API Staph), foi selecionada a galeria API mais indicada para cada isolado de acordo com BioMérieux (2015), estando os fluxogramas orientadores apresentados no Anexo 3 (Figura A3.1). Como para os bacilos Gram positivos não se dispunha de nenhuma galeria adequada, não se procedeu à identificação API deste grupo de isolados. A inoculação e a leitura da galeria foram realizadas de acordo com o manual do fornecedor (*BioMérieux*, Portugal). A interpretação dos resultados foi conseguida através da introdução do código obtido na leitura da galeria na ferramenta *apiweb*TM (*BioMérieux*), sendo devolvidos alguns parâmetros como espécies propostas e fiabilidade da identificação.

3.2.2.3 Testes da Catalase e da Oxidase

Para o teste da catalase, foi colocada uma gota de uma solução de peróxido de hidrogénio a 30% (*Merck*) numa lâmina de microscópio. Com uma ansa estéril, foi transferida e misturada nesta gota uma porção de uma colónia isolada. A formação de bolhas de gás indica a presença da enzima (resultado positivo) (Neuendorf et al., 2004).

Para o teste da oxidase foram usadas zaragatoas impregnadas com N-N-dimetil-p-fenilenodiamina (VWR). O ensaio foi realizado tendo em conta as recomendações do fornecedor. Um resultado positivo corresponde ao aparecimento, dentro de 20-30 segundos, de uma cor azul-roxa.

3.2.3 Identificação das estirpes isoladas - caracterização genotípica

A caracterização genotípica dos isolados selecionados (bactérias a expor ao herbicida glifosato) foi efetuada através da sequenciação do gene 16S rRNA. A extração do DNA, amplificação, purificação e sequenciação foram realizadas pelo IST - Instituto Superior Técnico de Lisboa.

A seleção dos isolados a expor ao glifosato foi feita tendo em conta os seguintes aspetos:

- Apresentar uma elevada capacidade de formação de biofilme, com agitação (160 rpm), por promover a formação de biofilmes mais compactos e estáveis (Liu & Tay, 2002).
- Apresentar alguns fatores de virulência e/ou resistência a alguns antibióticos

Assim sendo, foram selecionados para um estudo mais aprofundado, procedendo à exposição a um contaminante emergente, o glifosato, os seguintes isolados: *Rio.B*, *ETA.C*, *RP.bio.A*, *RP.ag.E*, *RVN.bio.A* e *RVN.ag.C*.

3.3 Condições de cultura e preparação das bactérias

As bactérias isoladas foram inoculadas em R2A *broth* (cultura *batch*) e incubadas *overnight* a $23 \pm 3^\circ\text{C}$, sob condições de agitação (160 rpm) num agitador orbital (*Sigma Aldrich*, IKA KS 130 basic). Seguiu-se a recolha das bactérias por centrifugação (*Eppendorf centrifuge* 5810R), durante 15 minutos, a 3777 g e ressuspensão em meio fresco (R2A *broth*), ajustando a densidade ótica a 610 nm ($\text{DO}_{610 \text{ nm}}$) para os valores pretendidos (Gomes et al., 2019b).

3.3.1 Curvas de crescimento em estado planctónico

Ajustou-se a densidade ótica, a 610 nm, das suspensões bacterianas, obtidas conforme referido no ponto 3.3, para um valor de 0.1. As curvas de crescimento foram obtidas, em microplaca de 96 poços (VWR; superfície tratada), através da monitorização da $\text{DO}_{610 \text{ nm}}$ ao longo do tempo, usando um leitor de microplacas (*SPECTROstar Nano*; *BMG Labtech*) (Hall et al., 2014). O ensaio foi realizado até se verificar que o estado estacionário foi atingido, com um limite máximo de 48h.

Considerando a fase exponencial da curva de crescimento, obteve-se a taxa específica de crescimento, μ , e a partir deste valor calculou-se o tempo de duplicação, t_d , para cada isolado, conforme descrito no Anexo 4.

3.4 Produção de fatores de virulência

3.4.1 Formação de biofilme

Os ensaios com biofilmes foram realizados de acordo com o teste de microplaca modificado, proposto por Stepanović et al. (2000). Resumidamente, para cada bactéria, encheram-se seis poços de uma placa de 96 poços estéril (VWR; superfície tratada), sob condições assépticas, com 200 µL de suspensão celular ($DO_{610\text{ nm}} = 0.2$), obtidas conforme referido no ponto 3.3. A formação de biofilme foi permitida pela incubação das placas, durante 24 h, a $23 \pm 3^\circ\text{C}$, avaliando-se a influência da agitação. Para tal, incubou-se uma placa sem agitação e outra com uma agitação elevada (160 rpm), num agitador orbital (*Sigma Aldrich*, IKA KS 130 basic). Os controlos negativos foram obtidos através da incubação de poços contendo apenas o meio R2A broth. A biomassa e a culturabilidade do biofilme foram quantificadas pela coloração com cristal violeta (CV) e pela contagem de unidades formadoras de colónias (UFC), respetivamente.

3.4.1.1 Quantificação da biomassa: coloração com CV

Para a quantificação da biomassa (Oh et al., 2007), cada poço foi esvaziado e lavado com 250 µL de solução de NaCl, de forma a remover todas as bactérias não aderentes ou fracamente aderidas. Seguidamente, 250 µL de etanol a 96% foram usados para fixar o biofilme, durante 15 minutos. As placas foram então esvaziadas e secas e as bactérias fixadas foram coradas com 200 µL de CV (*Merck*) a 1%, durante 5 minutos. O excesso de corante foi removido e seco. Finalmente, o corante ligado às células aderentes foi solubilizado com 200 µL de ácido acético glacial a 33% (v/v). Mediu-se a densidade ótica a 570 nm, usando um leitor de microplacas (*SPECTROstar Nano*; *BMG Labtech*).

De forma a comparar a capacidade de diferentes bactérias para formar biofilmes, recorreu-se à classificação de Stepanović et al. (2000). Esta baseia-se no valor de *cut-off* da densidade ótica (DOc), definido como três desvios-padrão acima da média de DO do controlo negativo. As bactérias foram então classificadas da seguinte forma: não produtora de biofilme (0): $DO \leq DOc$; fracamente produtora de biofilme (+): $DOc < DO \leq 2 \times DOc$; moderadamente produtora de biofilme (++) : $2 \times DOc < DO \leq 4 \times DOc$; fortemente produtora de biofilme (+++): $4 \times DOc < DO$.

3.4.1.2 Enumeração de bactérias cultiváveis: contagem de UFC

Para a avaliação da culturabilidade (Gomes et al., 2016), removeu-se o conteúdo de cada poço e lavou-se com 250 µL de solução de NaCl, com o intuito de remover todas as bactérias não aderentes ou fracamente aderidas. Os biofilmes foram raspados três vezes,

durante 1 minuto, com a adição de 200 µL de NaCl. Este passo permite a ressuspensão das células sésseis aderidas. Seguiram-se diluições em série (dez vezes), em solução de NaCl, que foram plaqueadas em R2A agar (*Biogerm*). As placas foram incubadas a $23 \pm 3^\circ\text{C}$ e as UFCs foram enumeradas após 24 h. Os resultados estão expressos como UFC por área de poço da microplaca (UFC/cm^2).

3.4.2 Mobilidade

Foram colocados 15 µL das suspensões bacterianas ($\text{DO}_{610\text{ nm}} = 0.2$), obtidas conforme referido no ponto 3.3, no centro de placas de Petri de 90 mm contendo 1% triptona (*Fisher Scientific*), 0.25% NaCl (*Merck*) e 0.3%, 0.7% ou 1.5% (w/v) agar (*Merck*) para a caracterização de diferentes tipos de mobilidade: *swimming/colony spreading*, *swarming* e *twitching*, respetivamente. As placas foram incubadas a $23 \pm 3^\circ\text{C}$. Após 24, 48 e 72 h, mediram-se os diâmetros (mm) dos halos de mobilidade (Gomes et al., 2019a). Realizaram-se triplicados para avaliar cada um dos tipos de mobilidade e para cada uma das bactérias em estudo.

3.4.3 Produção de Sideróforos, Proteases e Gelatinases

A avaliação da produção de sideróforos foi efetuada de acordo com Machuca & Milagres (2003); Schwyn & Neilands (1987); Shin et al. (2001). Para as proteases seguiu-se a metodologia descrita em Dogan & Boor (2003) e para as gelatinases em Lopes et al. (2006).

Resumidamente, a produção de sideróforos, proteases e gelatinases foi avaliada em placas de Petri de 90 mm contendo R2A agar com *chrome azurol S* (CAS) (composição no Anexo 2 - Tabela A2. 3, Tabela A2. 4 e Tabela A2. 5), *Plate Count Agar* (VWR) suplementado com 1% *skim milk powder* (*Merck*) e *gelatin* agar (composição no Anexo 2 - Tabela A2. 2), respetivamente. Foram colocados 10 µL das suspensões bacterianas ($\text{DO}_{610\text{ nm}} = 0.2$), obtidas conforme referido no ponto 3.3, nas respetivas placas de Petri (em três posições diferentes). As placas foram incubadas a $23 \pm 3^\circ\text{C}$, durante 48 horas para avaliação de produção de sideróforos e gelatinases, e 72 horas para a avaliação da produção de proteases.

Após incubação, os isolados produtores de sideróforos, apresentaram halos cor de laranja ou roxos e os produtores de proteases apresentaram halos transparentes. No caso da produção de gelatinases, após incubação, as placas foram inundadas com uma solução saturada de sulfato de amónio (2.84 mol/L), aparecendo um halo transparente em torno das células (precipitados de gelatina) nas estirpes produtoras deste fator de virulência.

3.5 Suscetibilidade a antibióticos

A suscetibilidade a antibióticos foi determinada através do método de difusão em disco, de acordo com as diretrizes do *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI) (CLSI, 2012). Em alguns casos, o crescimento das bactérias foi feito em *Mueller-Hinton* (MH) *Broth* (Merck), a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, durante 24 h, seguindo-se o ajuste da densidade do inóculo para 0.5 *McFarland* (absorvância a 625 nm de 0.08 a 0.13). Noutros casos, o crescimento foi feito em placas contendo MH agar, incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, durante 24 h, e foi efetuada uma diluição direta das colónias em solução salina, ajustando a densidade do inóculo para 0.5 *McFarland*. As suspensões bacterianas foram plaqueadas (com uma zaragatoa estéril) em placas de Petri de 90 mm contendo MH agar (Oxoid) e os discos, contendo os antibióticos, foram colocados com um dispensador adequado (*Liofilchem, Disc Dispenser 6*). Após incubação a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 h, foram registados e analisados os diâmetros (em mm) dos halos de inibição, de acordo com os intervalos de referência apresentados na Tabela A6. 2 e na Tabela A6. 3, no Anexo 6, baseados em CLSI (2015b, 2015a). Os antibióticos testados, bem como os conteúdos de cada disco (*Liofilchem*), encontram-se na Tabela 2. Nesta tabela, é ainda possível consultar quais os antibióticos testados contra as bactérias Gram positivas (total de 11 antibióticos) e as Gram negativas (total de 16 antibióticos).

Tabela 2. Lista de antibióticos testados e respetivo conteúdo dos discos.

Gram	Antibiótico	Conteúdo do disco (μg)
Positivo	Penicilina (P)	10 unidades
	Ceftarolina (CPT)	30
	Teicoplanina (TEC)	30
	Vancomicina (VA)	30
	Eritromicina (E)	15
	Rifampicina (RD)	5
	Quinupristina-dalfopristina (QDA)	15
	Linezolida (LNZ)	30
Negativo	Ticarcilina (TC)	75
	Ticarcilina-ácido clavulânico (TTC)	75/10
	Piperacilina-tazobactam (TZP)	100/10
	Ceftazidima (CAZ)	30
	Meropenem (MRP)	10
	Gentamicina (CN)	10
	Amicacina (AK)	30
	Netilmicina (NET)	30
	Azitromicina (AZM)	15
	Minociclina (MN)	30
	Gatifloxacina (GAT)	5
	Cinoxacina (CIN)	100
	Nitrofurantoína (F)	300
Positivo/Negativo	Tetraciclina (TE)	30
	Trimetoprim-sulfametoxazol (SXT)	1.25/23.75
	Cloranfenicol (C)	30

3.6 Exposição das bactérias a glifosato

Foram selecionados, de acordo com os critérios mencionados em 3.2.3, seis isolados (um de cada ponto de amostragem) para efetuar a exposição ao glifosato: *Rio.B*, *ETA.C*, *RP.bio.A*, *RP.ag.E*, *RVN.bio.A* e *RVN.ag.C*. A exposição das células, em estado planctónico, ao herbicida glifosato (*Roundup UltraMax*, Bayer) foi realizada segundo Wright et al. (2006). Resumidamente, 5 mL de cada cultura ($DO_{610\text{ nm}} = 0.25$) foram adicionados a matrizes contendo 30 mL de R2A *broth* suplementado com glifosato, obtendo-se uma concentração final do herbicida de 70 mg/L. Este valor corresponde a uma concentração cerca de 100 vezes superior às concentrações de glifosato tipicamente encontradas em águas, 0.10 a 0.70 mg/L (Peruzzo et al., 2008). Os matrizes foram incubados a $23 \pm 3^\circ\text{C}$ durante 72 horas (3 dias), sob condições de agitação, a 160 rpm, num agitador orbital (*Sigma Aldrich*, IKA KS 130 *basic*).

Como controlos, procedeu-se, tal como descrito acima, à inoculação de matrizes contendo R2A *broth*, para cada um dos isolados, sem a adição do glifosato.

As células expostas ao herbicida (ao fim de 72 horas), bem como as dos controlos, foram avaliadas quanto à capacidade de formação de biofilme, a 160 rpm, à mobilidade, à produção de sideróforos, proteases e gelatinases e quanto à suscetibilidade aos antibióticos, conforme descrito nos pontos 3.4 e 3.5, respetivamente. Obtiveram-se ainda as curvas de crescimento, conforme descrito em 3.3.1, para as células expostas e para as células do controlo.

3.7 Análise estatística

Os dados da quantificação e culturabilidade dos biofilmes, da mobilidade, da produção de sideróforos, proteases e gelatinases e dos antibiogramas foram analisados recorrendo à função ANOVA do Excel, assumindo uma distribuição normal dos mesmos. Tanto a média como o desvio padrão, dentro das amostras, foram calculados para todos os casos. Os cálculos estatísticos foram baseados num nível de confiança igual ou superior a 95% ($p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo).

Os dados das curvas de crescimento foram analisados recorrendo à função Regressão do Excel, assumindo um nível de confiança igual ou superior a 95%.

Para os biofilmes e curvas de crescimento, efetuaram-se 6 réplicas em cada ensaio. Para a mobilidade, produção de sideróforos, proteases e gelatinases e para os antibiogramas foram efetuados triplicados.

4 Resultados e Discussão

4.1 Caracterização dos microrganismos

Durante a realização dos isolamentos, foram efetuadas algumas observações, tendo em conta a morfologia das colónias em placas de R2A agar, no entanto, não foram obtidos dados complementares, nomeadamente identificações genótípicas e contagens de UFC/mL.

Foi observada uma maior diversidade de morfologia das colónias nas amostras de água natural (não tratada), captadas no Rio Douro, do que nas amostras de água tratada, captadas na ETA de Lever, Reservatório de Pedrouços (RP) e Reservatório de Vila Nova (RVN). Este aspeto era expectável, uma vez que um dos principais objetivos do tratamento realizado nas ETAs está relacionado com a diminuição da carga microbiana e, consequentemente, a diminuição da diversidade de microrganismos na água tratada, ainda que esta não seja estéril (Bitton, 2014; Gomes et al., 2020).

Por sua vez, nas amostras de água de ambos os reservatórios, comparando com a água captada na ETA, foi observada uma maior diversidade de morfologias de colónias, o que pode estar associado a problemas nos sistemas de distribuição de água, como a presença de biofilmes nas tubagens e/ou paredes dos reservatórios, e que, por fenómenos de desprendimento, libertam microrganismos para a água (Manuel et al., 2006; Waak et al., 2018). Para além disso, os reservatórios, tal como ilustrado no Anexo 1 (Figura A1. 2), recebem a água tratada proveniente da ETA e ainda água captada no rio, através de poços em profundidade. Apesar desta água ser analisada diariamente no laboratório da ETA de Lever, mediante os parâmetros exigidos na legislação nacional, e de não serem detetados problemas, a água do rio apresenta uma grande diversidade bacteriana, o que pode ser justificativo da maior diversidade de microrganismos observada nos reservatórios (Vaz-Moreira et al., 2014).

Comparando os dois reservatórios, aparentemente, o RVN evidenciou uma maior diversidade de colónias. Várias variáveis podem justificar esta diferença: (i) a água captada no rio, para cada reservatório, ser captada em locais distintos (qualidade microbiológica da água pode variar); (ii) o estado das tubagens entre a ETA e cada um dos reservatórios (presença de biofilmes, por exemplo); e (iii) os consumos da população abastecida por cada reservatório, que influenciam o tempo de residência da água e a propensão para formar biofilmes (Lautenschlager et al., 2010; Simões, 2013).

4.1.1 Caracterização Morfológica

Após observação visual das colónias e não havendo outras possibilidades mais adequadas (como, por exemplo, a identificação por sequenciação do gene 16S rRNA) foram selecionados os isolados a caracterizar, tendo em conta a diversidade e aparência das colónias e a existência de colónias isoladas. Foram caracterizados nove isolados provenientes do Rio Douro e seis isolados de cada um dos outros locais de amostragem (ETA de Lever, Reservatório de Pedrouços e Reservatório de Vila Nova). As características morfológicas e bioquímicas (catalase, oxidase e resultado da galeria API) dos isolados encontram-se na Tabela A3. 1, do Anexo 3.

Dos isolados provenientes do Rio Douro, a maioria (77.8%) apresentou uma cor vermelha na coloração de Gram - bactérias Gram negativas. De facto, as bactérias frequentemente encontradas em águas do rio são bactérias Gram negativas, pertencentes aos filos *Proteobacteria* e *Bacteroidetes* (Xia et al., 2014).

No caso das bactérias isoladas da água à saída da ETA de Lever, todas coraram de roxo, sendo consideradas bactérias Gram positivas. As bactérias Gram positivas, de acordo com Nie et al. (2016), por apresentarem uma parede celular mais espessa, podem possuir uma maior resistência aos oxidantes, como o cloro, utilizados nos processos de desinfecção, o que pode justificar a prevalência deste tipo de Gram nos isolados da ETA, que foram sujeitos ao cloro da desinfecção final. No entanto, outros autores discordam desta maior resistência ao cloro por parte de bactérias Gram positivas. Segundo Luo et al. (2021), a maioria das bactérias resistentes ao cloro tipicamente isoladas pelos investigadores são bactérias Gram negativas. Estas apresentam uma membrana externa, que funciona como uma barreira adicional, reduzindo a permeabilidade aos biocidas (Mosratö et al., 2003).

Já no RP, foram analisadas cinco bactérias isoladas a partir da água e uma resultante da colheita de biofilme. Destas, a maioria (cerca de 83%) corresponde a Gram positivo. Contrariamente, no RVN, prevaleceu o Gram negativo (cerca de 66%), tendo sido caracterizados 2 isolados provenientes do biofilme e 4 provenientes da água. Para além dos fatores anteriormente apresentados (o estado dos sistemas de distribuição da água e o facto de uma parte da água ser captada diretamente no rio), o aparecimento de bactérias Gram negativas nos reservatórios, não tendo sido detetada a sua presença nas amostras da ETA, pode ser explicado por um estado viável, mas não cultivável das células à saída da ETA. Durante o processo de tratamento as células foram expostas a vários fatores de stress, o que pode induzir o estado viável, mas não cultivável, fazendo com que não sejam detetadas em placas de agar. No entanto, estas podem tornar-se cultiváveis quando as células são colocadas num ambiente favorável (Leriche & Carpentier, 1995; Penterman et al., 2014; Singh et al., 1990).

4.1.2 Caracterização Bioquímica

Dos perfis analisados na ferramenta *apiweb*TM (BioMérieux), sete obtiveram uma classificação de identificação “Muito Boa” ou “Excelente” (Grupo A), quatro alcançaram uma classificação “Aceitável” ou “Boa” (Grupo B), sendo que as restantes oito obtiveram uma identificação “Incorreta” (Grupo C) ou um perfil considerado “Duvidoso” ou com “Fracas Discriminação” (Grupo D). Na Figura 14, podem ser consultadas, em percentagem, as classificações obtidas, tendo em conta os grupos atribuídos.

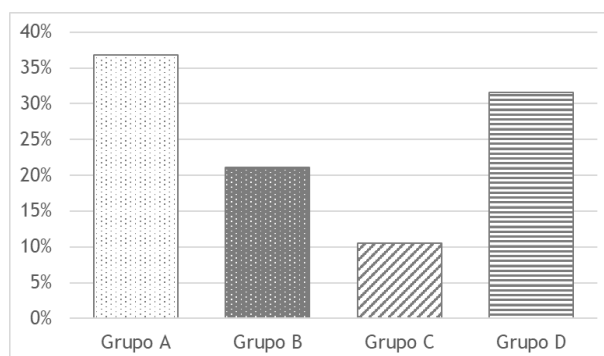


Figura 14. Identificação com recurso a galerias API: classificação das identificações obtidas. Grupo A - identificação “Muito Boa” ou “Excelente”; Grupo B - identificação “Aceitável” ou “Boa”; Grupo C - identificação “Incorreta”; e Grupo D - perfil “Duvidoso” ou com “Fracas Discriminação”.

De facto, verifica-se a prevalência de identificações com uma classificação de, no mínimo, “Aceitável” (cerca de 58%). No entanto, a fração de isolados para os quais a identificação atribuída é incorreta ou duvidosa (42%) é ainda considerável. Efetivamente, a identificação de microrganismos através de reações bioquímicas está frequentemente associada a alguns problemas, nomeadamente o facto de os testes serem interpretados de acordo com uma gama de referência, sendo esta interpretação dependente do observador (Ayling, 2000). Para além disso, nem todos os microrganismos que têm sido recentemente identificados através de tecnologias moleculares podem ser identificados através de testes bioquímicos (Janda & Abbott, 2002).

Para as classificações dos grupos A e B, obtiveram-se as seguintes identificações bioquímicas: *Pseudomonas fluorescens* (Rio), *Chryseobacterium indologenes* (Rio), *Micrococcus* spp. (RP), *Stenotrophomonas maltophilia* (RVN), *Myroides* spp. (Rio), *Staphylococcus xylosus* (ETA), *Moraxella* spp. (RVN), *Brevundimonas vesicularis* (RVN) e *Staphylococcus saprophyticus*/*Staphylococcus hominis* (ETA).

Destes microrganismos, destaca-se *Stenotrophomonas maltophilia*, por ser um microrganismo patogénico oportunista associado frequentemente a infeções nosocomiais, sendo a terceira bactéria Gram negativa não fermentativa mais comum em instalações de cuidados de saúde em todo o mundo (Brooke, 2012; Chung et al., 2012; Garcia et al., 2015; Gomes et al., 2016). *Chryseobacterium indologenes*, apesar de ser considerado um microrganismo patogénico pouco comum, tem surgido, ao longo dos anos, associado a

infecções em seres humanos com sistema imunitário comprometido, havendo um maior número de casos reportados (Izaguirre-Anariba & Sivapalan, 2020). *Staphylococcus xylosus* é considerada uma espécie não patogénica, no entanto, uma minoria das estirpes pode ser potencialmente perigosa por causar infeções oportunistas (Dordet-Frisoni et al., 2007). Das outras espécies do género *Staphylococcus* propostas como possível identificação para um dos isolados, *S. saprophyticus* é considerado um microrganismo uropatogénico, enquanto *S. hominis* é reconhecido como um potencial microrganismo patogénico oportunista (Ehlers & Merrill, 2021; Szczuka et al., 2018). *Brevundimonas vesicularis* e *Pseudomonas fluorescens* são consideradas bactérias de pequena relevância clínica por serem pouco virulentas (Ryan & Pembroke, 2018; Scales et al., 2014). No caso das identificações obtidas ao nível do género, *Micrococcus* spp. e *Myroides* spp., apenas algumas espécies (uma minoria) são consideradas como bactérias oportunistas (Meyer et al., 2019; Nuñez, 2014).

Destas bactérias classificadas com, no mínimo, uma identificação “Aceitável”, 33% pertencem ao filo *Proteobacteria* (prevalencendo a classe *Gamma-Proteobacteria*), 33% ao filo *Bacteroidetes*, 17% ao filo *Firmicutes* e 17% ao filo *Actinobacteria*, correspondendo estes aos filos frequentemente encontrados na água, tal como referido anteriormente (Vaz-Moreira et al., 2014; Wingender & Flemming, 2011; Zhu et al., 2020).

Nos casos em que foram obtidas classificações dos grupos C e D, a ferramenta *apiweb*TM (BioMérieux) apresentou, como possibilidades, as seguintes identificações bioquímicas: *Ralstonia pickettii* (RVN - biofilme), *Staphylococcus lentus* (Rio, ETA e RP- biofilme), *Sphingomonas paucimobilis* (RVN), *Pseudomonas oryzihabitans* (Rio) e *Weeksella virosa*/*Empedobacter brevis* (Rio).

Destes microrganismos, destacam-se *Ralstonia pickettii* e *Sphingomonas paucimobilis* por serem microrganismos patogénicos oportunistas, sendo *R. pickettii* considerada a espécie clinicamente mais relevante do género *Ralstonia* (Nasir et al., 2019; Ryan & Adley, 2010). *Staphylococcus lentus* é raramente reportado como um microrganismo patogénico nos humanos, no entanto, apresenta a capacidade de adquirir resistência a antibióticos (Mazal & Sieger, 2010; Schwendener & Perreten, 2012). Já os microrganismos *Weeksella virosa*, *Empedobacter brevis* e *Pseudomonas oryzihabitans* são raramente associadas a infeções no ser humano (Decker et al., 1991; Sharma et al., 2016; Slenker et al., 2012).

Alguns estudos têm identificado problemas na identificação através de galerias API, sendo que a sensibilidade destes *kits* é altamente variável de acordo com as espécies em causa, bem como o tipo de isolado (clínico ou ambiental) a avaliar (Amornchai et al., 2007; Croci et al., 2007; Kulwichit et al., 2007; Martinez-Urtaza et al., 2006; Sampimon et al., 2009). Tipicamente, a identificação com base na interpretação das galerias API requer a realização de testes adicionais e um dos principais problemas está relacionado com o facto de as bases de dados serem limitadas (Bosshard et al., 2006; Robinson et al., 1995).

4.1.3 Caraterização Genotípica

Das bactérias identificadas através da sequenciação do gene 16S rRNA, obtiveram-se os resultados apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Resultados das caraterizações genotípicas e bioquímicas.

Isolado	Identificação Genotípica	Identificação API
Rio.B	<i>Bacillus megaterium</i>	Não realizada
ETA.C	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus lentus</i>
RP.bio.A	<i>Micrococcus sedentarius</i>	<i>Staphylococcus lentus</i>
RP.ag.E	<i>Corynebacterium genitalium</i>	Não realizada
RVN.bio.A	<i>Corynebacterium genitalium</i>	Não realizada
RVN.ag.C	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>

Bacillus megaterium é uma bactéria Gram positiva, formadora de esporos que é encontrada em diversos habitats, mas é comumente considerada uma bactéria do solo. Apresenta elevado interesse industrial, sendo importante para a produção de enzimas, vitaminas e fármacos, e mais recentemente também para a produção de proteínas recombinantes. Esta bactéria é produtora de sideróforos (Goswami et al., 2018; Santos et al., 2014). *Staphylococcus epidermidis* é uma bactéria Gram positiva, não produtora de coagulase, que, apesar de ser considerada um microrganismo comensal da pele do ser humano, é atualmente uma das causas mais frequentes de infeções nosocomiais. Adquire assim elevada relevância clínica, sendo vista como uma bactéria oportunista (Otto, 2009; Sabaté Brescó et al., 2017). *Micrococcus sedentarius* é uma bactéria Gram-positiva conhecida pela produção dos antibióticos monensinas A e B, bem como pelo facto de ser um microrganismo patogénico oportunista, responsável por endocardite valvular, pneumonia hemorrágica e queratólise plantar (Pospíšil et al., 1998; Sims et al., 2009). *Corynebacterium genitalium*, uma bactéria Gram positiva tipicamente encontrada no trato urogenital masculino e feminino, apresenta cinco estirpes consideradas patogénicas e seis consideradas como não patogénicas (Evangelista et al., 1978). Tal como referido anteriormente, *Brevundimonas vesicularis* não apresenta grande relevância clínica.

Apenas para o isolado da ETA se verificou uma correspondência correta, mas apenas ao nível do género - *Staphylococcus*, entre os dois sistemas de caraterização (genotípica e bioquímica). Nos outros casos (RP.bio.A e RVN.ag.C), não se verificou uma correspondência entre as caraterizações. De facto, a identificação bioquímica parece falhar sem a realização dos testes complementares necessários. No entanto, estes casos não são representativos de todos os testes API realizados. Seria necessário um maior número de identificações por genotípicas para poder concluir acerca da fiabilidade destes kits API para a obtenção de uma identificação (ainda que bioquímica) da bactéria em questão.

4.2 Crescimento em estado planctónico

Para avaliar o crescimento dos diferentes isolados, obtiveram-se as curvas de crescimento, apresentadas na Figura 15, e calcularam-se os tempos de duplicação (t_d), conforme descrito no Anexo 4, presentes na Tabela 4.

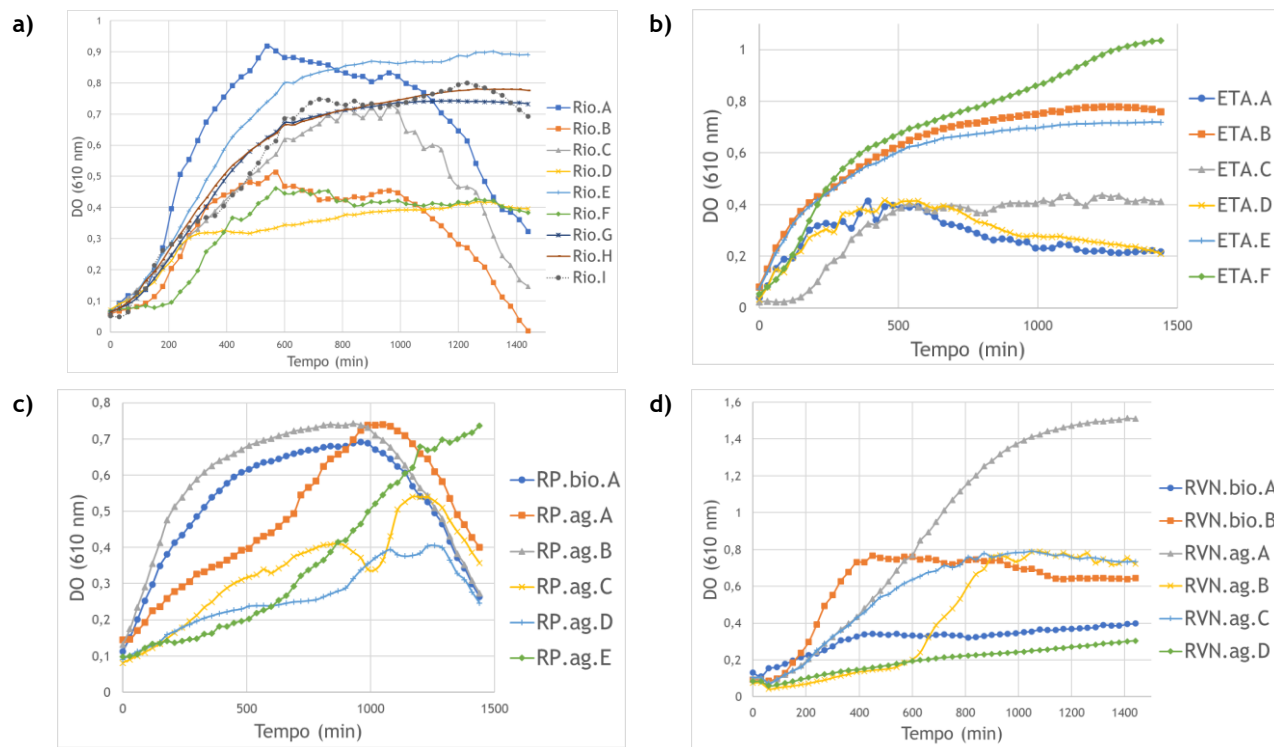


Figura 15. Curvas de crescimento obtidas pela representação da DO (610 nm) vs tempo (min) para os isolados do Rio Douro (a), da ETA de Lever (b), do Reservatório de Pedrouços (c) e do Reservatório de Vila Nova (c).

Tabela 4. Tempos de duplicação, em horas, obtidos para os isolados das diferentes fontes de água.

	t_d (h)		t_d (h)		t_d (h)		t_d (h)
Rio.A	1.2 ± 0.1	ETA.A	4.4 ± 0.6	RP.bio.A	2.5 ± 0.3	RVN.bio.A	5.3 ± 0.2
Rio.B	1.6 ± 0.08	ETA.B	5.4 ± 0.5	RP.ag.A	8.8 ± 0.2	RVN.bio.B	1.4 ± 0.08
Rio.C	3.4 ± 0.2	ETA.C	2.1 ± 0.2	RP.ag.B	2.2 ± 0.2	RVN.ag.A	4.4 ± 0.2
Rio.D	2.1 ± 0.04	ETA.D	3.4 ± 0.3	RP.ag.C	4.3 ± 0.2	RVN.ag.B	3.4 ± 0.09
Rio.E	2.33 ± 0.09	ETA.E	7.9 ± 0.5	RP.ag.D	6.9 ± 0.5	RVN.ag.C	3.3 ± 0.2
Rio.F	1.8 ± 0.1	ETA.F	2.4 ± 0.2	RP.ag.E	6.5 ± 0.08	RVN.ag.D	19 ± 0.7
Rio.G	2.1 ± 0.1			Média RP.bio	2.5	Média RVN.bio	3.4
Rio.H	1.8 ± 0.09	Média	4.3	Média RP.ag	5.7	Média RVN.ag	7.55
Rio.I	5.8 ± 0.1						
Média	2.5						

As bactérias isoladas a partir da água tratada, tanto da ETA como dos dois reservatórios, apresentaram, em média, tempos de duplicação superiores (ETA≈4 h, RP≈6 h e RVN≈7 h) aos apresentados pelas bactérias isoladas a partir da água natural, colhida no Rio Douro, cuja média foi de 2.5 h, aproximadamente. Foi nos isolados do Rio Douro que surgiu o isolado com menor tempo de duplicação: 1.2 h para o isolado *Rio.A*. O tempo de duplicação mais elevado registou-se para um isolado da água do RVN: 19h para o isolado *RVN.ag.B*. De facto, as bactérias da água tratada foram expostas a condições ambientais adversas, nomeadamente ao cloro utilizado no processo de tratamento e nos sistemas de distribuição, o que leva a uma diminuição da taxa específica de crescimento, correspondente a um tempo de duplicação superior (Lin et al., 2017).

Relativamente aos reservatórios, as bactérias isoladas do biofilme evidenciaram tempos de duplicação inferiores (RP≈2.5 h e RVN≈3.4 h) aos das bactérias isoladas a partir da água (RP≈5.7 h e RVN≈7.4 h). Uma possível justificação está relacionada com o facto de as bactérias no biofilme estarem numa estrutura que confere um ambiente protegido, pela baixa penetração de agentes antimicrobianos, possibilitando uma maior proteção contra o residual de cloro presente nos sistemas de distribuição de água (Tsvetanova, 2020).

Os crescimentos mais lentos podem ainda estar associados a uma estratégia das bactérias para sobreviverem em meios oligotróficos, isto é, com baixos níveis de nutrientes (Gray et al., 2019).

4.3 Produção de fatores de virulência

4.3.1 Capacidade de formação de biofilmes

Na Figura 16, pode ser consultada a distribuição de classificações, de acordo com a classificação de Stepanović et al. (2000), para cada local de amostragem e para as diferentes condições de formação de biofilme avaliadas (0 e 160 rpm).

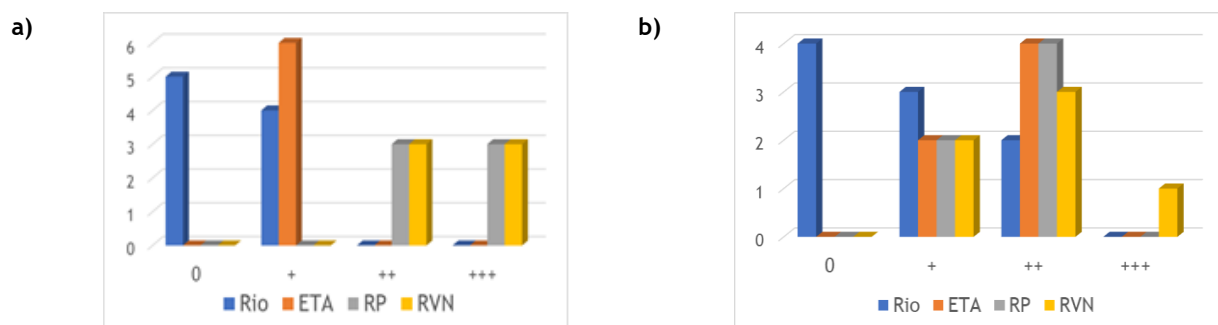


Figura 16. Classificação de Stepanović et al. (2000) dos isolados quanto à capacidade de formação de biofilmes, sem agitação (a) ou com agitação de 160 rpm (b). Número de isolados não produtores (0), fracamente produtores (+), moderadamente produtores (++) ou fortemente produtores (+++) de biofilme.

Os isolados do rio foram os que apresentaram classificações mais baixas (0 e +), de acordo com a classificação de Stepanović et al. (2000), para 0 e 160 rpm. Os isolados obtidos a partir de água tratada (ETA, RP e RVN) classificaram-se, na sua maioria, como bactérias moderadamente ou fortemente produtoras de biofilme. Isto pode ser justificado pelo facto de as bactérias da água tratada serem bactérias que foram expostas a cloro, numa concentração subletal, apresentando, portanto, uma resposta defensiva contra este fator de stress através da formação de biofilme (Shemesh et al., 2010).

Na Tabela 5, encontram-se listados os isolados que obtiveram uma classificação de moderadamente ou fortemente produtores de biofilme.

Tabela 5. Isolados classificados como moderadamente ou fortemente produtores de biofilme, de acordo com a classificação de Stepanović et al. (2000).

	0 rpm	160 rpm
Isolados moderadamente produtores de biofilme (++)	<i>RP.bio.A; RP.ag.A; RP.ag.C; RVN.ag.B; RVN.ag.C e RVN.ag.D</i>	<i>Rio.B; Rio.C; ETA.B; ETA.C; ETA.E e ETA.F; RP.ag.A; RP.ag.B; RP.ag.D; RP.ag.E; RVN.bio.A; RVN.ag.C e RVN.ag.D</i>
Isolados fortemente produtores de biofilme (+++)	<i>RP.ag.B; RP.ag.D; RP.ag.E; RVN.bio.A; RVN.bio.B e RVN.ag.A</i>	<i>RVN.ag.A</i>

Na Tabela 6, encontram-se os valores para cada local (Rio, ETA, RP e RVN) e tipo (água ou biofilme) de amostragem, em média, obtidos para a $DO_{570\text{ nm}}$ e para o logaritmo das UFC/cm².

Tabela 6. Valores médios, por local e tipo de amostragem, da quantificação da biomassa e da culturabilidade dos biofilmes formados.

	Biofilme (0 rpm)		Biofilme (160 rpm)	
	CV ($DO_{570\text{ nm}}$)	$\log_{10}$ (UFC/cm ²)	CV ($DO_{570\text{ nm}}$)	$\log_{10}$ (UFC/cm ²)
Rio Douro	0.77	6.26	1.01	6.79
ETA de Lever	1.36	6.34	2.27	6.15
RP Biofilme	1.30	8.42	1.33	7.69
RP Água	2.23	7.15	1.81	6.97
RVN Biofilme	2.63	5.04	1.48	4.64
RVN Água	1.96	4.70	1.75	5.38

O método da coloração do biofilme com CV reflete a quantidade total de biofilme, isto é, as células sésseis (que podem ser cultiváveis ou não), células mortas e a matriz de SPEs (Di Bonaventura et al., 2004). Assim sendo, um maior valor de DO nesta metodologia não corresponde necessariamente a um biofilme com maior número de células, mas pode corresponder a um biofilme com uma maior complexidade. Por sua vez, a culturabilidade do biofilme contabiliza apenas as células cultiváveis, ainda que estas possam estar com uma atividade metabólica baixa (Zago et al., 2015).

Analisando os resultados obtidos para as duas condições hidrodinâmicas criadas (estagnação - 0 rpm e água com movimentação - 160 rpm), verificou-se que os isolados obtidos a partir da água do Rio Douro, bem como da ETA de Lever, apresentaram um menor número de bactérias classificadas como não produtoras ou fracamente produtoras de biofilme e maior número de bactérias moderadamente produtoras, para o ensaio realizado com agitação. Por sua vez, os isolados dos dois reservatórios (água e biofilme) obtiveram um maior número de isolados moderadamente ou fortemente produtores de biofilme para 0 rpm. Era esperado que as diferentes condições hidrodinâmicas influenciassem a formação de biofilme, quer pela variação na transferência de nutrientes e oxigénio, quer pela variação das tensões de corte que podem modular a adesão das células à superfície (Gomes et al., 2014). Uma maior agitação favorece uma maior transferência de massa externa, isto é, mais nutrientes atingem a superfície do biofilme. Por outro lado, uma menor agitação relaciona-se com menores tensões de corte, o que pode facilitar a adesão celular. No entanto, seria de esperar que a maior agitação promovesse uma maior capacidade de formação de biofilme, uma vez que há evidências de que o acesso aos nutrientes controla o desenvolvimento destas estruturas (Moreira et al., 2013). Porém, os resultados obtidos permitem colocar a hipótese de que as diferentes condições hidrodinâmicas podem influenciar a capacidade de formação de biofilme pela semelhança entre as condições simuladas em laboratório e as condições hidrodinâmicas do local a partir do qual as bactérias foram isoladas. De facto, a água dos reservatórios está tipicamente sujeita a estagnação (correspondente ao cenário criado sem o recurso à agitação), contrariamente à água do rio e da ETA (Prest et al., 2021).

Ao nível da influência das condições hidrodinâmicas na culturabilidade do biofilme, não foi observada nenhuma relação para os isolados estudados, embora se saiba, tal como referido anteriormente, que uma maior agitação, pelas maiores tensões de corte exercidas, pode provocar o desprendimento de células do biofilme, diminuindo consequentemente a culturabilidade. De facto, na maioria dos casos, obteve-se valores de culturabilidade inferiores para os biofilmes formados com agitação, no entanto, a biomassa total variou de formas distintas, pelo que não é possível inferir se a diminuição da culturabilidade está relacionada com fenómenos de desprendimento ou com a menor capacidade de produção de biofilme.

Os biofilmes dos isolados da ETA (para 160 rpm) e do RVN (para as duas condições estudadas) apresentaram, uma maior biomassa do biofilme e uma menor culturabilidade do mesmo, em comparação com os biofilmes formados pelos isolados do Rio Douro. Isto pode ser justificado pelo facto de as células, por terem sido expostas ao cloro, se encontrarem num estado viável, mas não cultivável (Penterman et al., 2014). No caso dos isolados da ETA (0 rpm) e do RP (para as duas condições estudadas), os valores de culturabilidade são superiores aos dos biofilmes formados com os isolados do Rio, no entanto, também se verifica uma maior

quantidade de biomassa, pelo que o facto de existirem mais células cultiváveis pode ter a ver com a maior capacidade de formação de biofilme e não com o facto de as células não terem sido afetadas pela exposição ao cloro.

Comparando os isolados obtidos a partir do biofilme com os isolados obtidos a partir da água dos reservatórios, verificou-se a formação de biofilmes com menos biomassa para os primeiros. Estes dados contrariam o reportado num estudo de Teh et al. (2016), onde as células que cresceram anteriormente em culturas sésseis apresentaram, geralmente, uma maior habilidade para formar biofilme.

Um aspeto que deve ter-se em conta e que pode explicar os resultados incoerentes e contraditórios, em relação ao que é reportado na literatura, é o facto de, para cada local de amostragem e tipo de amostragem (água ou biofilme), se ter efetuado uma média dos valores, não tendo em conta as diferentes espécies bacterianas que possam estar envolvidas. De facto, a capacidade de formar biofilme varia de acordo com a espécie, uma vez que espécies diferentes apresentam genes associados à formação de biofilme diferentes (Hancock et al., 2011; Wagner et al., 2021).

Pelas incoerências acima verificadas, que não permitem estabelecer um padrão de comportamento que permita relacionar as condições hidrodinâmicas com a quantidade de biomassa e culturabilidade dos biofilmes formados, daqui em diante, sempre que se falar na formação de biofilmes esta estará relacionada com a formação de biofilme sob condições de agitação (160 rpm). Optou-se pelos 160 rpm pelo facto de, nestas condições, existirem tensões de corte, o que parece induzir a formação de biofilmes com uma estrutura mais compacta e estável, conforme referido no Capítulo 3 (Liu & Tay, 2002). No entanto, mais estudos seriam necessários para compreender a influência da agitação na capacidade de formação de biofilmes, podendo, por exemplo, ser avaliada uma agitação intermédia.

4.3.2 Proteases, gelatinases e sideróforos

Na Tabela 7, podem ser observados os resultados relativos à expressão de proteases, gelatinases e sideróforos nos isolados dos reservatórios. Já na Tabela 8, encontram-se os resultados obtidos para os isolados do Rio Douro e da ETA.

Tabela 7. Produção de proteases, gelatinases e sideróforos pelos isolados dos reservatórios

	Proteases	Gelatinases	Sideróforos		Proteases	Gelatinases	Sideróforos
<i>RP.bio.A</i>	+	+	-	<i>RVN.bio.A</i>	-	-	n.d.
<i>RP.ag.A</i>	+	n.d.	n.d.	<i>RVN.bio.B</i>	-	-	+
<i>RP.ag.B</i>	+	+	-	<i>RVN.ag.A</i>	+	+	n.d.
<i>RP.ag.C</i>	+	-	n.d.	<i>RVN.ag.B</i>	-	-	-
<i>RP.ag.D</i>	-	-	n.d.	<i>RVN.ag.C</i>	+	+	-
<i>RP.ag.E</i>	-	-	n.d.	<i>RVN.ag.D</i>	-	-	n.d.

n.d. - não detetado (sem crescimento).

* halo cor de laranja.

Tabela 8. Produção de proteases, gelatinases e sideróforos pelos isolados do Rio Douro e da ETA de Lever.

	Proteases	Gelatinases	Sideróforos		Proteases	Gelatinases	Sideróforos
Rio.A	+	+	+*	ETA.A	-	+	n.d.
Rio.B	+	+	+*	ETA.B	+	+	+**
Rio.C	+	+	+*	ETA.C	-	+	n.d.
Rio.D	+	+	+*	ETA.D	+	+	n.d.
Rio.E	+	+	+*	ETA.E	-	+	+**
Rio.F	+	+	+*	ETA.F	-	-	n.d.
Rio.G	+	+	+*				
Rio.H	+	+	+*				
Rio.I	-	-	-				

n.d. - não detetado (sem crescimento).

* halo cor de laranja.

** halo roxo.

Não foi possível avaliar a produção de sideróforos em 11 isolados de água tratada dos 27 isolados de água natural e tratada em estudo, uma vez que estes não evidenciaram qualquer crescimento nas placas de CAS-agar. Pelo mesmo motivo, um isolado (*RP.ag.A*) não foi avaliado quanto à produção de gelatinases.

Dos isolados avaliados, 59% apresentou resultados positivos para a produção de proteases, 65% para a produção de gelatinases e 69% para a produção de sideróforos. Os isolados do Rio Douro evidenciaram uma grande expressão de FV, sendo que 89% dos isolados expressou os três FV em estudo. Por sua vez, nos isolados da água tratada (ETA, RP e RVN) houve uma menor expressão dos FV, sendo que, destes três, os isolados da ETA são os que evidenciam maior número de resultados positivos (64%). Estes resultados sugerem que a expressão dos FV é atenuada pela exposição ao cloro. Num estudo de Allen & Griffiths (2012), o efeito da exposição a oxidantes é dependente da fase de crescimento das células: para as células em fase estacionária, verifica-se pouco impacto na resposta ao stress e expressão de fatores de virulência, no entanto, as células em fase logarítmica são mais sensíveis ao stress oxidativo, o que impacta na expressão de genes de virulência.

Dos isolados produtores de sideróforos, a maioria (9 em 16) formou um halo cor de laranja, sendo que os restantes isolados, os provenientes da ETA, evidenciaram halos roxos. As diferentes cores de halos estão relacionadas com a produção de diferentes tipos de sideróforos. A formação do halo cor de laranja corresponde à expressão de sideróforos contendo hidroxamatos, enquanto o halo roxo corresponde aos sideróforos com catecóis (Pérez-Miranda et al., 2007). Diferentes microrganismos expressam diferentes tipos de sideróforos, podendo a mesma bactéria sintetizar mais do que um tipo de agente quelante de ferro (Ferreira et al., 2019).

A nível coletivo (tendo em conta os locais de amostragem e não os isolados de forma individual), os isolados que evidenciaram uma maior expressão dos FV, foram aqueles que

apresentaram uma menor capacidade de formação de biofilme: os isolados do Rio Douro e, portanto, os isolados que não foram expostos ao cloro. Dentro dos isolados que foram expostos ao cloro, uma maior percentagem de resultados positivos nos FV, relacionou-se com a maior capacidade de formação de biofilme. Estes resultados obtidos para os isolados da água tratada vão de encontro ao que seria esperado, já que efetivamente muitos FV estão envolvidos na patogenicidade dos microrganismos, contribuindo para a sua capacidade de formação de biofilmes (Stępień-Pyśniak et al., 2019; Vysakh et al., 2018).

4.3.3 Mobilidade

Considerou-se que um isolado apresentou um determinado tipo de mobilidade quando, para a concentração de agar em estudo, se verificou que o diâmetro do halo era significativamente superior ($p < 0.05$) ao diâmetro da gota inicialmente plaqueada. Os valores obtidos para os diâmetros dos halos, encontram-se no Anexo 5 (Tabela A5. 2 e Tabela A5. 3). Os resultados obtidos para os isolados do Rio Douro e da ETA encontram-se na Tabela 9, enquanto os resultados relativos aos isolados dos reservatórios se encontram na Tabela 10.

Tabela 9. Mobilidade dos isolados do Rio Douro e da ETA de Lever.

	Swimming	Swarming	Twitching
Rio.A	+	+	+
Rio.B	+	+	-
Rio.C	+	+	+
Rio.D	+	+	+
Rio.E	+	+	-
Rio.F	+	+	+
Rio.G	-	-	-
Rio.H	+	+	-
Rio.I	-	+	-

	Swimming	Swarming	Twitching
ETA.A	+	+	+
ETA.B	+	+	+
ETA.C	+	-	-
ETA.D	+	+	-
ETA.E	+	+	-
ETA.F	-	-	-

Tabela 10. Mobilidade dos isolados dos reservatórios.

	Swimming	Swarming	Twitching
RP.bio.A	+	-	-
RP.ag.A	-	-	-
RP.ag.B	-	-	-
RP.ag.C	+	-	-
RP.ag.D	+	+	-
RP.ag.E	+	-	-

	Swimming	Swarming	Twitching
RVN.bio.A	-	-	-
RVN.bio.B	+	-	-
RVN.ag.A	-	-	-
RVN.ag.B	+	-	-
RVN.ag.C	+	+	+
RVN.ag.D	-	-	-

Os isolados do Rio Douro e da ETA de Lever foram os que evidenciaram maior número de isolados móveis, sendo que uma grande parte destes isolados (40%) apresentou os 3 tipos de mobilidade em estudo: *swimming*, *swarming* e *twitching*. Os isolados do Rio evidenciaram

uma menor percentagem de isolados não móveis (11%), comparativamente aos isolados da ETA (17%).

Quanto aos isolados do RP e do RVN, 33% e 50%, respetivamente, não mostraram qualquer tipo de mobilidade, sendo que os isolados móveis não apresentaram grande variedade nos tipos de mobilidade que expressaram. A maioria dos isolados evidenciou possuir uma mobilidade do tipo *swimming*, apenas dois isolados (*RP.ag.D* e *RVN.ag.C*) apresentaram mobilidade do tipo *swarming* e um registou o tipo de mobilidade *twitching* (*RVN.ag.C*).

Os microrganismos são capazes de sentir alterações ambientais e conseguem adaptar-se a condições de stress. No entanto, a exposição ao cloro pode desencadear diferentes respostas, dependendo da concentração deste agente oxidante e dos microrganismos estudados. Num estudo, mostrou-se que concentrações mais elevadas de cloro (>1.0 mg/L) provocam uma diminuição da mobilidade, enquanto baixos níveis do desinfetante (0.0 - 1.0 mg/L) aumentam a mobilidade, comparativamente às células não expostas (Liu et al., 2015). Noutro estudo, mostrou-se que o cloro pode ter impacto na mobilidade das bactérias dependendo do microrganismo, uma vez que bactérias diferentes apresentaram resultados distintos no que diz respeito aos efeitos de um desinfetante na mobilidade (Gomes et al., 2016). A partir dos resultados obtidos, pode verificar-se que os isolados expostos ao cloro (ETA, RP e RVN) apresentaram menor mobilidade do que os isolados da água natural (Rio), o que vai de encontro ao reportado na bibliografia já que estes isolados foram expostos a elevadas concentrações de cloro (acima de 1.0 mg/L à saída da ETA e nos reservatórios).

A mobilidade relaciona-se com a capacidade de formação de biofilme na medida em que permite que as forças eletrostáticas repulsivas entre as células e as superfícies sejam superadas. Assim, uma maior mobilidade representa uma vantagem para a colonização de uma superfície e, conseqüente formação de biofilmes (Simões et al., 2007). Os resultados obtidos para os isolados da ETA corroboram esta informação, já que foram isolados que apresentaram elevada mobilidade e uma grande capacidade para formar biofilmes. No entanto, de acordo com Guttenplan & Kearns (2013), a mobilidade é tipicamente inibida nos biofilmes maduros, pelo que os microrganismos que apresentam elevada mobilidade são frequentemente associados a menores capacidades de formação de biofilme. Efetivamente, as bactérias do Rio, que apresentaram baixas capacidades de formação de biofilme, foram dos isolados que evidenciaram maior mobilidade. Os resultados obtidos para os isolados dos reservatórios são também concordantes com este aspeto, uma vez que estes apresentaram uma maior capacidade de formação de biofilme do que os isolados do Rio, mas menor mobilidade. As diferentes relações entre estes dois FV podem ser explicadas pelo facto de os efeitos da mobilidade na formação de biofilmes serem dependentes das condições de cultura e variáveis de acordo com o microrganismo em causa, já que em alguns casos a mobilidade é importante, mas não necessária para a formação do biofilme (Houry et al., 2010).

4.4 Suscetibilidade a antibióticos

Foram avaliados oito isolados Gram negativos e 13 isolados Gram positivos contra 16 e 11 antibióticos, respetivamente. Os restantes seis isolados (*Rio.A*, *Rio.C*, *Rio.G*, *RVN.bio.A*, *RVN.ag.A* e *RVN.ag.B*) não apresentaram crescimento nas placas de *Mueller-Hinton* (MH) agar, pelo que não foi possível avaliar a sua suscetibilidade aos antibióticos em estudo. Isto pode justificar-se pelo facto de alguns microrganismos necessitarem de timina ou timidina para crescerem, sendo que o meio MH agar contém baixos níveis destas moléculas (Haltiner et al., 1980).

Os isolados foram classificados como suscetíveis (S), com resistência intermédia (I) ou resistentes (R), tendo em conta as tabelas apresentadas no Anexo 6.

Dos antibióticos testados contra as bactérias Gram negativas, verificou-se que para nove antibióticos (56%) todos os isolados foram classificados como suscetíveis ou com resistência intermédia. Estes antibióticos foram: (i) CN, TE, C, MN, NET e AZM, que atuam ao nível da inibição da síntese proteica (Asadi et al., 2020; Chopra & Roberts, 2001; Fitzgerald & Newquist, 2013; Kumar, 2017; Oong & Tadi, 2021; Parnham et al., 2014); (ii) TZP que inibe a síntese da parede celular (Viola et al., 2019); (iii) SXT que atua na via do ácido fólico (Kemnic & Coleman, 2021); e (iv) GAT, cujo mecanismo incide na inibição da replicação do DNA (Schultz, 2012). Já os antibióticos para os quais se verificaram isolados resistentes, cuja percentagem é apresentada na Figura 17-a), atuam ao nível da inibição: (i) da síntese da parede celular - TC, MRP, CAZ e TTC (Bethesda, 2020; Hayes & Orr, 1983; Weiner & Buhimschi, 2009, 2014); (ii) da síntese proteica - AK (Sizar et al., 2021); (iii) da síntese de DNA - CIN (Scavone et al., 1982); e (iv) da síntese de DNA, RNA e proteínas, em simultâneo - F (Waller & Sampson, 2018).

Os dados obtidos evidenciam que os antibióticos que atuam ao nível da síntese proteica são os mais eficazes contra as bactérias Gram negativas, enquanto a atuação ao nível da síntese da parede celular, de RNA e de DNA são mecanismos mais falíveis. De facto, a presença da membrana externa nas bactérias Gram negativas, é a principal razão para a resistência destes microrganismos a uma vasta gama de antibióticos, incluindo os β -lactâmicos que atuam ao nível da síntese da parede celular (Karaman et al., 2020).

No caso dos antibióticos testados contra as bactérias Gram positivas, apenas três (27%) foram eficazes contra todos os isolados: SXT, TE e C, cujos mecanismos de ação foram indicados acima. Os restantes antibióticos apresentaram percentagens elevadas (acima dos 40%, exceto RD que apresentou 38%) de isolados resistentes, conforme se pode verificar na Figura 17-b). Estes antibióticos atuam por: (i) inibição da síntese da parede celular - TEC, VA, P e CPT (Duplessis & Crum-Cianflone, 2011; Farzam et al., 2021; Yocum et al., 1980; Zeng et

al., 2016); (ii) inibição da síntese proteica - LNZ, QDA e E (Farzam et al., 2021; Manzella, 2001; Papich, 2016); e (iii) inibição da síntese de RNA - RD (Wehrli, 1983).

Os resultados não evidenciam que um determinado mecanismo de ação seja mais ou menos eficaz na atuação dos antibióticos testados contra as bactérias Gram positivas, embora se saiba que os mecanismos de resistência destes microrganismos estão essencialmente associados aos mecanismos de inibição da síntese da parede celular (degradação da enzima β -lactamase ou diminuição da afinidade para o seu alvo, a proteína de ligação à penicilina) (Karaman et al., 2020).

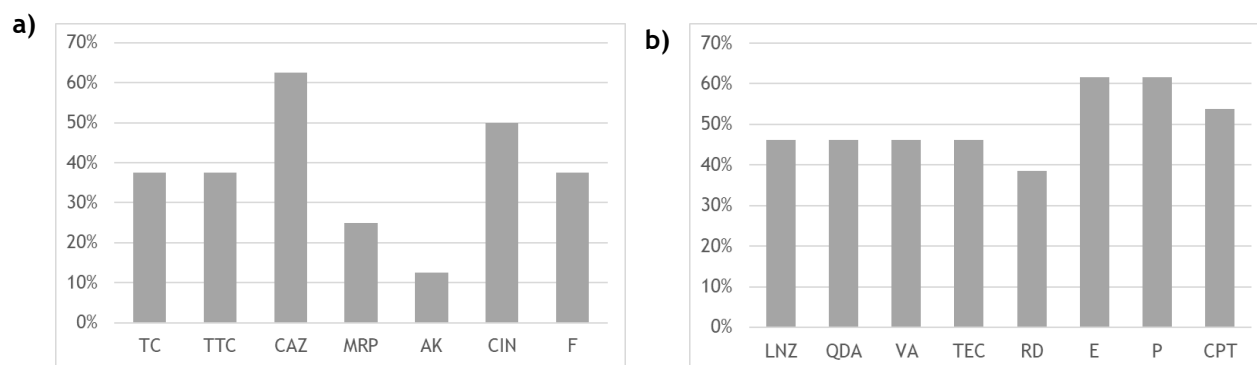


Figura 17. Percentagem, por antibiótico, de isolados Gram negativos (a) e Gram positivos (b) classificados como resistentes.

As bactérias Gram positivas evidenciaram uma maior quantidade de classificações de isolados como sendo resistentes a um determinado antibiótico (38%) do que as bactérias Gram negativas (13%). Tipicamente, as bactérias Gram negativas são consideradas mais difíceis de inativar através da ação dos antibióticos (Jones, 2017), no entanto, este trabalho contraria essa tendência, já que a suscetibilidade/resistência das bactérias é essencialmente dependente da especificidade entre a espécie em causa e os antibióticos testados e respetivos modos de ação (Wilson, 2011). De facto, independentemente do tipo de Gram que evidenciam, as bactérias desenvolvem mecanismos de resistência aos antibióticos, diminuindo as opções de tratamento. Os microrganismos patogénicos ESKAPE, um grupo que contém tanto bactérias Gram positivas como Gram negativas responsáveis pela maioria das infeções nosocomiais, nomeadamente *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Enterobacter* spp., evidenciam resistência contra diversos antibióticos, tais como oxazolidinonas, lipopeptídeos, macrólidos, fluoroquinolonas, tetraciclinas, β -lactâmicos, combinações de inibidores de β -lac/ β -lactamase e contra aqueles que constituem a última linha de defesa, carbapenémicos, glicopeptídeos e polimixinas (De Oliveira et al., 2020). Estes microrganismos patogénicos ESKAPE evidenciam diversos mecanismos de resistência, tais como a inativação/alteração do antibiótico, a modificação do local alvo do antibiótico, a redução da acumulação do antibiótico na célula bacteriana, por alterações na permeabilidade da membrana, e a formação de biofilmes (De Oliveira et al., 2020; Santajit & Indrawattana, 2016). A

compreensão destes mecanismos de resistência é fundamental para o desenvolvimento de novos fármacos ou de terapias alternativas, tais como bacteriófagos, péptidos antimicrobianos, nanopartículas e terapia fotodinâmica (Mulani et al., 2019; Navidinia et al., 2017). Para além dos microrganismos considerados no grupo ESKAPE, de acordo com Benkő et al. (2020), algumas publicações consideram que a letra “S” deve ser complementada com a bactéria *Stenotrophomonas maltophilia*, que tem surgido como um microrganismo patogénico oportunista de elevada relevância clínica.

Analisando as diferentes fontes de água estudadas, a percentagem de classificações dos isolados como resistentes foi superior para as bactérias provenientes da ETA de Lever e do RP, comparativamente com os isolados do Rio Douro e do RVN. Há evidências de que a desinfeção com o cloro promove a transmissão de bactérias resistentes, bem como de genes de resistência na água, por transformação genética (Jin et al., 2020). O facto de os isolados do RVN, fonte de água tratada, e do Rio Douro, água não sujeita a desinfeção, apresentarem percentagens semelhantes pode ser justificado pelo facto de apenas terem sido testados contra os antibióticos três isolados do RVN (pouca representatividade comparada com as restantes fontes). Em ambos os reservatórios, as bactérias isoladas a partir do biofilme foram das que apresentaram resistência a um maior número de antibióticos, o que pode ser justificado pelo facto de nos biofilmes ser promovida a transferência de genes de resistência a antibióticos entre diferentes bactérias (Bowler et al., 2020).

4.5 Efeitos da exposição ao herbicida glifosato

Os isolados que foram expostos ao glifosato foram: *Rio.B*, *ETA.C*, *RP.bio.A*, *RP.ag.E*, *RVN.bio.A* e *RVN.ag.C*. Escolheram-se estes isolados, uma vez que, para cada local de amostragem em causa, foram dos microrganismos que evidenciaram maior capacidade de formação de biofilme, com agitação. Para além disso, foram microrganismos que expressaram fatores de virulência e que apresentaram resistência para alguns dos antibióticos testados, apesar de não terem sido dos isolados mais virulentos ou mais resistentes, já que se pretendia uma situação intermédia, de forma a facilitar a compreensão das possíveis alterações provocadas pela exposição ao glifosato.

Na Figura 18, estão representadas as curvas de crescimento obtidas para os isolados expostos ao glifosato, bem como os controlos. Na Tabela 11, podem ser consultados os valores do tempo de duplicação e os valores relacionados com a capacidade de formação de biofilme: quantificação de biomassa ($DO_{570\text{ nm}}$) e culturabilidade ($\log_{10}(\text{UFC}/\text{cm}^2)$).

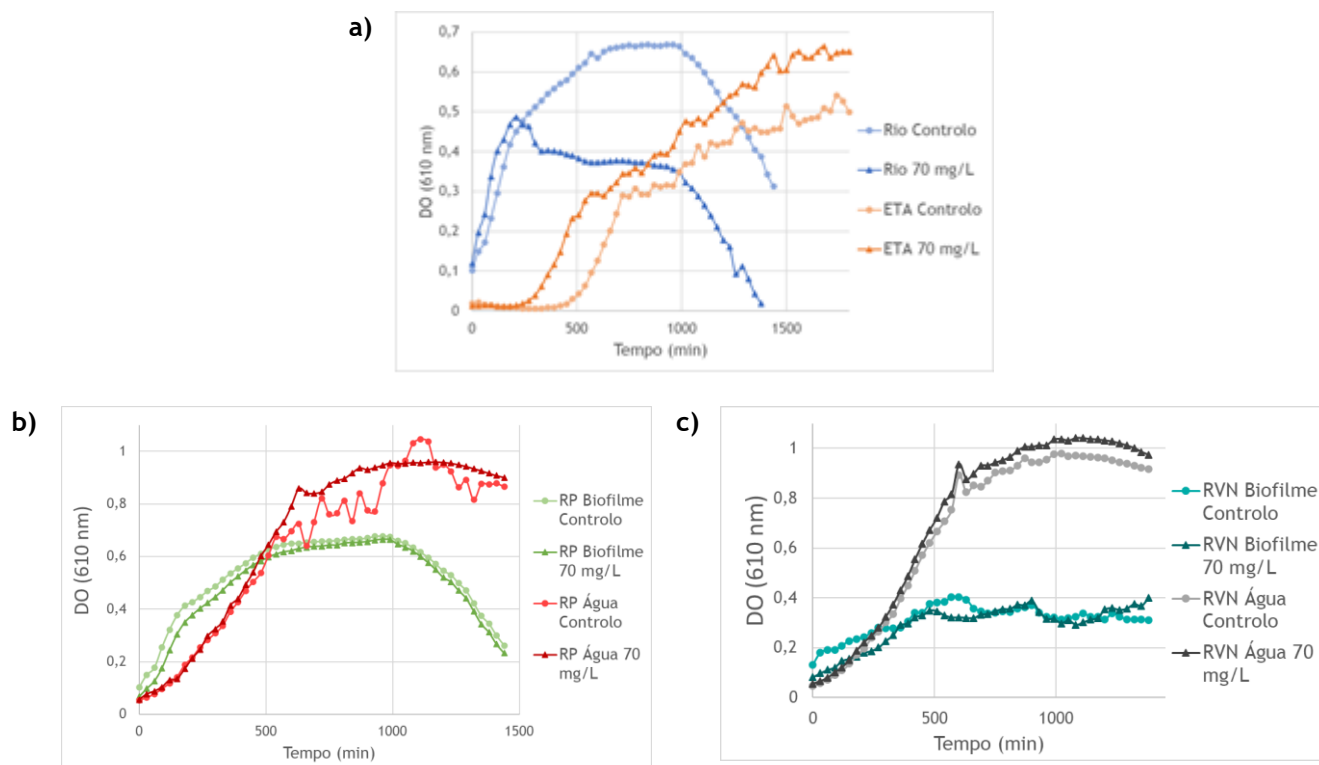


Figura 18. Curvas de crescimento obtidas pela representação da DO (610 nm) vs tempo (min) para os isolados do Rio Douro e da ETA de Lever (a), do Reservatório de Pedrouços (b) e do Reservatório de Vila Nova (c), para as células expostas ao glifosato e para as células do controlo.

Tabela 11. Efeitos da exposição ao glifosato nos tempos de duplicação e na quantidade de biomassa e culturabilidade dos biofilmes.

		t_d (h)	CV (DO _{570 nm})	$\log_{10}(\text{UFC}/\text{cm}^2)$
	Rio Douro	Controlo	1.8 ± 0.2	7.44 ± 0.02
		70 mg/L	1.4 ± 0.2	7.05 ± 0.06
	ETA de Lever	Controlo	0.95 ± 0.07	5.86 ± 0.04
		70 mg/L	1.3 ± 0.09	5.89 ± 0.04
RP	Biofilme	Controlo	2.4 ± 0.3	7.18 ± 0.00
		70 mg/L	1.8 ± 0.2	7.15 ± 0.07
	Água	Controlo	2.6 ± 0.1	7.91 ± 0.02
		70 mg/L	2.5 ± 0.1	8.32 ± 0.02
RVN	Biofilme	Controlo	4.8 ± 0.2	7.23 ± 0.08
		70 mg/L	4.1 ± 0.1	6.95 ± 0.02
	Água	Controlo	2.2 ± 0.08	8.00 ± 0.04
		70 mg/L	2.3 ± 0.08	7.62 ± 0.04

Com a exposição ao glifosato, não se verificaram alterações nas curvas de crescimento, o que é corroborado com os valores de tempo de duplicação que são semelhantes para os isolados expostos ao herbicida e os respetivos controlos. No entanto, seria esperado que a

exposição ao glifosato provocasse uma diminuição na taxa específica de crescimento das bactérias e, portanto, um maior tempo de duplicação (Busse et al., 2001).

Ao nível da capacidade para formar biofilme, a resposta à exposição ao glifosato foi variável, quer ao nível da quantidade de biomassa, quer ao nível da culturabilidade, independentemente do local ou tipo (água ou biofilme) de amostragem. O isolado *ETA.C* não evidenciou alterações significativas ($p>0.05$) nem na quantidade de biomassa nem na culturabilidade. As células expostas ao glifosato dos isolados *Rio.B* e *RVN.ag.C* apresentaram uma maior capacidade de formação de biofilme ($p<0.05$) e uma menor culturabilidade ($p<0.05$), o que pode ser explicado pelo facto de a exposição a um fator de stress promover a formação de biofilme e da matriz de SPEs (aumento da biomassa), mas simultaneamente poder induzir o estado viável, mas não cultivável das células (diminuição da culturabilidade), conforme referido anteriormente (Penterman et al., 2014). No caso dos isolados *RP.ag.E* e *RVN.bio.A*, a exposição ao glifosato não alterou a capacidade de formação de biofilme ($p>0.05$), mas verificaram-se um aumento e uma diminuição, respetivamente, da culturabilidade ($p<0.05$). O isolado *RP.bio.A* evidenciou uma menor quantidade de biomassa ($p<0.05$), porém, não ocorreram alterações significativas ao nível da culturabilidade ($p>0.05$).

Relativamente à expressão dos FV proteases, gelatinases e sideróforos (resultados no Anexo 7 - Tabela A7. 1), apenas se verificaram alterações significativas ($p<0.05$) para o isolado do Rio Douro. Ao nível da produção de proteases, esta aumentou com a exposição ao glifosato (células do controlo: 31 mm e células expostas: 36 mm). A exposição ao glifosato fez com que este isolado do Rio, que era produtor de sideróforos, não apresentasse crescimento em CAS-agar. De acordo com Martinez et al. (2018), vários estudos evidenciam que a virulência dos microrganismos pode ser aumentada após exposição a herbicidas, como o glifosato. No entanto, este aumento só se verificou para o isolado do Rio Douro, possivelmente porque, por ser um isolado de água não tratada, as células ainda não tinham sido expostas a fatores de stress, contrariamente aos isolados da água tratada (*ETA*, *RP* e *RVN*) que sofreram previamente uma exposição ao cloro, que podia já ter afetado a expressão de FV.

Quanto à mobilidade (resultados no Anexo 7 - Tabela A7. 2), os isolados do RVN (água e biofilme) não evidenciaram alterações significativas em nenhum tipo de mobilidade ($p>0.05$). Os isolados *Rio.B* e *ETA.C*, como resposta à exposição ao herbicida, apresentaram alterações nas mobilidades do tipo *swimming* e *swarming*. O isolado do Rio obteve halos com menor diâmetro ($p<0.05$) para as duas mobilidades, ao contrário do isolado da *ETA* que apresentou mobilidades superiores ($p<0.05$). Os isolados do RP (água e biofilme), após exposição ao glifosato, evidenciaram uma menor mobilidade do tipo *swimming* ($p<0.05$), sendo que o isolado do biofilme evidenciou ainda alterações na mobilidade do tipo *twitching*, apresentando um halo de diâmetro superior para as células expostas ($p<0.05$). Mais uma vez,

a resposta da mobilidade perante a exposição ao glifosato foi variável. Com estes resultados, e tal como já tinha sido referido anteriormente na influência que o cloro poderia exercer na mobilidade, os efeitos da exposição a um determinado composto neste FV parecem depender essencialmente do microrganismo em estudo.

Os resultados obtidos sugerem que os mecanismos associados à resposta perante a exposição a condições ambientais desfavoráveis, como a exposição ao glifosato, são essencialmente dependentes do microrganismo em estudo. De facto, sabe-se que a exposição ao glifosato faz com que as comunidades microbianas adquiram tolerância e desenvolvam a capacidade de transformação e/ou mineralização do herbicida (Rossi et al., 2021b). No entanto, um estudo mais detalhado, recorrendo ao mesmo microrganismo isolado a partir dos diferentes locais de amostragem, seria necessário para compreender se as respostas seriam variáveis apenas de acordo com o microrganismo em estudo ou se seriam dependentes das condições do local a partir do qual a bactéria foi isolada. Isto é, compreender se uma exposição prévia ao cloro afetaria na resposta à exposição ao glifosato.

Para avaliar possíveis alterações na resistência a antibióticos, após a exposição ao glifosato, foram testados vários antibióticos. Os isolados e respetivos antibióticos para os quais se obteve uma variação significativa do diâmetro dos halos de inibição ($p < 0.05$) encontram-se na Tabela 12. Os diâmetros obtidos para todos os halos de inibição do crescimento podem ser consultados no Anexo 7, na Tabela A7. 3.

Tabela 12. Antibióticos e isolados para os quais se verificam alterações significativas nos diâmetros dos halos após exposição ao glifosato.

	Diâmetro do halo <u>superior</u> após exposição a glifosato	Diâmetro do halo <u>inferior</u> após exposição a glifosato
Rio.B	LNZ; VA; TEC; E; P; CPT; TE; SXT e C	---
RP.ag.E	---	TE e SXT
RVN.ag.C	AZM	NET; TE e SXT

Não foi possível avaliar a suscetibilidade aos antibióticos do isolado *RVN.bio.A*, uma vez que este não evidenciou crescimento no meio de MH. Para os isolados *ETA.C* e *RP.bio.A* não se obtiveram alterações significativas ($p > 0.05$) para nenhum dos antibióticos em estudo.

No caso do isolado do Rio, verificou-se um aumento do diâmetro do halo de inibição para todos os antibióticos que obtiveram alterações com significância estatística. Assim sendo, a exposição ao glifosato, para este isolado, apenas tornou as células mais suscetíveis à ação dos antibióticos testados, embora se tenha mantido como resistente (de acordo com a classificação descrita no Anexo 6) aos antibióticos P e CPT.

Para o isolado *RP.ag.E*, verificou-se uma diminuição do halo para os antibióticos TE e SXT, no entanto, a bactéria, mesmo após a exposição, classifica-se como suscetível, porém

um aumento na concentração do herbicida ou até uma exposição mais prolongada a concentrações inferiores à que foi estudada pode tornar a bactéria resistente.

O isolado *RVN.ag.C*, com a exposição ao glifosato, tornou-se mais suscetível ao antibiótico AZM, mas verificou-se uma diminuição da suscetibilidade aos antibióticos NET, TE e SXT. Tal como referido anteriormente, estes casos suscitam especial preocupação, uma vez que uma variação na concentração e/ou tempo de exposição podem comprometer a eficácia destes antibióticos, tornando a bactéria resistente.

Assim, a exposição ao glifosato pode induzir diferentes respostas na resistência a alguns antibióticos, podendo tornar os isolados mais suscetíveis a uns antibióticos, ou mais resistentes a outros, ou até manter os níveis de resistência/suscetibilidade. Um estudo mais detalhado relativamente aos genes associados à resistência aos antibióticos seria necessário para compreender os mecanismos de sobrevivência ao glifosato e a resistência cruzada a determinados antibióticos.

De acordo com Liao et al. (2021), a exposição a herbicidas pode promover a resistência a antibióticos por ativação de genes de resistência. Por outro lado, uma exposição prolongada pode favorecer uma resistência cruzada, caso sejam necessárias as mesmas mutações para aumentar a tolerância tanto ao herbicida como ao antibiótico. É também possível que as mudanças adaptativas provoquem uma alteração da aptidão das bactérias para tolerar concentrações elevadas de um determinado antibiótico (Kurenbach et al., 2018).

Os resultados obtidos sugerem que diferentes microrganismos apresentam diferentes respostas à exposição ao glifosato também no que diz respeito à resistência aos antibióticos.

5 Conclusões

5.1 Principais conclusões

Este estudo permitiu compreender alguns aspetos relevantes no que diz respeito ao comportamento de bactérias isoladas da água (locais de captação, tratamento e armazenamento).

1. Por observação visual, verificou-se que a água sofre variações ao nível da diversidade de microrganismos desde o local onde é captada até aos reservatórios onde é armazenada.
 - a. Água natural (Rio Douro) apresentou maior diversidade de morfologia de colónias do que água tratada (ETA e reservatórios), o que comprova a eficácia do tratamento realizado na ETA de Lever. Por sua vez, a água dos reservatórios apresentou maior diversidade de morfologia de colónias do que a água da ETA, o que é indicativo da existência de biofilmes ao longo das tubagens e nas paredes dos reservatórios.
 - b. Cerca de 77.8% e 66% dos isolados do Rio e do RVN, respetivamente, foram bactérias Gram negativas, enquanto 100% e 83% dos isolados da ETA e do RP, respetivamente, foram bactérias Gram positivas.
2. Os microrganismos identificados foram, essencialmente, microrganismos tipicamente associados a ambientes aquáticos.
 - a. Com recurso a galerias API, os isolados identificados com, no mínimo, uma identificação “Aceitável” foram bactérias dos filos: *Proteobacteria* (33%), *Bacteroidetes* (33%), *Firmicutes* (17%) e *Actinobacteria* (17%). No entanto, uma grande parte dos testes API (42%) obtiveram isolados com identificação incorreta ou com um perfil duvidoso.
 - b. Por sequenciação do gene 16S do rRNA, foram identificados os microrganismos *Bacillus megaterium*, no Rio Douro, *Staphylococcus epidermidis*, na ETA, *Micrococcus sedentarius*, no biofilme do RP, *Corynebacterium genitalium*, na água do RP e no biofilme do RVN, e *Brevundimonas vesicularis*, na água do RVN.
3. As bactérias da água tratada (expostas ao cloro) evidenciaram um crescimento mais lento e uma maior capacidade de formação de biofilmes (tanto para 0 rpm como para 160 rpm) do que os isolados da água natural.
4. As condições hidrodinâmicas estudadas não influenciaram a capacidade de formação de biofilme dos isolados das diferentes fontes de água da mesma forma: os isolados do Rio e da ETA apresentaram maior capacidade de formação de biofilmes com agitação (160 rpm), ao contrário dos isolados dos reservatórios que evidenciaram maior capacidade de formação de biofilmes numa situação de estagnação (0 rpm).

5. A produção dos FV proteases, gelatinases e sideróforos e a mobilidade foram aparentemente atenuadas com a exposição ao cloro.
 - a. A nível global, 59% dos isolados foi produtor de proteases, 65% produziu gelatinases e 69% produziu sideróforos. A maioria (82%) dos isolados produtores de sideróforos produziram quelantes de ferro do tipo hidroxamatos.
 - b. As percentagens de isolados que não evidenciaram qualquer tipo de mobilidade foram: 11% para os isolados do Rio, 17% para os da ETA, 33% para os do RP e 50% para os do RVN. A maioria dos isolados evidenciou o tipo de mobilidade *swimming*, sendo que as mobilidades dos tipos *swarming* e *twitching* tiveram pouca expressão.
6. Diferentes relações entre os FV e a capacidade de formar biofilmes foram verificadas.
 - a. No caso dos isolados da água tratada, a maior expressão dos FV proteases, gelatinases e sideróforos relacionou-se com a maior capacidade de formação de biofilmes.
 - b. A mobilidade não se relacionou com a capacidade de formação de biofilmes da mesma forma para os isolados provenientes das diferentes fontes de água, sugerindo que esta relação é dependente, essencialmente, do microrganismo em causa.
7. Ao nível da resistência aos antibióticos, observou-se que a percentagem de microrganismos resistentes foi superior para os isolados da água tratada, comparativamente aos isolados da água natural, e os isolados do biofilme dos reservatórios apresentaram resistência a um maior número de antibióticos, quando comparados com os isolados da água dos reservatórios.
 - a. Cerca de 56% dos antibióticos testados contra as bactérias Gram negativas foi eficaz contra todos os isolados avaliados e os antibióticos que atuam ao nível da inibição da síntese da parede celular, do RNA e do DNA (TC, MRP, CAZ, TTC, AK, CIN e F) foram os mais falíveis (maior número de isolados resistentes).
 - b. Apenas 3 antibióticos dos testados contra as bactérias Gram positivas foram eficazes contra todos os isolados. Os restantes antibióticos apresentaram, pelo menos, 40% de isolados resistentes, não sendo, no entanto, associado um mecanismo de ação que seja mais ou menos eficaz.

Ao nível dos efeitos da exposição ao glifosato nos microrganismos, apenas se verificaram alterações ao nível da expressão de proteases e de sideróforos para o isolado do Rio Douro. A capacidade de formação de biofilmes e a mobilidade apresentaram resultados muito variáveis, dependendo do isolado. No caso da suscetibilidade a antibióticos, nos casos em que houve alterações significativas, os isolados tanto se tornaram mais suscetíveis como mais resistentes (dependendo do isolado e do antibiótico em causa).

De facto, este trabalho permitiu concluir que para além da grande diversidade de microrganismos que podem existir na água, os microrganismos apresentam características

muito distintas, havendo uma tendência para um crescimento mais lento, uma maior capacidade de formação de biofilmes e uma maior resistência a antibióticos das bactérias da água tratada, o que constitui uma forte preocupação para a saúde humana.

Adicionalmente, os estudos efetuados com a exposição de bactérias a um contaminante emergente permitem concluir que cada microrganismo apresenta uma resposta diferente ao nível da virulência e resistência, sugerindo que, no ambiente, uma infinidade de problemas imprevisíveis pode ocorrer pela vasta gama de combinações possíveis de contaminantes e microrganismos nos ambientes aquáticos.

5.2 Contribuições para a empresa

Com este trabalho, surgiram evidências da necessidade de repensar as metodologias de análise da água tratada tipicamente aplicadas em Portugal, baseadas essencialmente em métodos de cultivo.

Ainda relacionado com os métodos de cultivo, avaliou-se a possibilidade da aplicação das galerias API para identificação de microrganismos que surgem como colónias “não típicas” nos meios seletivos utilizados para avaliação dos parâmetros regulamentados. De facto, estas galerias geram alguma controvérsia, pela interpretação subjetiva (variável de acordo com o observador), requerem a realização de vários testes complementares e uma grande percentagem de resultados não obtém um bom perfil de identificação. Assim, torna-se necessário pensar noutras metodologias de identificação rápida das colónias, que possam corresponder às necessidades da empresa.

Foi ainda possível compreender que os isolados da água tratada evidenciam uma maior resistência aos antibióticos, pelo que um esforço na identificação das espécies que conseguem sobreviver ao tratamento, bem como as concentrações celulares em que se encontram, se torna urgente.

Adicionalmente, surge uma preocupação acrescida com a deteção de contaminantes emergentes na água, ainda que em concentrações residuais, bem como a avaliação dos efeitos da exposição de bactérias a estes contaminantes, dada a diversidade de respostas perante a exposição ao glifosato que se verificou.

Por último, mas não menos importante, as observações realizadas durante o trabalho, nomeadamente a observação de uma maior diversidade de morfologias de colónias nos reservatórios do que à saída da ETA de Lever, erguem a necessidade de avaliar o estado das condutas dos sistemas de distribuição de água, bem como a necessidade de desenvolver estratégias de limpeza e desinfeção das mesmas.

5.3 Limitações e sugestões para trabalho futuro

A grande limitação do trabalho prendeu-se com a impossibilidade de identificar genotipicamente os isolados obtidos. Essa identificação iria, não só auxiliar no reconhecimento das bactérias presentes nas várias fontes de água analisadas, mas também na estruturação do trabalho. Sem uma identificação sólida e apenas através de métodos visuais e bioquímicos muitas dúvidas se levantaram e foi difícil selecionar os isolados a caraterizar, bem como estabelecer comparações entre as diferentes fontes. De facto, o ideal, constituindo uma recomendação para um próximo trabalho, seria selecionar microrganismos que surgissem nos vários pontos de colheita, de forma a compreender melhor as alterações que poderiam ocorrer desde o local de captação até aos reservatórios. Adicionalmente, com os resultados dessas identificações, seria possível estabelecer uma opinião mais fundamentada relativamente à fiabilidade das identificações bioquímicas, obtidas através das galerias API.

Uma outra limitação que surgiu pela impossibilidade de identificar genotipicamente os isolados foi a seleção dos antibióticos a testar. De facto, os antibióticos utilizados, bem como a seleção da metodologia de avaliação da suscetibilidade, dependem fortemente do microrganismo em causa. Assim, num próximo trabalho, sugere-se uma seleção de antibióticos mais adequada, tendo o conhecimento de quais os microrganismos que serão avaliados.

Ainda relativamente à dificuldade em selecionar os isolados a caraterizar, foram utilizados diversos meios de cultura, desde meios de cultura gerais a vários meios seletivos (estes resultados foram apenas observações e técnicas aplicadas para facilitar a obtenção de microrganismos isolados, não sendo apresentados em momento algum no presente documento). Observou-se que, no caso dos isolados provenientes da água tratada, uma grande parte não evidenciou crescimento em meios seletivos, o que permite levantar questões acerca dos métodos aplicados nas análises de água, baseados em crescimentos neste tipo de meios, conforme legislado em Portugal. Sugere-se, portanto, que num trabalho futuro se avalie a presença de microrganismos por outros métodos que não os de cultivo, por exemplo, ELISA, PCR, metagenómica, cromatografia e biossensores.

Um aspeto relevante e que não foi possível avaliar, está relacionado com as caraterísticas dos microrganismos na água que chega à torneira do consumidor: seria uma mais valia compreender se as bactérias presentes nos reservatórios sofrem alterações até aos pontos de consumo e em que medida é que essas alterações podem ser prejudiciais para a saúde. Assim, num trabalho futuro sugere-se que sejam feitas colheitas em vários pontos de consumo, associados a um mesmo reservatório que também seja avaliado.

A nível de avaliação da capacidade de formação de biofilmes, apenas foram estudadas duas condições hidrodinâmicas (estagnação e agitação elevada), pelo que se sugere o estudo de uma agitação intermédia, de forma a compreender o seu impacto na formação de biofilmes. Ainda associado a este fator de virulência, sugere-se um estudo mais detalhado da influência de características como a mobilidade e a coagregação na formação de biofilmes.

O ensaio de exposição ao contaminante emergente selecionado, o glifosato, também foi fortemente afetado pela impossibilidade de identificar os isolados, bem como pelo facto de terem sido selecionados os isolados a avaliar sem se saber quais os microrganismos em causa. Deste modo e por terem sido expostos microrganismos diferentes, não foi possível compreender de que forma a exposição prévia a cloro das bactérias da água tratada, ou o facto de as bactérias terem estado em biofilme, influencia na resposta à exposição ao glifosato. Seria também relevante avaliar a concentração mínima inibitória desta substância para cada bactéria a avaliar. Uma outra limitação relacionada com este ensaio foi o fator tempo, que determinou uma exposição relativamente curta. Seria relevante avaliar os efeitos de uma exposição mais prolongada, bem como uma exposição adaptativa, com concentrações crescentes do herbicida.

Ainda no que diz respeito à exposição ao glifosato, sugere-se a realização de uma exposição a este composto de células no estado séssil, podendo ainda avaliar-se os efeitos de serem biofilmes formados apenas por uma única espécie ou biofilmes formados por diferentes espécies.

Por último, mas não menos relevante, uma outra sugestão para trabalho futuro seria a avaliação genotípica, fenotípica ou proteómica dos microrganismos expostos ao contaminante emergente, de forma a compreender que alterações ocorrem e quais os mecanismos em que estão envolvidos os fatores alterados.

Referências

- Abreu, A. C., McBain, A. J., & Simões, M. (2012). Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents. *Natural Product Reports*, 29(9), 1007-1021.
- Abu Hasan, H., Muhammad, M. H., & Ismail, N. I. (2020). A review of biological drinking water treatment technologies for contaminants removal from polluted water resources. *Journal of Water Process Engineering*, 33, 101035.
- Afonso, A. C., Gomes, I. B., Saavedra, M. J., Giaouris, E., Simões, L. C., & Simões, M. (2021). Bacterial coaggregation in aquatic systems. *Water Research*, 196, 117037.
- Agbowuro, A. A., Huston, W., Gamble, A. B., & Tyndall, J. D. A. (2018). Proteases and protease inhibitors in infectious diseases. *Medicinal Research Reviews*, 38(4), 1295-1331.
- Águas do Douro e Paiva. (2017a). *ETA de Lever*. <https://www.addp.pt/dados.php?ref=etadelever>
- Águas do Douro e Paiva. (2017b). *Laboratório*. <https://www.addp.pt/dados.php?ref=laboratorio>
- Águas do Douro e Paiva. (2017c). *Mapa do Sistema*. <https://www.addp.pt/dados.php?ref=mapa-sistema>
- Águas do Douro e Paiva. (2017d). *Quem somos*. <https://www.addp.pt/dados.php?ref=quem-somos>
- Águas do Douro e Paiva. (2017e). *Visão, Missão e Política de Responsabilidade Empresarial*. <https://www.addp.pt/dados.php?ref=visao-missao-responsabilidade>
- Ahmed, E., & Holmström, S. J. M. (2014). Siderophores in environmental research: roles and applications. *Microbial Biotechnology*, 7(3), 196-208.
- Al-Dhabaan, F. A. (2019). Morphological, biochemical and molecular identification of petroleum hydrocarbons biodegradation bacteria isolated from oil polluted soil in Dhahran, Saud Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(6), 1247-1252.
- Alderton, I., Palmer, B. R., Heinemann, J. A., Pattis, I., Weaver, L., Gutiérrez-Ginés, M. J., Horswell, J., & Tremblay, L. A. (2021). The role of emerging organic contaminants in the development of antimicrobial resistance. *Emerging Contaminants*, 7, 160-171.
- Allen, K. J., & Griffiths, M. W. (2012). Impact of hydroxyl- and superoxide anion-based oxidative stress on logarithmic and stationary phase *Escherichia coli* O157:H7 stress and virulence gene expression. *Food Microbiology*, 29(1), 141-147.
- Amarasiri, M., Sano, D., & Suzuki, S. (2020). Understanding human health risks caused by antibiotic resistant bacteria (ARB) and antibiotic resistance genes (ARG) in water environments: Current knowledge and questions to be answered. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 50(19), 2016-2059.
- Amariei, G., Boltes, K., Rosal, R., & Leton, P. (2020). Enzyme response of activated sludge to a mixture of emerging contaminants in continuous exposure. *PLOS ONE*, 15(1), e0227267. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227267>
- Amornchai, P., Chierakul, W., Wuthiekanun, V., Mahakhunkijcharoen, Y., Phetsouvanh, R., Currie, B. J., Newton, P. N., Chau, N. V. V., Wongratanacheewin, S., Day, N. P. J., & Peacock, S. J. (2007). Accuracy of *Burkholderia pseudomallei* identification using the API 20NE system and a latex agglutination test. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(11), 3774-3776.
- Asadi, A., Abdi, M., Kouhsari, E., Panahi, P., Sholeh, M., Sadeghifard, N., Amiriani, T., Ahmadi, A., Maleki, A., & Gholami, M. (2020). Minocycline, focus on mechanisms of resistance, antibacterial activity, and clinical effectiveness: Back to the future. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 22, 161-174.
- Ashbolt, N. J. (2015). Microbial Contamination of Drinking Water and Human Health from Community Water Systems. *Current Environmental Health Reports*, 2(1), 95-106.
- Ayling, R. M. (2000). Pitfalls in the interpretation of common biochemical tests. *Postgraduate Medical Journal*, 76(893), 129-169.
- Aznar, A., & Dellagi, A. (2015). New insights into the role of siderophores as triggers of plant immunity: what can we learn from animals? *Journal of Experimental Botany*, 66(11), 3001-3010.
- Balcázar, J. L., Subirats, J., & Borrego, C. M. (2015). The role of biofilms as environmental reservoirs of antibiotic resistance. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1216. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2015.01216>
- Beceiro, A., Tomás, M., & Bou, G. (2013). Antimicrobial resistance and virulence: A successful or deleterious association in the bacterial world? *Clinical Microbiology Reviews*, 26(2), 185-230.
- Benedict, K. M., Reses, H., Vigar, M., Roth, D. M., Roberts, V. A., Mattioli, M., Cooley, L. A., Hilborn, E. D., Wade, T. J., Fullerton, K. E., Yoder, J. S., & Hill, V. R. (2017). Surveillance for Waterborne Disease Outbreaks Associated with Drinking Water-United States, 2013-2014. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 66(44), 1216-1221.
- Benkő, R., Gajdács, M., Matuz, M., Bodó, G., Lázár, A., Hajdú, E., Papfalvi, E., Hannauer, P., Erdélyi, P., & Pető, Z. (2020). Prevalence and Antibiotic Resistance of ESKAPE Pathogens Isolated in the

- Emergency Department of a Tertiary Care Teaching Hospital in Hungary: A 5-Year Retrospective Survey. *Antibiotics*, 9(9), 624.
- Benner, J., Helbling, D. E., Kohler, H. P. E., Wittebol, J., Kaiser, E., Prasse, C., Ternes, T. A., Albers, C. N., Aamand, J., Horemans, B., Springael, D., Walravens, E., & Boon, N. (2013). Is biological treatment a viable alternative for micropollutant removal in drinking water treatment processes? *Water Research*, 47(16), 5955-5976.
- Benneyworth, L., Gilligan, J., Ayers, J. C., Goodbred, S., George, G., Carrico, A., Karim, M. R., Akter, F., Fry, D., Donato, K., & Piya, B. (2016). Drinking water insecurity: water quality and access in coastal south-western Bangladesh. <http://dx.doi.org/10.1080/09603123.2016.1194383>, 26(5-6), 508-524.
- Berry, D., Xi, C., & Raskin, L. (2006). Microbial ecology of drinking water distribution systems. *Current Opinion in Biotechnology*, 17(3), 297-302.
- Bertelli, C., Courtois, S., Rosikiewicz, M., Piriou, P., Aebly, S., Robert, S., Loret, J.-F., & Greub, G. (2018). Reduced Chlorine in Drinking Water Distribution Systems Impacts Bacterial Biodiversity in Biofilms. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2520. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.02520>
- Bethesda. (2020, October 20). *Ticarcillin-Clavulanate*. LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury; National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548183/>
- BioMérieux. (2015). *API & ID 32 Identification Databases*.
- Bitton, G. (2014). Microbiology of Drinking Water: Production and Distribution. In I. John Wiley & Sons (Ed.), *Microbiology of Drinking Water Production and Distribution*. Wiley Blackwell.
- Blanco, P., Hernando-Amado, S., Reales-Calderon, J. A., Corona, F., Lira, F., Alcalde-Rico, M., Bernardini, A., Sanchez, M. B., & Martinez, J. L. (2016). Bacterial Multidrug Efflux Pumps: Much More Than Antibiotic Resistance Determinants. *Microorganisms*, 4(1), 14.
- Boccelli, D. L., Small, M. J., & Diwekar, U. M. (2007). Drinking Water Treatment Plant Design Incorporating Variability and Uncertainty. *Journal of Environmental Engineering*, 133(3), 303-312.
- Bosshard, P. P., Zbinden, R., Abels, S., Boddington, B., Altwegg, M., & Böttger, E. C. (2006). 16S rRNA gene sequencing versus the API 20 NE system and the VITEK 2 ID-GNB card for identification of nonfermenting Gram-negative bacteria in the clinical laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(4), 1359-1366.
- Bowler, P., Murphy, C., & Wolcott, R. (2020). Biofilm exacerbates antibiotic resistance: Is this a current oversight in antimicrobial stewardship? *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 9(1), 162.
- Brindhadevi, K., LewisOscar, F., Mylonakis, E., Shanmugam, S., Verma, T. N., & Pugazhendhi, A. (2020). Biofilm and Quorum sensing mediated pathogenicity in *Pseudomonas aeruginosa*. *Process Biochemistry*, 96, 49-57.
- Brooke, J. S. (2012). *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging global opportunistic pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(1), 2-41.
- Busse, M. D., Ratcliff, A. W., Shestak, C. J., & Powers, R. F. (2001). Glyphosate toxicity and the effects of long-term vegetation control on soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(12-13), 1777-1789.
- Calvio, C., Celandroni, F., Ghelardi, E., Amati, G., Salvetti, S., Cecilian, F., Galizzi, A., & Senesi, S. (2005). Swarming Differentiation and Swimming Motility in *Bacillus subtilis* Are Controlled by swrA, a Newly Identified Dicitronic Operon. *Journal of Bacteriology*, 187(15), 5366.
- Camilli, A., & Bassler, B. L. (2006). Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science*, 311(5764), 1113-1116.
- Capelletti, R. V., & Moraes, Â. M. (2016). Waterborne microorganisms and biofilms related to hospital infections: strategies for prevention and control in healthcare facilities. *Journal of Water and Health*, 14(1), 52-67.
- Casadevall, A., & Pirofski, L. (2009). Virulence factors and their mechanisms of action: the view from a damage-response framework. *Journal of Water and Health*, 7(S1), S2-S18.
- Cassat, J. E., & Skaar, E. P. (2013). Iron in infection and immunity. *Cell Host & Microbe*, 13(5), 509-519.
- CDC. (2015). *Water Treatment*. Public Water Systems. https://www.cdc.gov/healthywater/drinking/public/water_treatment.html
- CDC. (2020a, February 3). *One Health Office Fact Sheet*. https://www.cdc.gov/onehealth/who-we-are/one-health-office-fact-sheet.html?CDC_AA_refVal=https%3A%2F%2Fwww.cdc.gov%2Fonehealth%2Fmultimedia%2Ffactsheet.html
- CDC. (2020b, March 13). *About Antibiotic Resistance*. Antibiotic / Antimicrobial Resistance.

- <https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html>
- CDC. (2020c, October 16). *Working Together for One Health*. <https://www.cdc.gov/onehealth/in-action/working-together-for-one-health.html>
- Cevahir, N., Demir, M., Kaleli, I., Gurbuz, M., & Tikvesli, S. (2008). Evaluation of biofilm production, gelatinase activity, and mannose-resistant hemagglutination in *Acinetobacter baumannii* strains. *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection*, 41(6), 513–518. <http://europepmc.org/abstract/MED/19255696>
- Chaban, B., Hughes, H. V., & Beeby, M. (2015). The flagellum in bacterial pathogens: For motility and a whole lot more. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 46, 91–103.
- Chen, J., Groves, R., Civerolo, E. L., Zheng, Y., Viveros, M., & Freeman, M. (2007). Colony morphology of *Xylella fastidiosa* almond leaf scorch strains. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 29(3), 225–231.
- Chen, J., Li, W., Zhang, J., Qi, W., Li, Y., Chen, S., & Zhou, W. (2020). Prevalence of antibiotic resistance genes in drinking water and biofilms: The correlation with the microbial community and opportunistic pathogens. *Chemosphere*, 259, 127483.
- Chen, L., Yang, J., Yu, J., Yao, Z., Sun, L., Shen, Y., & Jin, Q. (2005). VFDB: A reference database for bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Research*, 33(Database issue), D325–D328.
- Chen, W. M., Lin, K. R., & Sheu, S. Y. (2017). *Paenibacillus Lacus* Sp. Nov., Isolated from a Water Reservoir. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(5), 1582–1588.
- Chopra, I., & Roberts, M. (2001). Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 65(2), 232–260.
- Chung, H.-S., Hong, S. G., Lee, Y., Kim, M., Yong, D., Jeong, S. H., Lee, K., & Chong, Y. (2012). Antimicrobial susceptibility of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from a Korean tertiary care hospital. *Yonsei Medical Journal*, 53(2), 439–441.
- CLSI. (2012). *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests: Approved standard - Eleventh edition*. CLSI document M02-A11. Wayne, PA. Clinical and Laboratory Standards Institute.
- CLSI. (2015a). *Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria* (3rd ed.). CLSI guideline M45. Wayne, PA. Clinical and Laboratory Standards Institute.
- CLSI. (2015b). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement*. CLSI document M100-S25. Wayne, PA. Clinical and Laboratory Standards Institute. www.clsi.org
- Colin, R., Ni, B., Laganenka, L., & Sourjik, V. (2021). Multiple functions of flagellar motility and chemotaxis in bacterial physiology. *FEMS Microbiology Reviews*.
- Cox, G., & Wright, G. D. (2013). Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions. *International Journal of Medical Microbiology*, 303(6-7), 287–292.
- Croci, L., Suffredini, E., Cozzi, L., Toti, L., Ottaviani, D., Pruzzo, C., Serratore, P., Fischetti, R., Goffredo, E., Loffredo, G., & Mioni, R. (2007). Comparison of different biochemical and molecular methods for the identification of *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Applied Microbiology*, 102(1), 229–237.
- Culp, E., & Wright, G. D. (2017). Bacterial proteases, untapped antimicrobial drug targets. *The Journal of Antibiotics*, 70(4), 366–377.
- Dale, S. E., Doherty-Kirby, A., Lajoie, G., & Heinrichs, D. E. (2004). Role of siderophore biosynthesis in virulence of *Staphylococcus aureus*: identification and characterization of genes involved in production of a siderophore. *Infection and Immunity*, 72(1), 29–37.
- Datta, A., Stapleton, F., & Willcox, M. D. P. (2017). Bacterial Coaggregation Among the Most Commonly Isolated Bacteria From Contact Lens Cases. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 58, 50–58.
- De Oliveira, D. M. P., Forde, B. M., Kidd, T. J., Harris, P. N. A., Schembri, M. A., Beatson, S. A., Paterson, D. L., & Walker, M. J. (2020). Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(3).
- Decker, C. F., Simon, G. L., & Keiser, J. F. (1991). *Flavimonas oryzihabitans* (*Pseudomonas oryzihabitans*; CDC Group Ve-2) Bacteremia in the Immunocompromised Host. *Archives of Internal Medicine*, 151(3), 603–604.
- Destoumieux-Garzón, D., Mavingui, P., Boetsch, G., Boissier, J., Darriet, F., Duboz, P., Fritsch, C., Giraudoux, P., Le Roux, F., Morand, S., Paillard, C., Pontier, D., Sueur, C., & Voituron, Y. (2018). The One Health Concept: 10 Years Old and a Long Road Ahead. *Frontiers in Veterinary Science*, 5, 14. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fvets.2018.00014>
- Di Bonaventura, G., Spedicato, I., D'Antonio, D., Robuffo, I., & Piccolomini, R. (2004). Biofilm

- formation by *Stenotrophomonas maltophilia*: modulation by quinolones, trimethoprim-sulfamethoxazole, and ceftazidime. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(1), 151-160.
- Dogan, B., & Boor, K. J. (2003). Genetic diversity and spoilage potentials among *Pseudomonas* spp. isolated from fluid milk products and dairy processing plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(1), 130-138.
- Dordet-Frisoni, E., Dorchies, G., De Araujo, C., Talon, R., & Leroy, S. (2007). Genomic diversity in *Staphylococcus xylosus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(22), 7199-7209.
- Douterelo, I., Husband, S., Loza, V., & Boxall, J. (2016). Dynamics of biofilm regrowth in drinking water distribution systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(14), 4155-4168.
- Duplessis, C., & Crum-Cianflone, N. F. (2011). Ceftaroline: A New Cephalosporin with Activity against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Clinical Medicine Reviews in Therapeutics*, 3, a2466.
- Ehlers, S., & Merrill, S. A. (2021, July 1). *Staphylococcus saprophyticus*. Definitions; StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482367/>
- EPA. (2008). *Aquatic Life Criteria for Contaminants of Emerging Concern*.
- Etebu, E., & Arikekpar, I. (2016). Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. *Int. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. Res.*, 4, 90-101.
- Evangelista, A. T., Saha, A., Lechevalier, M. P., & Furness, G. (1978). Analysis of the Cell Wall Constituents of *Corynebacterium genitalium*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 344-348.
- Falkinham, J. O., Pruden, A., & Edwards, M. (2015). Opportunistic Premise Plumbing Pathogens: Increasingly Important Pathogens in Drinking Water. *Pathogens*, 4(2), 373-386.
- Farzam, K., Nessel, T. A., & Quick, J. (2021, June 15). *Erythromycin*. StatPearls; StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532249/>
- Fernández, L., & Hancock, R. E. W. (2012). Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(4), 661-681.
- Ferreira, C. M. H., Vilas-Boas, Â., Sousa, C. A., Soares, H. M. V. M., & Soares, E. V. (2019). Comparison of five bacterial strains producing siderophores with ability to chelate iron under alkaline conditions. *AMB Express*, 9(1), 78.
- Figaj, D., Ambroziak, P., Przepiora, T., & Skorko-Glonek, J. (2019). The Role of Proteases in the Virulence of Plant Pathogenic Bacteria. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3), 672.
- Fish, K. E., Reeves-McLaren, N., Husband, S., & Boxall, J. (2020). Uncharted waters: the unintended impacts of residual chlorine on water quality and biofilms. *NPJ Biofilms and Microbiomes*, 6, 34.
- Fish, K., Osborn, A. M., & Boxall, J. B. (2017). Biofilm structures (EPS and bacterial communities) in drinking water distribution systems are conditioned by hydraulics and influence discoloration. *Science of The Total Environment*, 593-594, 571-580.
- Fitzgerald, K. T., & Newquist, K. L. (2013). Chapter 20 - Poisonings in the Captive Reptile. In M. E. Peterson & P. A. Talcott (Eds.), *Small Animal Toxicology (Third Edition)* (pp. 229-249). W.B. Saunders.
- Flemming, H.-C., Percival, S. L., & Walker, J. T. (2002). Contamination potential of biofilms in water distribution systems. *Water Supply*, 2(1), 271-280.
- Furuya, E. Y., & Lowy, F. D. (2006). Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. *Nature Reviews Microbiology*, 4, 36-45.
- Galasso, O., Familiari, F., De Gori, M., & Gasparini, G. (2012). Recent Findings on the Role of Gelatinases (Matrix Metalloproteinase-2 and -9) in Osteoarthritis. *Advances in Orthopedics*, 2012.
- Garcia, C., Alcaraz, E., Franco, M., & Passerini De Rossi, B. (2015). Iron is a signal for *Stenotrophomonas maltophilia* biofilm formation, oxidative stress response, OMPs expression, and virulence. *Frontiers in Microbiology*, 6, 926. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2015.00926>
- Giedraitienė, A., Vitkauskienė, A., Naginienė, R., & Pavilonis, A. (2011). Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 47(3), 137-146. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21822035/>
- Gomes, I. B., Maillard, J. Y., Simões, L. C., & Simões, M. (2020). Emerging contaminants affect the microbiome of water systems—strategies for their mitigation. *Npj Clean Water*, 3, 39.
- Gomes, I. B., Querido, M. M., Teixeira, J. P., Pereira, C. C., Simões, L. C., & Simões, M. (2019a). Prolonged exposure of *Stenotrophomonas maltophilia* biofilms to trace levels of clofibric acid alters antimicrobial tolerance and virulence. *Chemosphere*, 235, 327-335.
- Gomes, I. B., Simões, L. C., & Simões, M. (2019b). The role of surface copper content on biofilm formation by drinking water bacteria. *RSC Adv.*, 9(55), 32184-32196.
- Gomes, I. B., Simões, M., & Simões, L. C. (2016). The effects of sodium hypochlorite against selected drinking water-isolated bacteria in planktonic and sessile states. *Science of the Total*

- Environment*, 235, 327-335.
- Gomes, L. C., Moreira, J. M. R., Teodósio, J. S., Araújo, J. D. P., Miranda, J. M., Simões, M., Melo, L. F., & Mergulhão, F. J. (2014). 96-well microtiter plates for biofouling simulation in biomedical settings. *Biofouling*, 30(5), 535-546.
- Gomes, M. P., Rocha, D. C., Moreira de Brito, J. C., Tavares, D. S., Marques, R. Z., Soffiatti, P., & Sant'Anna-Santos, B. F. (2020). Emerging contaminants in water used for maize irrigation: Economic and food safety losses associated with ciprofloxacin and glyphosate. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 196, 110549.
- Goswami, G., Panda, D., Samanta, R., Boro, R. C., Modi, M. K., Bujarbaruah, K. M., & Barooah, M. (2018). *Bacillus megaterium* adapts to acid stress condition through a network of genes: Insight from a genome-wide transcriptome analysis. *Scientific Reports*, 8, 16105.
- Gray, D. A., Dugar, G., Gamba, P., Strahl, H., Jonker, M. J., & Hamoen, L. W. (2019). Extreme slow growth as alternative strategy to survive deep starvation in bacteria. *Nature Communications* 2019 10:1, 10, 1-12.
- Gupta, P., Sarkar, S., Das, B., Bhattacharjee, S., & Tribedi, P. (2016). Biofilm, pathogenesis and prevention--a journey to break the wall: a review. *Archives of Microbiology*, 198(1), 1-15.
- Guttenplan, S. B., & Kearns, D. B. (2013). Regulation of flagellar motility during biofilm formation. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(6), 849-871.
- Hall, B. G., Acar, H., Nandipati, A., & Barlow, M. (2014). Growth rates made easy. *Molecular Biology and Evolution*, 31(1), 232-238.
- Haltiner, R. C., Migneault, P. C., & Robertson, R. G. (1980). Incidence of thymidine-dependent enterococci detected on Mueller-Hinton agar with low thymidine content. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 18(3), 365-368.
- Hancock, L. E., & Perego, M. (2004). The *Enterococcus faecalis* *fsr* two-component system controls biofilm development through production of gelatinase. *Journal of Bacteriology*, 186(17), 5629-5639.
- Hancock, V., Witsø, I. L., & Klemm, P. (2011). Biofilm formation as a function of adhesin, growth medium, substratum and strain type. *International Journal of Medical Microbiology*, 301(7), 570-576.
- Hayes, M. V., & Orr, D. C. (1983). Mode of action of ceftazidime: affinity for the penicillin-binding proteins of *Escherichia coli* K12, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 12(2), 119-126.
- Hoeger, S. J., Hitzfeld, B. C., & Dietrich, D. R. (2005). Occurrence and elimination of cyanobacterial toxins in drinking water treatment plants. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 203(3), 231-242.
- Holden, V. I., & Bachman, M. A. (2015). Diverging roles of bacterial siderophores during infection. *Metallomics*, 7(6), 986-995.
- Hölscher, T., & Kovács, Á. T. (2017). Sliding on the surface: bacterial spreading without an active motor. *Environmental Microbiology*, 19(7), 2537-2545.
- Houry, A., Briandet, R., Aymerich, S., & Gohar, M. (2010). Involvement of motility and flagella in *Bacillus cereus* biofilm formation. *Microbiology*, 156(4), 1009-1018.
- Houtman, C. J. (2010). Emerging contaminants in surface waters and their relevance for the production of drinking water in Europe. *Journal of Integrative Environmental Sciences*, 7(4), 271-295.
- Hu, Y., Zhang, T., Jiang, L., Luo, Y., Yao, S., Zhang, D., Lin, K., & Cui, C. (2019). Occurrence and reduction of antibiotic resistance genes in conventional and advanced drinking water treatment processes. *Science of The Total Environment*, 669, 777-784.
- Hylleberg, S., Iversen, A., MacDonald, E., Amato, E., Borge, B. A. S., Boe, A., Sandvin, A., Brandal, L. T., Lyngstad, T. M., Naseer, U., Nygard, K., Veneti, L., & Vold, L. (2020). Large waterborne *Campylobacter* Outbreak: use of multiple approaches to investigate contamination of the drinking water supply system, Norway, June 2019. In *Eurosurveillance* (Vol. 25, Issue 35). European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC).
- Instituto Ricardo Jorge. (2018, February 19). *Instituto Ricardo Jorge integra consórcio europeu que visa promoção de conceito “Uma Só Saúde.”* <http://www.insa.min-saude.pt/instituto-ricardo-jorge-integra-consorcio-europeu-que-visa-promocao-de-conceito-uma-so-saude-2/>
- International Organization for Standardization. (2006). *ISO 5667-5:2006 - Water quality – Sampling – Part 5: Guidance on sampling of drinking water from treatment works and piped distribution systems*. <https://www.iso.org/standard/36694.html>
- International Organization for Standardization. (2014). *ISO 5667-6:2014 - Water quality – Sampling – Part 6: Guidance on sampling of rivers and streams*. <https://www.iso.org/standard/55451.html>
- International Organization for Standardization. (2017). *ISO 11731:2017 - Water quality – Enumeration of Legionella*. <https://www.iso.org/standard/61782.html>
- International Organization for Standardization. (2018a). *ISO 5667-3:2018 - Water quality – Sampling –*

- Part 3: Preservation and handling of water samples. <https://www.iso.org/standard/72370.html>
- International Organization for Standardization. (2018b). *ISO 8199:2018 - Water quality – General requirements and guidance for microbiological examinations by culture*. <https://www.iso.org/standard/64151.html>
- Izaguirre-Anariba, D. E., & Sivapalan, V. (2020). *Chryseobacterium indologenes*, an Emerging Bacteria: A Case Report and Review of Literature. *Cureus*, 12(1), e6720-e6720.
- Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2002). Bacterial identification for publication: when is enough enough? *Journal of Clinical Microbiology*, 40(6), 1887-1891.
- Jin, M., Liu, L., Wang, D., Yang, D., Liu, W., Yin, J., Yang, Z., Wang, H., Qiu, Z., Shen, Z., Shi, D., Li, H., Guo, J., & Li, J. (2020). Chlorine disinfection promotes the exchange of antibiotic resistance genes across bacterial genera by natural transformation. *The ISME Journal*, 14(7), 1847-1856.
- Johnson, D. I. (2018). Bacterial Virulence Factors. In C. Springer (Ed.), *Bacterial Pathogens and Their Virulence Factors*. Springer International Publishing.
- Jones, S. (2017). Permeability rules for antibiotic design. *Nature Biotechnology*, 35, 639.
- Kalidasan, V., Joseph, N., Kumar, S., Hamat, R. A., & Neela, V. K. (2018). The “Checkmate” for Iron Between Human Host and Invading Bacteria: Chess Game Analogy. *Indian Journal of Microbiology*, 58(3), 257-267.
- Kaman, W. E., Hays, J. P., Endtz, H. P., & Bikker, F. J. (2014). Bacterial proteases: targets for diagnostics and therapy. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases : Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 33(7), 1081-1087.
- Karaman, R., Jubeh, B., & Breijyeh, Z. (2020). Resistance of Gram-Positive Bacteria to Current Antibacterial Agents and Overcoming Approaches. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(12), 2888.
- Kearns, D. B. (2010). A field guide to bacterial swarming motility. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 634-644.
- Kemnic, T. R., & Coleman, M. (2021, July 18). *Trimethoprim Sulfamethoxazole*. StatPearls; StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513232/>
- Kissane, Z., & Shephard, J. M. (2017). The rise of glyphosate and new opportunities for biosentinel early-warning studies. *Conservation Biology : The Journal of the Society for Conservation Biology*, 31(6), 1293-1300.
- Knopp, M., & Andersson, D. I. (2015). Amelioration of the Fitness Costs of Antibiotic Resistance Due To Reduced Outer Membrane Permeability by Upregulation of Alternative Porins. *Molecular Biology and Evolution*, 32(12), 3252-3263.
- Kormas, K. A., Neofitou, C., Pachiadaki, M., & Koufostathi, E. (2010). Changes of the bacterial assemblages throughout an urban drinking water distribution system. *Environ Monit Assess*, 165, 27-38.
- Kulwichit, W., Nilgate, S., Chatsuwat, T., Krajiw, S., Unhasuta, C., & Chongthaleong, A. (2007). Accuracies of *Leuconostoc* phenotypic identification: a comparison of API systems and conventional phenotypic assays. *BMC Infectious Diseases*, 7, 69.
- Kumar, P. (2017). 33 - Pharmacology of Specific Drug Groups: Antibiotic Therapy. In F. J. Dowd, B. S. Johnson, & A. J. Mariotti (Eds.), *Pharmacology and Therapeutics for Dentistry (Seventh Edition)* (pp. 457-487). Mosby.
- Kurenbach, B., Hill, A. M., Godsoe, W., van Hamelsveld, S., & Heinemann, J. A. (2018). Agrichemicals and antibiotics in combination increase antibiotic resistance evolution. *PeerJ*, 6, e5801.
- Lautenschlager, K., Boon, N., Wang, Y., Egli, T., & Hammes, F. (2010). Overnight stagnation of drinking water in household taps induces microbial growth and changes in community composition. *Water Research*, 44(17), 4868-4877.
- LeChevallier, M. W. (1999). Biofilms in Drinking Water Distribution Systems: Significance and Control. In *Identifying Future Drinking Water Contaminants*. National Academies Press.
- Leitão, J. (2020). Microbial Virulence Factors. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(15), 5320.
- Leriche, V., & Carpentier, B. (1995). Viable but Nonculturable *Salmonella typhimurium* in Single- and Binary-Species Biofilms in Response to Chlorine Treatment. *Journal of Food Protection*, 58(11), 1186-1191.
- Lerner, H., & Berg, C. (2015). The concept of health in One Health and some practical implications for research and education: what is One Health? *Infection Ecology & Epidemiology*, 5, 25300.
- Li, W., Zhang, J., Wang, F., Qian, L., Zhou, Y., Qi, W., & Chen, J. (2018). Effect of disinfectant residual on the interaction between bacterial growth and assimilable organic carbon in a drinking water distribution system. *Chemosphere*, 202, 586-597.
- Liao, H., Li, X., Yang, Q., Bai, Y., Cui, P., Wen, C., Liu, C., Chen, Z., Tang, J., Che, J., Yu, Z., Geisen, S., Zhou, S., Friman, V.-P., & Zhu, Y.-G. (2021). Herbicide Selection Promotes Antibiotic Resistance in Soil Microbiomes. *Molecular Biology and Evolution*, 38(6), 2337-2350.

- Lin, H., Ye, C., Chen, S., Zhang, S., & Yu, X. (2017). Viable but non-culturable *E. coli* induced by low level chlorination have higher persistence to antibiotics than their culturable counterparts. *Environmental Pollution*, 230, 242-249.
- Liu, B., Zheng, D., Jin, Q., Chen, L., & Yang, J. (2019). VFDB 2019: A comparative pathogenomic platform with an interactive web interface. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D687-D692.
- Liu, L., Le, Y., Jin, J., Zhou, Y., & Chen, G. (2015). Chlorine stress mediates microbial surface attachment in drinking water systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(6), 2861-2869.
- Liu, S., Gunawan, C., Barraud, N., Rice, S. A., Harry, E. J., & Amal, R. (2016). Understanding, Monitoring, and Controlling Biofilm Growth in Drinking Water Distribution Systems. *Environmental Science & Technology*, 50(17), 8954-8976.
- Liu, Y., & Tay, J.-H. (2002). The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge. *Water Research*, 36(7), 1653-1665.
- Lopes, M. de F. S., Simões, A. P., Tenreiro, R., Marques, J. J. F., & Crespo, M. T. B. (2006). Activity and expression of a virulence factor, gelatinase, in dairy enterococci. *International Journal of Food Microbiology*, 112(3), 208-214.
- Luo, L. W., Wu, Y. H., Yu, T., Wang, Y. H., Chen, G. Q., Tong, X., Bai, Y., Xu, C., Wang, H. Bin, Ikuno, N., & Hu, H. Y. (2021). Evaluating method and potential risks of chlorine-resistant bacteria (CRB): A review. *Water Research*, 188, 116474.
- Machuca, A., & Milagres, A. M. F. (2003). Use of CAS-agar plate modified to study the effect of different variables on the siderophore production by *Aspergillus*. *Letters in Applied Microbiology*, 36, 177-181.
- Mackenzie, J. S., & Jeggo, M. (2019). The One Health Approach-Why Is It So Important? *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 4(2), 88.
- Macnair, C. R., & Brown, E. D. (2020). Outer membrane disruption overcomes intrinsic, acquired, and spontaneous antibiotic resistance. *MBio*, 11(5), e01615-20.
- Maes, S., Vackier, T., Nguyen Huu, S., Heyndrickx, M., Steenackers, H., Samplers, I., Raes, K., Verplaetse, A., & De Reu, K. (2019). Occurrence and characterisation of biofilms in drinking water systems of broiler houses. *BMC Microbiology*, 19.
- Mangwani, N., Kumari, S., & Das, S. (2016). Bacterial biofilms and quorum sensing: fidelity in bioremediation technology. <http://dx.doi.org/10.1080/02648725.2016.1196554>, 32(1-2), 43-73.
- Manuel, C. M., Nunes, O. C., & Melo, L. F. (2006). Dynamics of drinking water biofilm in flow/non-flow conditions. *Water Research*, 41, 551-562.
- Manzella, J. (2001). Quinupristin-Dalfopristin: A New Antibiotic for Severe Gram-Positive Infections. *American Family Physician*, 64(11), 1867. www.aafp.org/afp
- Martínez-Santos, P. (2017). Does 91% of the world's population really have "sustainable access to safe drinking water"? *International Journal of Water Resources Development*, 33(4), 514-533.
- Martinez-Urtaza, J., Lozano-Leon, A., Viña-Feas, A., de Novoa, J., & Garcia-Martin, O. (2006). Differences in the API 20E biochemical patterns of clinical and environmental *Vibrio parahaemolyticus* isolates. *FEMS Microbiology Letters*, 255(1), 75-81.
- Martinez, D. A., Loening, U. E., & Graham, M. C. (2018). Impacts of glyphosate-based herbicides on disease resistance and health of crops: a review. *Environmental Sciences Europe*, 30, 2.
- Martínez, J. L., & Baquero, F. (2014). Emergence and spread of antibiotic resistance: setting a parameter space. *Upsala Journal of Medical Sciences*, 119(2), 68-77.
- Martins, A., Rosa, J., Guerreiro, S., & Simas, L. (2020). *Relatório Anual dos Serviços de Águas e Resíduos em Portugal (2020); Volume 2 - Controlo da qualidade da água para consumo humano*. www.ersar.pt.
- Masters, S., Parks, J., Atassi, A., & Edwards, M. A. (2015a). Distribution system water age can create premise plumbing corrosion hotspots. *Environmental Monitoring and Assessment*, 187(9), 1-18.
- Masters, S., Wang, H., Pruden, A., & Edwards, M. A. (2015b). Redox gradients in distribution systems influence water quality, corrosion, and microbial ecology. *Water Research*, 68, 140-149.
- Mattick, J. S. (2002). Type IV pili and twitching motility. *Annual Review of Microbiology*, 56, 289-314.
- Mattingly, A. E., Weaver, A. A., Dimkovikj, A., & Shrout, J. D. (2018). Assessing travel conditions: Environmental and host influences on bacterial surface motility. *Journal of Bacteriology*, 200(11).
- Mazal, C., & Sieger, B. (2010). *Staphylococcus lentus*: The troublemaker. *International Journal of Infectious Diseases*, 14(1), e397.
- McEwen, S. A., & Collignon, P. J. (2018). Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. *Microbiology Spectrum*, 6(2).
- Meena, M., Swapnil, P., Zehra, A., Aamir, M., Dubey, M. K., Patel, C. B., & Upadhyay, R. S. (2019). Chapter 11 - Virulence Factors and Their Associated Genes in Microbes. In H. B. Singh, V. K. Gupta, & S. Jogaiah (Eds.), *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* (pp. 181-208). Elsevier.

- Meyer, A., Dang, H., & Roland, W. (2019). *Myroides* spp. cellulitis and bacteremia: A case report. *IDCases*, 18, e00638.
- Moreira, J. M. R., Teodósio, J. S., Silva, F. C., Simões, M., Melo, L. F., & Mergulhão, F. J. (2013). Influence of flow rate variation on the development of *Escherichia coli* biofilms. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 36(11), 1787-1796.
- Moreira, N. A., & Bondelind, M. (2017). Safe drinking water and waterborne outbreaks. *Journal of Water and Health*, 15(1), 83-96.
- Mosratö, J., Mir, J., Codony, F., Mas, J., & Ribas, F. (2003). Microbial response to disinfectants. In *Handbook of Water and Wastewater Microbiology* (pp. 657-693). Elsevier Inc.
- Moyes, R. B., Reynolds, J., & Breakwell, D. P. (2009). Differential staining of bacteria: Gram stain. *Current Protocols in Microbiology*, 15(1), A.3C.1-A.3C.8.
- Mulani, M. S., Kamble, E. E., Kumkar, S. N., Tawre, M. S., & Pardesi, K. R. (2019). Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. *Frontiers in Microbiology*, 0(APR), 539.
- Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum*, 4(2).
- Nan, B. (2017). Bacterial Gliding Motility: Rolling Out a Consensus Model. *Current Biology*, 27(4), R154-R156.
- Nan, B., & Zusman, D. R. (2016). Novel mechanisms power bacterial gliding motility. *Molecular Microbiology*, 101, 186-193.
- Nasir, N., Sayeed, M. A., & Jamil, B. (2019). *Ralstonia pickettii* Bacteremia: An Emerging Infection in a Tertiary Care Hospital Setting. *Cureus*, 11(7), e5084.
- Navidinia, M., Goudarzi, M., Ramshe, S. M., & Farajollahi, Z. (2017). Molecular characterization of resistance genes in MDR-ESKAPE pathogens. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 11(2), 779-792.
- Nemeth, J., Oesch, G., & Kuster, S. P. (2015). Bacteriostatic versus bactericidal antibiotics for patients with serious bacterial infections: systematic review and meta-analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(2), 382-395.
- Neuendorf, S., Hedtke, K., Tangen, G., & Genersch, E. (2004). Biochemical characterization of different genotypes of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, a honey bee bacterial pathogen. *Microbiology*, 150(7), 2381-2390.
- Nie, X., Liu, W., Chen, M., Liu, M., & Ao, L. (2016). Flow cytometric assessment of the effects of chlorine, chloramine, and UV on bacteria by using nucleic acid stains and 5-cyano-2,3-ditolyltetrazolium chloride. *Frontiers of Environmental Science and Engineering*, 10(6), 1-12.
- Novak Babič, M., Gostinčar, C., & Gunde-Cimerman, N. (2020). Microorganisms populating the water-related indoor biome. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(15), 6443-6462.
- Núñez, M. (2014). *Micrococcus*. In C. A. Batt & M. Lou Tortorello (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)* (pp. 627-633). Academic Press.
- Official Journal of the European Communities. (1998). Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption. In *Official Journal of the European Communities* (pp. 0032-0054). <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:31998L0083&from=EN>
- Oh, S.-W., Chen, P.-C., & Kang, D.-H. (2007). Biofilm formation by *Enterobacter sakazakii* grown in artificial broth and infant milk formula on plastic surface. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, 15(4), 311-319.
- Oong, G. C., & Tadi, P. (2021, July 9). *Chloramphenicol*. StatPearls; StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555966/>
- Otto, M. (2009). *Staphylococcus epidermidis* - the “accidental” pathogen. *Nature Reviews. Microbiology*, 7(8), 555-567.
- Otton, L. M., da Silva Campos, M., Meneghetti, K. L., & Corção, G. (2017). Influence of twitching and swarming motilities on biofilm formation in *Pseudomonas* strains. *Archives of Microbiology*, 199, 677-682.
- Palansooriya, K. N., Yang, Y., Tsang, Y. F., Sarkar, B., Hou, D., Cao, X., Meers, E., Rinklebe, J., Kim, K.-H., & Ok, Y. S. (2019). Occurrence of contaminants in drinking water sources and the potential of biochar for water quality improvement: A review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 50(6), 549-611.
- Pantopoulos, K., Porwal, S. K., Tartakoff, A., & Devireddy, L. (2012). Mechanisms of mammalian iron homeostasis. *Biochemistry*, 51(29), 5705-5724.
- Papich, M. G. (2016). Linezolid. In M. G. Papich (Ed.), *Saunders Handbook of Veterinary Drugs (Fourth Edition)* (pp. 451-452). W.B. Saunders.
- Parnham, M. J., Haber, V. E., Giamarellos-Bourboulis, E. J., Perletti, G., Verleden, G. M., & Vos, R. (2014). Azithromycin: Mechanisms of action and their relevance for clinical applications.

- Pharmacology & Therapeutics*, 143(2), 225-245.
- Penterman, J., Nguyen, D., Anderson, E., Staudinger, B. J., Greenberg, E. P., Lam, J. S., & Singh, P. K. (2014). Rapid evolution of culture-impaired bacteria during adaptation to biofilm growth. *Cell Reports*, 6(2), 293-300.
- Pérez-Miranda, S., Cabirol, N., George-Téllez, R., Zamudio-Rivera, L. S., & Fernández, F. J. (2007). O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. *Journal of Microbiological Methods*, 70(1), 127-131.
- Peruzzo, P. J., Porta, A. A., & Ronco, A. E. (2008). Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. *Environmental Pollution*, 156(1), 61-66.
- Peterson, E., & Kaur, P. (2018). Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Relationships Between Resistance Determinants of Antibiotic Producers, Environmental Bacteria, and Clinical Pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2928. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.02928>
- Piri, I., Homayoonnezhad, I., & Amirian, P. (2010). Investigation on optimization of conventional drinking water treatment plant. In *ICBEE 2010 - 2nd International Conference on Chemical, Biological and Environmental Engineering*.
- Poole, K. (2002). Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 55S-64S.
- Pospíšil, S., Benada, O., Kofroňová, O., Petříček, M., Janda, L., & Havlíček, V. (1998). *Kytococcus sedentarius* (formerly *Micrococcus sedentarius*) and *Dermaococcus nishinomiyaensis* (formerly *Micrococcus nishinomiyaensis*) produce monensins, typical *Streptomyces cinnamonensis* metabolites. *Canadian Journal of Microbiology*, 44(10), 1007-1011.
- Potgieter, S., Pinto, A., Sigudu, M., du Preez, H., Ncube, E., & Venter, S. (2018). Long-term spatial and temporal microbial community dynamics in a large-scale drinking water distribution system with multiple disinfectant regimes. *Water Research*, 139, 406-419.
- Prest, E. I., Schaap, P. G., Besmer, M. D., & Hammes, F. (2021). Dynamic Hydraulics in a Drinking Water Distribution System Influence Suspended Particles and Turbidity, But Not Microbiology. *Water*, 13(1), 109.
- Prest, E. I., Weissbrodt, D. G., Hammes, F., Van Loosdrecht, M. C. M., & Vrouwenvelder, J. S. (2016). Long-term bacterial dynamics in a full-scale drinking water distribution system. *PLoS ONE*, 11(10).
- Prüß, B. M. (2017). Involvement of Two-Component Signaling on Bacterial Motility and Biofilm Development. *Journal of Bacteriology*, 199(18), e00259-17.
- Ramírez-Castillo, F. Y., Loera-Muro, A., Jacques, M., Garneau, P., Avelar-González, F. J., Harel, J., & Guerrero-Barrera, A. L. (2015). Waterborne Pathogens: Detection Methods and Challenges. *Pathogens*, 4(2), 307-334.
- Rasko, D. A., & Sperandio, V. (2010). Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9, 117-128.
- Razzaq, A., Shamsi, S., Ali, A., Ali, Q., Sajjad, M., Malik, A., & Ashraf, M. (2019). Microbial Proteases Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7, 110.
- REA. (2018, December 17). *Água para consumo humano*. Relatório Do Estado Do Ambiente. <https://rea.apambiente.pt/content/água-para-consumo-humano>
- Reichert, G., Hilgert, S., Fuchs, S., & Azevedo, J. C. R. (2019). Emerging contaminants and antibiotic resistance in the different environmental matrices of Latin America. *Environmental Pollution*, 255, Part 1, 113140.
- Reynolds, K. A. (2018, May 15). *A One Health Approach to Safe Drinking Water*. <https://wcponline.com/2018/05/15/one-health-approach-safe-drinking-water/>
- Riva, F., Castiglioni, S., Fattore, E., Manenti, A., Davoli, E., & Zuccato, E. (2018). Monitoring emerging contaminants in the drinking water of Milan and assessment of the human risk. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 221(3), 451-457.
- Robinson, A., McCarter, Y. S., & Tetreault, J. (1995). Comparison of Crystal Enteric/Nonfermenter system, API 20E system, and Vitek AutoMicrobic system for identification of gram-negative bacilli. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(2), 364-370.
- Roca, I., Akova, M., Baquero, F., Carlet, J., Cavaleri, M., Coenen, S., Cohen, J., Findlay, D., Gyssens, I., Heur, O. E., Kahlmeter, G., Kruse, H., Laxminarayan, R., Liébana, E., López-Cerero, L., MacGowan, A., Martins, M., Rodríguez-Baño, J., Rolain, J.-M., ... Vila, J. (2015). The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. *New Microbes and New Infections*, 6, 29.
- Rosenfeld, P. E., & Feng, L. G. H. (2011). 16 - Emerging Contaminants. In P. E. Rosenfeld & L. G. H. Feng (Eds.), *Risks of Hazardous Wastes* (pp. 215-222). William Andrew Publishing.
- Rossi, E., Paroni, M., & Landini, P. (2018). Biofilm and motility in response to environmental and host-related signals in Gram negative opportunistic pathogens. *Journal of Applied Microbiology*, 125,

1587-1602.

- Rossi, F., Carles, L., Donnadieu, F., Batisson, I., & Artigas, J. (2021a). Glyphosate-degrading behavior of five bacterial strains isolated from stream biofilms. *Journal of Hazardous Materials*, 420, 126651.
- Rossi, F., Carles, L., Donnadieu, F., Batisson, I., & Artigas, J. (2021b). Glyphosate-degrading behavior of five bacterial strains isolated from stream biofilms. *Journal of Hazardous Materials*, 420, 126651.
- Ryan, M. P., & Adley, C. C. (2010). *Sphingomonas paucimobilis*: a persistent Gram-negative nosocomial infectious organism. *Journal of Hospital Infection*, 75(3), 153-157.
- Ryan, M. P., & Pembroke, J. T. (2018). *Brevundimonas* spp.: Emerging global opportunistic pathogens. *Virulence*, 9(1), 480-493.
- Sabaté Brescó, M., Harris, L. G., Thompson, K., Stanic, B., Morgenstern, M., O'Mahony, L., Richards, R. G., & Moriarty, T. F. (2017). Pathogenic Mechanisms and Host Interactions in *Staphylococcus epidermidis* Device-Related Infection. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1401.
- Sampimon, O. C., Zadoks, R. N., De Vlieghe, S., Supré, K., Haesebrouck, F., Barkema, H. W., Sol, J., & Lam, T. J. G. M. (2009). Performance of API Staph ID 32 and Staph-Zym for identification of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine milk samples. *Veterinary Microbiology*, 136(3), 300-305.
- Sanganyado, E., & Gwenzi, W. (2019). Antibiotic resistance in drinking water systems: Occurrence, removal, and human health risks. *Science of The Total Environment*, 669, 785-797.
- Sanseverino, I., Cuenca, A. N., Loos, R., Marinov, D., & Lettieri, T. (2018). *State of the Art on the Contribution of Water to Antimicrobial Resistance*.
- Santajit, S., & Indrawattana, N. (2016). Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *BioMed Research International*, 2016.
- Santana, M. V. E., Zhang, Q., & Mihelcic, J. R. (2014). Influence of Water Quality on the Embodied Energy of Drinking Water Treatment. *Environmental Science and Technology*, 48(5), 3084-3091.
- Santos, R. E. R. de S., Batista, B. B., & da Silva Neto, J. F. (2020). Ferric Uptake Regulator Fur Coordinates Siderophore Production and Defense against Iron Toxicity and Oxidative Stress and Contributes to Virulence in *Chromobacterium violaceum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(21), e01620-20.
- Santos, S., Neto, I. F. F., Machado, M. D., Soares, H. M. V. M., & Soares, E. V. (2014). Siderophore Production by *Bacillus megaterium*: Effect of Growth Phase and Cultural Conditions. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(1), 549-560.
- Sauer, K. (2003). The genomics and proteomics of biofilm formation. *Genome Biology*, 4, 219.
- Scales, B. S., Dickson, R. P., LiPuma, J. J., & Huffnagle, G. B. (2014). Microbiology, genomics, and clinical significance of the *Pseudomonas fluorescens* species complex, an unappreciated colonizer of humans. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(4), 927-948.
- Scavone, J. M., Gleckman, R. A., & Fraser, D. G. (1982). Cinoxacin: Mechanism of Action, Spectrum of Activity, Pharmacokinetics, Adverse Reactions, and Therapeutic Indications. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 2(5), 266-271.
- Schriks, M., Heringa, M. B., van der Kooi, M. M. E., de Voogt, P., & van Wezel, A. P. (2010). Toxicological relevance of emerging contaminants for drinking water quality. *Water Research*, 44(2), 461-476.
- Schultz, C. (2012). Gatifloxacin ophthalmic solution for treatment of bacterial conjunctivitis: safety, efficacy and patient perspective. *Ophthalmology and Eye Diseases*, 4, 65-70.
- Schwendener, S., & Perreten, V. (2012). New MLS_B Resistance Gene erm(43) in *Staphylococcus lentus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(9), 4746-4752.
- Schwyn, B., & Neilands, J. B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, 160(1), 47-56.
- September, S., Els, F., Venter, S., & Brözel, V. (2007). Prevalence of bacterial pathogens in biofilms of drinking water distribution systems. *Journal of Water and Health*, 5(2), 219-227. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17674571/>
- Sharma, D., Patel, A., Soni, P., Sharma, P., & Gupta, B. (2016). *Empedobacter brevis* Meningitis in a Neonate: A Very Rare Case of Neonatal Meningitis and Literature Review. *Case Reports in Pediatrics*, 2016, 7609602.
- Shemesh, M., Kolter, R., & Losick, R. (2010). The biocide chlorine dioxide stimulates biofilm formation in *Bacillus subtilis* by activation of the histidine kinase KinC. *Journal of Bacteriology*, 192(24), 6352-6356.
- Shi, T., Fu, T., & Xie, J. (2011). Polyphosphate Deficiency Affects the Sliding Motility and Biofilm Formation of *Mycobacterium smegmatis*. *Current Microbiology*, 63, 470-476.
- Shin, S. H., Lim, Y., Lee, S. E., Yang, N. W., & Rhee, J. H. (2001). CAS agar diffusion assay for the

- measurement of siderophores in biological fluids. *Journal of Microbiological Methods*, 44(1), 89-95.
- Silva, L. N., Zimmer, K. R., Macedo, A. J., & Trentin, D. S. (2016). Plant Natural Products Targeting Bacterial Virulence Factors. *Chemical Reviews*, 116(16), 9162-9236.
- Simões, L. C. (2013). *Biofilms in Drinking Water*. Nova Science Publishers. <http://hdl.handle.net/1822/28512>
- Simões, L. C., & Simões, M. (2013). Biofilms in drinking water: problems and solutions. *RSC Advances*, 3(8), 2520-2533.
- Simões, L. C., Simões, M., & João Vieira, M. (2007). Biofilm Interactions between Distinct Bacterial Genera Isolated from Drinking Water. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(19), 6192-6200.
- Simões, M., Simões, L. C., & Vieira, M. J. (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Science and Technology*, 43(4), 573-583.
- Sims, D., Brettin, T., Detter, J. C., Han, C., Lapidus, A., Copeland, A., Del Rio, T. G., Nolan, M., Chen, F., Lucas, S., Tice, H., Cheng, J.-F., Bruce, D., Goodwin, L., Pitluck, S., Ovchinnikova, G., Pati, A., Ivanova, N., Mavromatis, K., ... Klenk, H.-P. (2009). Complete genome sequence of *Kytococcus sedentarius* type strain (541T). *Standards in Genomic Sciences*, 1, 12-21.
- Singh, A., Yu, F. P., & McFeters, G. A. (1990). Rapid detection of chlorine-induced bacterial injury by the direct viable count method using image analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(2), 389-394.
- Sizar, O., Rahman, S., & Sundareshan, V. (2021, July 22). *Amikacin*. StatPearls; StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430908/>
- Slenker, A. K., Hess, B. D., Jungkind, D. L., & DeSimone, J. A. (2012). Fatal case of *Weeksella virosa* sepsis. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(12), 4166-4167.
- Soutourina, O. A., Semenova, E. A., Parfenova, V. V., Danchin, A., & Bertin, P. (2001). Control of bacterial motility by environmental factors in polarly flagellated and peritrichous bacteria isolated from Lake Baikal. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(9), 3852-3859.
- Stepanović, S., Vukovic, D., Dakic, I., Savic, B., & Svabic-Vlahovic, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, 40(2), 175-179.
- Stępień-Pyśniak, D., Hauschild, T., Kosikowska, U., Dec, M., & Urban-Chmiel, R. (2019). Biofilm formation capacity and presence of virulence factors among commensal *Enterococcus* spp. from wild birds. *Scientific Reports*, 9(1), 11204.
- Stewart, P. S. (2002). Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *International Journal of Medical Microbiology*, 292(2), 107-113.
- Su, H. C., Liu, Y. S., Pan, C. G., Chen, J., He, L. Y., & Ying, G. G. (2018). Persistence of antibiotic resistance genes and bacterial community changes in drinking water treatment system: From drinking water source to tap water. *Science of The Total Environment*, 616-617, 453-461.
- Szczuka, E., Krzysińska, S., Bogucka, N., & Kaznowski, A. (2018). Multifactorial mechanisms of the pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus hominis* isolated from bloodstream infections. *Antonie van Leeuwenhoek*, 111(7), 1259-1265.
- Teh, A. H. T., Lee, S. M., & Dykes, G. A. (2016). The Influence of Prior Modes of Growth, Temperature, Medium, and Substrate Surface on Biofilm Formation by Antibiotic-Resistant *Campylobacter jejuni*. *Current Microbiology*, 73, 859-866.
- Teodosiu, C., Gilca, A. F., Barjoveanu, G., & Fiore, S. (2018). Emerging pollutants removal through advanced drinking water treatment: A review on processes and environmental performances assessment. *Journal of Cleaner Production*, 197, Part 1, 1210-1221.
- Thurlow, L. R., Thomas, V. C., Narayanan, S., Olson, S., Fleming, S. D., & Hancock, L. E. (2010). Gelatinase contributes to the pathogenesis of endocarditis caused by *Enterococcus faecalis*. *Infection and Immunity*, 78(11), 4936-4943.
- Toyofuku, M., Inaba, T., Kiyokawa, T., Obana, N., Yawata, Y., & Nomura, N. (2015). Environmental factors that shape biofilm formation. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 80(1), 7-12.
- Tsagkari, E., & Sloan, W. T. (2018). The Role of the Motility of *Methylobacterium* in Bacterial Interactions in Drinking Water. *Water* 2018, Vol. 10, Page 1386, 10(10), 1386.
- Tsvetanova, Z. (2020). Quantification of the bacterial community of drinking water-associated biofilms under different flow velocities and changing chlorination regimes. *Applied Water Science*, 10, 3.
- UN-Water. (2021). *Summary Progress Update 2021: SDG 6 – water and sanitation for all*. <https://www.unwater.org/new-data-on-global-progress-towards-ensuring-water-and-sanitation-for-all-by-2030/>
- Van Bruggen, A. H. C., He, M. M., Shin, K., Mai, V., Jeong, K. C., Finckh, M. R., & Morris, J. G. (2018). Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. *Science of The Total Environment*,

- 616-617, 255-268.
- Vaz-Moreira, I., Nunes, O. C., & Manaia, C. M. (2014). Bacterial diversity and antibiotic resistance in water habitats: searching the links with the human microbiome. *FEMS Microbiology Reviews*, 38(4), 761-778.
- Verderosa, A. D., Totsika, M., & Fairfull-Smith, K. E. (2019). Bacterial Biofilm Eradication Agents: A Current Review. *Frontiers in Chemistry*, 7, 824.
- Viola, A., Ferrazzano, L., Martelli, G., Cerisoli, L., Ricci, A., Tolomelli, A., & Cabri, W. (2019). Novel insights into the chemistry of an old medicine: A general degradative pathway for penicillins from a piperacillin/tazobactam stability study. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 136, 104957.
- Vysakh, A., Midhun, S. J., Jayesh, K., Jyothis, M., & Latha, M. S. (2018). Studies on biofilm formation and virulence factors associated with uropathogenic *Escherichia coli* isolated from patient with acute pyelonephritis. *Pathophysiology*, 25(4), 381-387.
- Waak, M. B., Hozalski, R. M., Hallé, C., & LaPara, T. M. (2019). Comparison of the microbiomes of two drinking water distribution systems—with and without residual chloramine disinfection. *Microbiome*, 7, 87.
- Waak, M. B., LaPara, T. M., Hallé, C., & Hozalski, R. M. (2018). Occurrence of *Legionella* spp. in Water-Main Biofilms from Two Drinking Water Distribution Systems. *Environmental Science & Technology*, 52(14), 7630-7639.
- Wagner, E. M., Fischel, K., Rammer, N., Beer, C., Palmethofer, A. L., Conrady, B., Roch, F.-F., Hanson, B. T., Wagner, M., & Rychli, K. (2021). Bacteria of eleven different species isolated from biofilms in a meat processing environment have diverse biofilm forming abilities. *International Journal of Food Microbiology*, 349, 109232.
- Waines, P. L., Moate, R., Moody, A. J., Allen, M., & Bradley, G. (2011). The effect of material choice on biofilm formation in a model warm water distribution system. <http://dx.doi.org/10.1080/08927014.2011.636807>, 27(10), 1161-1174.
- Waller, D. G., & Sampson, A. P. (2018). 51 - Chemotherapy of infections. In D. G. Waller & A. P. Sampson (Eds.), *Medical Pharmacology and Therapeutics (Fifth Edition)* (pp. 581-629). Elsevier.
- Wang, D. (2016). Raw water quality assessment for the treatment of drinking water. *Environmental Earth Sciences*, 75, 1327.
- Wang, H., Shen, Y., Hu, C., Xing, X., & Zhao, D. (2018). Sulfadiazine/ciprofloxacin promote opportunistic pathogens occurrence in bulk water of drinking water distribution systems. *Environmental Pollution*, 234, 71-78.
- Watkins, K., & Unnikrishnan, M. (2020). Chapter 9 - New strategies and targets for antibacterial discovery. In P. Kesharwani, S. Chopra, & A. Dasgupta (Eds.), *Drug Discovery Targeting Drug-Resistant Bacteria* (pp. 249-272). Academic Press.
- Wehrli, W. (1983). Rifampin: mechanisms of action and resistance. *Reviews of Infectious Diseases*, 5 Suppl 3, S407-S411.
- Weiner, C. P., & Buhimschi, C. (2009). M. In C. P. Weiner & C. Buhimschi (Eds.), *Drugs for Pregnant and Lactating Women (Second Edition)* (pp. 616-745). W.B. Saunders.
- Weiner, C. P., & Buhimschi, C. (2014). T. In A. H. Jeske (Ed.), *Drugs for Pregnant and Lactating Women (Second Edition)* (pp. 1065-1140). Mosby.
- Wenzel, M. (2020). Do we really understand how antibiotics work? *Future Microbiology*, 15(14), 1307-1311.
- WHO. (2000). *WHO guidelines for drinking water quality: training pack*. (World Health Organization. (ed.)). <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/66218/a68673.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- WHO. (2017a). *Guidelines for drinking-water quality: fourth edition incorporating the first addendum*. World Health Organization.
- WHO. (2017b). *One Health*. World Health Organization. <https://www.euro.who.int/en/health-topics/health-policy/one-health>
- WHO. (2019a). *Drinking-water*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/drinking-water>
- WHO. (2019b). *Surveillance and outbreak management of water-related infectious diseases associated with water-supply systems*. <http://apps.who.int/bookorders>.
- WHO and UNICEF. (2017). Progress on Drinking Water, Sanitation and Hygiene: 2017 update and SDG baselines. In *Who*. World Health Organization (WHO) and the United Nations Children's Fund (UNICEF).
- WHO and UNICEF. (2021). *Progress on household drinking water, sanitation and hygiene 2000-2020: five years into the SDGs*. World Health Organization (WHO) and the United Nations Children's Fund (UNICEF). <http://apps.who.int/bookorders>.
- Wilson, D. N. (2011). On the specificity of antibiotics targeting the large ribosomal subunit. *Annals of*

- the New York Academy of Sciences*, 1241, 1-16.
- Wingender, J., & Flemming, H.-C. (2011). Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 214(6), 417-423.
- Wright, M. S., Peltier, G. L., Stepanauskas, R., & McArthur, J. V. (2006). Bacterial tolerances to metals and antibiotics in metal-contaminated and reference streams. *FEMS Microbiology Ecology*, 58(2), 293-302.
- Wu, H.-J., Wang, A. H. J., & Jennings, M. P. (2008). Discovery of virulence factors of pathogenic bacteria. *Current Opinion in Chemical Biology*, 12(1), 93-101.
- Wu, H., Zhang, J., Mi, Z., Xie, S., Chen, C., & Zhang, X. (2015). Biofilm bacterial communities in urban drinking water distribution systems transporting waters with different purification strategies. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(4), 1947-1955.
- Wu, Z., He, R., Zhang, R., & Yuan, J. (2020). Swarming Motility Without Flagellar Motor Switching by Reversal of Swimming Direction in *E. coli*. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1042.
- Xia, N., Xia, X., Liu, T., Hu, L., Zhu, B., Zhang, X., & Dong, J. (2014). Characteristics of bacterial community in the water and surface sediment of the Yellow River, China, the largest turbid river in the world. *J Soils Sediments*, 14(11), 1894-1904.
- Xu, L., Ouyang, W., Qian, Y., Su, C., Su, J., & Chen, H. (2016). High-throughput profiling of antibiotic resistance genes in drinking water treatment plants and distribution systems. *Environmental Pollution*, 213, 119-126.
- Yocum, R. R., Rasmussen, J. R., & Strominger, J. L. (1980). The mechanism of action of penicillin. Penicillin acylates the active site of *Bacillus stearothermophilus* D-alanine carboxypeptidase. *Journal of Biological Chemistry*, 255(9), 3977-3986.
- Zago, C. E., Silva, S., Sanitá, P. V., Barbugli, P. A., Dias, C. M. I., Lordello, V. B., & Vergani, C. E. (2015). Dynamics of Biofilm Formation and the Interaction between *Candida albicans* and Methicillin-Susceptible (MSSA) and -Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *PLOS ONE*, 10(4), e0123206.
- Zeng, D., Debabov, D., Hartsell, T. L., Cano, R. J., Adams, S., Schuyler, J. A., McMillan, R., & Pace, J. L. (2016). Approved Glycopeptide Antibacterial Drugs: Mechanism of Action and Resistance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(12), a026989.
- Zhang, J., Li, W., Chen, J., Qi, W., Wang, F., & Zhou, Y. (2018). Impact of biofilm formation and detachment on the transmission of bacterial antibiotic resistance in drinking water distribution systems. *Chemosphere*, 203, 368-380.
- Zhang, S., Lin, W., & Yu, X. (2016). Effects of full-scale advanced water treatment on antibiotic resistance genes in the Yangtze Delta area in China. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(5).
- Zhang, T., Lv, K., Lu, Q., Wang, L., & Liu, X. (2021). Removal of antibiotic-resistant genes during drinking water treatment: A review. *Journal of Environmental Sciences*, 104, 415-429.
- Zhu, Z., Shan, L., Hu, F., Li, Z., Zhong, D., Yuan, Y., & Zhang, J. (2020). Biofilm formation potential and chlorine resistance of typical bacteria isolated from drinking water distribution systems. *RSC Advances*, 10, 31295.
- Zhu, Z., Wu, C., Zhong, D., Yuan, Y., Shan, L., & Zhang, J. (2014). Effects of Pipe Materials on Chlorine-resistant Biofilm Formation Under Long-term High Chlorine Level. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 173(6), 1564-1578.

Anexo 1 Infraestruturas da AdDP

Na Figura A1. 1, encontra-se o mapa de infraestruturas da empresa AdDP, estando assinalados os dois reservatórios estudados (RP e RVN), bem como a ETA de Lever. É importante referir que a água do Rio Douro foi captada junto ao complexo da ETA de Lever.

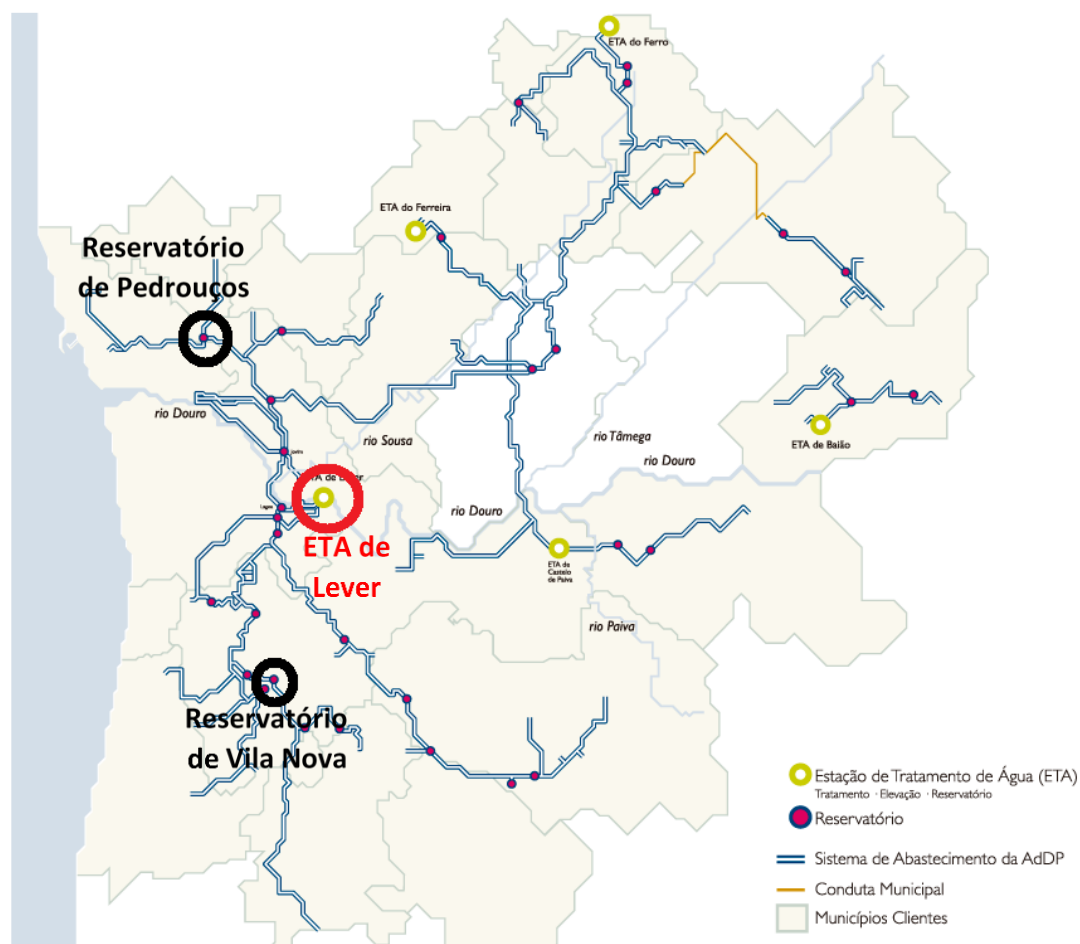


Figura A1. 1. Mapa de Infraestruturas da empresa Águas do Douro e Paiva. Adaptado de Águas do Douro e Paiva (2017c).

Na Figura A1. 2, encontra-se uma representação esquemática do sistema de abastecimento dos dois reservatórios em estudo. Ambos recebem água tratada, proveniente da ETA de Lever, e de um poço, que capta água do Rio Douro em profundidade. O RP recebe água captada num poço a jusante da ETA de Lever, enquanto o RVN recebe água captada num poço a montante.

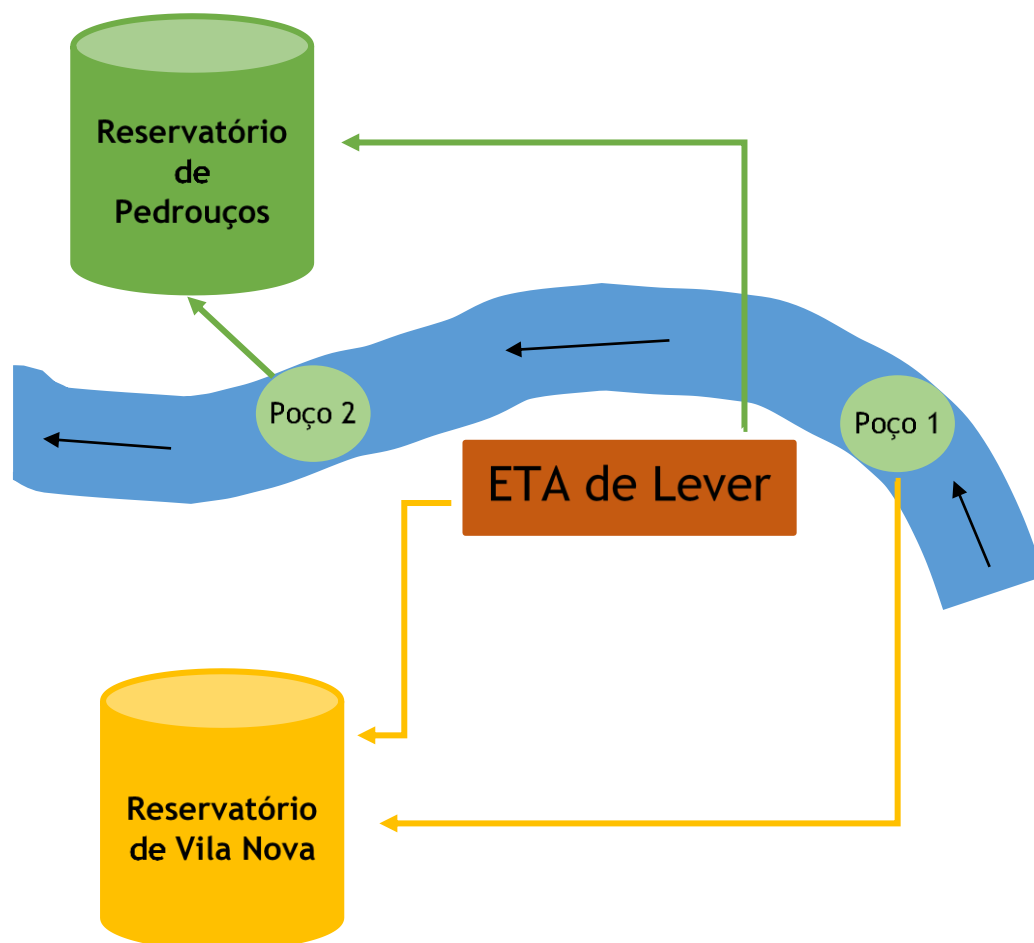


Figura A1. 2. Representação do abastecimento dos reservatórios.

Anexo 2 Composição dos meios de cultura

2.1 R2A *broth*

Tabela A2. 1. Composição do meio de cultura R2A *broth*: compostos e respectivas quantidades.

Composto	g/L
Peptona	0.5
Glucose	0.5
Sulfato de Magnésio.7 H ₂ O	0.1
Piruvato de sódio	0.3
Extrato de levedura	0.5
Hidrolisado de caseína	0.5
Amido solúvel	0.5
Fosfato dipotássico.3 H ₂ O	0.393

2.2 Gelatinases

Para avaliar a produção de gelatinases, recorreu-se a placas de Petri contendo o meio *gelatin agar*, cuja composição pode ser consultada na Tabela A2. 2.

Tabela A2. 2. Composição do meio de cultura *gelatin agar*.

Composto	g/L
Peptona	5
Extrato de levedura	3
Gelatina	30
Agar	15

2.3 Sideróforos

Para avaliar a produção de sideróforos, recorreu-se a placas de Petri de CAS-agar. Para preparar este meio, é necessário preparar previamente as soluções de ferro III e de brometo de hexadeciltrimetilamónio (HDTMA). Posteriormente prepara-se uma solução de CAS-Fe.

Tabela A2. 3. Composição da solução de ferro III.

Composto/Reagente	Quantidade
Cloreto de ferro (III) - $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	27 mg
Água	100 mL
Ácido Clorídrico concentrado (35-39%)	83.3 μL

Tabela A2. 4. Composição da solução de HDTMA.

Composto/Reagente	Quantidade
HDTMA	72.4 mg
Água	40 mL

Tabela A2. 5. Composição da solução de CAS-Fe.

Composto/Reagente/Solução	Quantidade
Chrome Azurol S	60.7 mg
Água	50 mL
Solução de Ferro III	10 mL
Solução de HDTMA	40 mL

Modo de Preparação do meio CAS-agar:

1. Esterilizar a solução CAS-Fe no autoclave;
2. Preparar 1L de R2A agar (adicionando apenas 880 mL de água) e esterilizar no autoclave;
3. Deixar as soluções arrefecerem;
4. Adicionar 20 mL de glucose a 50% (m/V), esterilizada por filtração (filtro de seringa de 0.2 μm), ao meio R2A agar;
5. Adicionar 100 mL de CAS-Fe ao meio R2A agar;
6. Verter o meio em placas de Petri.

Anexo 3 Identificação dos Isolados

3.1 Caraterização morfológica e bioquímica

Os resultados relativos à morfologia das colónias obtidas nas placas de R2A, bem como os resultados das caraterizações bioquímicas, encontram-se na Tabela A3. 1.

Tabela A3. 1. Resumo das caraterísticas morfológicas e bioquímicas dos isolados estudados.

	Morfologia das colónias em R2A agar (Cor, forma, margens, elevação, transparência e brilho)	Coloração de Gram (Tipo de Gram / Forma)	Catalase	Oxidase	Identificação através da galeria API (Galeria API selecionada)
Rio.A	Incolor, circular, irregulares, achatada, transparente e brilhante	Negativo / Bacilos	+	+	<i>Pseudomonas fluorescens</i> - 91.3% (API 20 NE)
Rio.B	Branca, circular, irregulares, elevada, opaca e brilhante	Positivo / Bacilos (alfinetes de dama)	+	-	Não realizado
Rio.C	Amarela, circular, regulares, convexa, transparente e brilhante	Negativo / Bacilos	+	-	<i>Chryseobacterium indologenes</i> - 99.7% (API 20 NE)
Rio.D	Branca, circular, regulares, convexa, opaca e baça	Negativo / Bacilos	+	+	<i>Myroides spp./Chryseobacterium indologenes</i> - 34.2% (API 20 E)
Rio.E	Amarela, circular, regulares, convexa, transparente e brilhante	Negativo / Bacilos	-	-	<i>Chryseobacterium indologenes</i> - 99.6% (API 20 NE)
Rio.F	Branca, circular, irregulares, elevada, opaca e brilhante	Positivo / Bacilos	+	-	Não realizado
Rio.G	Amarela, circular, regulares, elevada, opaca e brilhante	Negativo / Bacilos	+	-	<i>Weeksella virosa/Empedobacter brevis</i> - 33.6% (API 20 NE)
Rio.H	Branca, circular, regulares, achatada, opaca e brilhante	Negativo / Bacilos	+	+	<i>Pseudomonas fluorescens</i> - 99.9% (API 20 NE)
Rio.I	Amarela, circular, regulares, elevada, transparente e brilhante	Negativo / Bacilos	+	+	<i>Chryseobacterium indologenes</i> - 99.6% (API 20 NE)
ETA.A	Branca/amarelada, circular, lobulares, achatada, opaca e baça	Positivo / Bacilos	+	-	Não realizado
ETA.B	Branca, circular, irregulares, achatada, transparente e brilhante	Positivo / Cocos (em cachos)	+	-	<i>Staphylococcus lentus</i> - 97.8% (API Staph)

ETA.C	Incolor, circular, irregulares, achatada, transparente e brilhante (textura farinosa)	Positivo / Cocos	+	-	<i>Staphylococcus lentus</i> - 97.8% (API Staph)
ETA.D	Branca/amarelada, circular, irregulares, convexa, opaca e baça	Positivo / Bacilos	+	-	Não realizado
ETA.E	Branca, circular, irregulares, convexa, opaca e brilhante	Positivo / Cocos (em cachos)	+	-	<i>Staphylococcus xylosus</i> - 89.2% (API Staph)
ETA.F	Branca com centro amarelo, circular, regulares, convexa, opaca e brilhante	Positivo / Cocos (em cachos)	+	-	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> - 51.9%; <i>Staphylococcus hominis</i> - 36.7% (API Staph)*
RP.bio.A	Branca, circular, irregulares, elevada, opaca e brilhante	Positivo / Cocos	+	-	<i>Staphylococcus lentus</i> - 97.8% (API Staph)
RP.ag.A	Amarela, circular, regular, plana, opaca e brilhante	Positivo / Cocos	+	-	<i>Micrococcus</i> spp. - 99.8% (API Staph)**
RP.ag.B	Branca/amarelada, circular, irregulares, convexa, opaca e baça	Positivo / Bacilos	+	-	Não realizado
RP.ag.C	Laranja, circular, regulares, plana, opaca e baça	Negativo / Bacilos	-	-	<i>Pseudomonas oryzae</i> - 39.8% (API 20 NE)
RP.ag.D	Branca, circular, irregulares, elevada, opaca e brilhante	Positivo / Bacilos	-	-	Não realizado
RP.ag.E	Vermelha, circular, regulares, convexa, opaca e baça	Positivo / Bacilos	-	+	Não realizado
RVN.bio.A	Vermelha, circular, regulares, convexa, opaca e baça	Positivo / Bacilos	-	+	Não realizado
RVN.bio.B	Incolor, circular, regulares, achatada, transparente e brilhante	Negativo / Bacilos	+	+	<i>Ralstonia pickettii</i> - 82.3% (API 20 NE)
RVN.ag.A	Laranja, circular, regulares, plana, opaca e baça	Positivo / Cocos	+	-	<i>Micrococcus</i> spp. - 99.8% (API Staph)
RVN.ag.B	Branca, circular, regular, achatada, opaca e brilhante	Negativo / Bacilos	-	-	<i>Brevundimonas vesicularis</i> - 85.8% (API 20 NE)
RVN.ag.C	Incolor, circular, regulares, achatada, transparente e brilhante	Negativo / Bacilos	+	+	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> - 99.7% (API 20 NE)
RVN.ag.D	Vermelha, circular, regulares, convexa, opaca e baça	Negativo / Bacilos	-	-	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> - 65.1% (API 20 NE)

* Identificação aceitável no género.

** Considerando positivo o teste da resistência à lisostafina (LSTR).

3.2 Escolha das galerias API

Nos isolados avaliados, estavam presentes bacilos dos tipos Gram positivo e Gram negativo e cocos do tipo Gram positivo. Nenhuma das galerias indicadas para os bacilos do tipo Gram positivo (API 20 A, Rapid ID 32 A, API Coryne, API Listeria, API CHB e API 50 CHL) estavam disponíveis, portanto, não foram efetuadas as identificações API deste grupo de isolados. Na Figura A3. 1, encontram-se os fluxogramas consultados para selecionar a galeria API mais indicada para os isolados dos tipos bacilos Gram negativos e cocos Gram positivos.

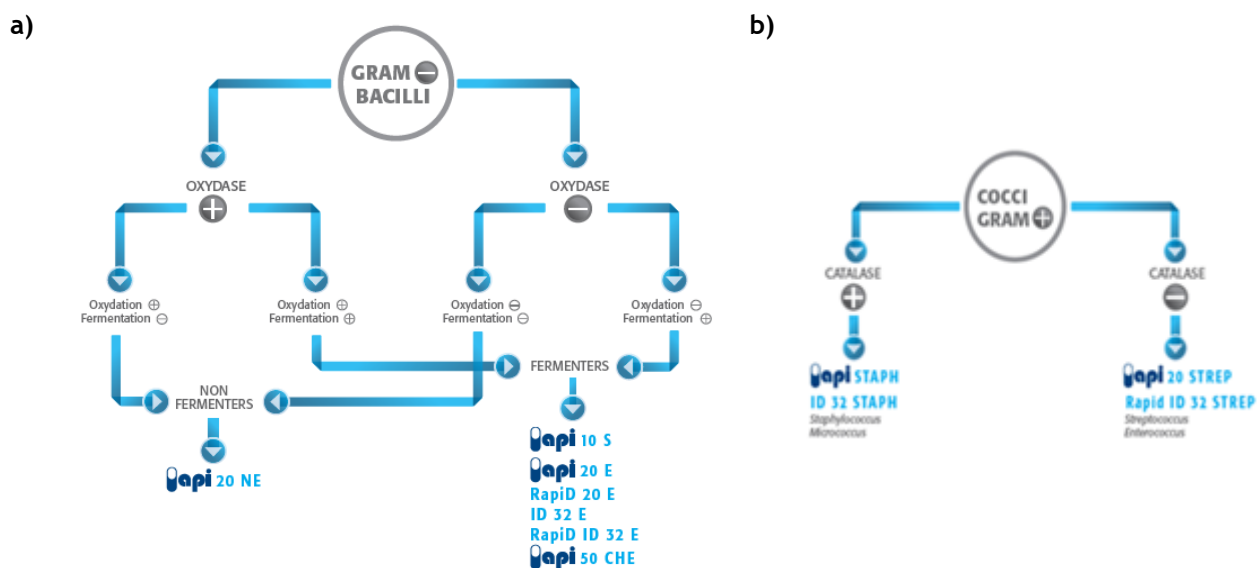


Figura A3. 1. Fluxogramas para seleção da galeria API mais indicada para os bacilos Gram negativos (a) e para os cocos Gram positivos (b).

3.3 Resultados obtidos *apiweb*TM

Após seleção da galeria API mais indicada, esta foi inoculada, incubada e interpretada conforme indicado pelo fornecedor. Os resultados obtidos foram introduzidos na ferramenta *apiweb*TM que possibilita a interpretação da galeria. São devolvidas as identificações, acompanhadas de uma percentagem e um índice que refletem a fiabilidade da identificação. Podem ainda ser recomendados testes que permitam complementar a identificação.

3.3.1 Isolados do Rio Douro

Na Tabela A3. 2, encontram-se os resultados das caracterizações bioquímicas efetuadas para os isolados obtidos a partir da água do Rio Douro.

Tabela A3. 2. Resultados devolvidos pela ferramenta *apiweb* para os isolados do Rio Douro.

Rio.A	BOA IDENTIFICAÇÃO									
	Galeria	API 20 NE V8.0								
	Perfil	1 4 4 7 5 5 5								
	Nota(s)									
Rio.C	Taxa significativos	% ID	T	Teste(s) discordantes						
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	91.3	0.51	ADH	80%	ESC	1%			
	Taxon seguinte	% ID	T	Teste(s) discordantes						
	<i>Burkholderia cepacia</i>	7.1	0.37	ADla	93%	PACa	99%			
Rio.D	MUITO BOA IDENTIFICAÇÃO									
	Galeria	API 20 NE V8.0								
	Perfil	2 6 1 0 0 0 0								
	Nota(s)	ID.INVÁLIDA ANTES DE 48 H DE INCUBAÇÃO !								
Rio.D	Taxa significativos	% ID	T	Teste(s) discordantes						
	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	99.7	0.66	OX	99%					
	Taxon seguinte	% ID	T	Teste(s) discordantes						
	<i>Myroides spp</i>	0.2	0.02	TRP	1%	ESC	1%	OX	100%	
Rio.D	IDENTIFICAÇÃO INCORRECTA									
	Galeria	API 20 E V5.0								
	Perfil	0 0 0 2 0 0 4								
	Nota(s)									
Rio.D	Taxa significativos	% ID	T	Teste(s) discordantes						
	<i>Myroides spp/Chryseobacterium indologenes</i>	34.2	0.92	URE	75%					
	<i>Aeromonas salmonicida ssp salmonicida</i>	24.6	0.96							
	Non-fermenter spp	13.7	0.83	GEL	9%					
Rio.D	<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	9.4	0.79	ONPG	77%	IND	85%			
	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	6.6	0.77	URE	90%	IND	75%			
	Teste(s) complementare(s)	ESC (HID.)		AMARELO		GLUCOSEg		MOB		
	<i>Aeromonas salmonicida ssp salmonicida</i>	v		2%		98%		2%		
Rio.D	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	98%		98%		2%		0%		
	<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	98%		24%		2%		0%		
	<i>Myroides spp</i>	2%		98%		2%		0%		
	Non-fermenter spp	-		-(+)		2%		98%		

Rio.E	<table> <tr><th colspan="10">MUITO BOA IDENTIFICAÇÃO</th></tr> <tr><td>Galeria</td><td colspan="9">API 20 NE V8.0</td></tr> <tr><td>Perfil</td><td colspan="9">2 6 3 0 0 0 0</td></tr> <tr><td>Nota(s)</td><td colspan="9" rowspan="2">ID.INVÁLIDA ANTES DE 48 H DE INCUBAÇÃO !</td></tr> <tr><td colspan="10"></td></tr> <tr><td colspan="2">Taxa significativos</td><td>% ID</td><td>T</td><td colspan="6">Teste(s) discordantes</td></tr> <tr><td colspan="2">Chryseobacterium indologenes</td><td>99.6</td><td>0.56</td><td>PNPG 22%</td><td>OX 99%</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td colspan="10"></td></tr> <tr><td colspan="2">Taxon seguinte</td><td>% ID</td><td>T</td><td colspan="6">Teste(s) discordantes</td></tr> <tr><td colspan="2" rowspan="2">Elizabethkingia meningoseptica</td><td rowspan="2">0.3</td><td rowspan="2">0.11</td><td>URE 5%</td><td>GLUa 86%</td><td>MNEa 80%</td><td>MANa 76%</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>OX 99%</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> </table>	MUITO BOA IDENTIFICAÇÃO										Galeria	API 20 NE V8.0									Perfil	2 6 3 0 0 0 0									Nota(s)	ID.INVÁLIDA ANTES DE 48 H DE INCUBAÇÃO !																			Taxa significativos		% ID	T	Teste(s) discordantes						Chryseobacterium indologenes		99.6	0.56	PNPG 22%	OX 99%															Taxon seguinte		% ID	T	Teste(s) discordantes						Elizabethkingia meningoseptica		0.3	0.11	URE 5%	GLUa 86%	MNEa 80%	MANa 76%			OX 99%																																																																																																																																																		
MUITO BOA IDENTIFICAÇÃO																																																																																																																																																																																																																																																								
Galeria	API 20 NE V8.0																																																																																																																																																																																																																																																							
Perfil	2 6 3 0 0 0 0																																																																																																																																																																																																																																																							
Nota(s)	ID.INVÁLIDA ANTES DE 48 H DE INCUBAÇÃO !																																																																																																																																																																																																																																																							
Taxa significativos		% ID	T	Teste(s) discordantes																																																																																																																																																																																																																																																				
Chryseobacterium indologenes		99.6	0.56	PNPG 22%	OX 99%																																																																																																																																																																																																																																																			
Taxon seguinte		% ID	T	Teste(s) discordantes																																																																																																																																																																																																																																																				
Elizabethkingia meningoseptica		0.3	0.11	URE 5%	GLUa 86%	MNEa 80%	MANa 76%																																																																																																																																																																																																																																																	
				OX 99%																																																																																																																																																																																																																																																				
Rio.G	<table> <tr><th colspan="10">IDENTIFICAÇÃO INCORRECTA</th></tr> <tr><td>Galeria</td><td colspan="9">API 20 NE V8.0</td></tr> <tr><td>Perfil</td><td colspan="9">1 4 1 0 0 0 0</td></tr> <tr><td rowspan="4">Nota(s)</td><td colspan="9">ID.INVÁLIDA ANTES DE 48H/POSSIBILIDADE DE B.diminuta</td></tr> <tr><td colspan="9">ID.INVÁLIDA ANTES DE 48H/POSSIBILIDADE DE Brucella spp</td></tr> <tr><td colspan="9">ID.INVÁLIDA ANTES DE 48 H DE INCUBAÇÃO !</td></tr> <tr><td colspan="9" rowspan="2">ID.INVÁLIDA ANTES DE 48H/POSSIBILIDADE DE Eik.corrodens</td></tr> <tr><td colspan="10"></td></tr> <tr><td colspan="2">Taxa significativos</td><td>% ID</td><td>T</td><td colspan="6">Teste(s) discordantes</td></tr> <tr><td colspan="2">Weeksella virosa/Empedobacter brevis</td><td>33.6</td><td>0.28</td><td>NO3 12%</td><td>ESC 1%</td><td>OX 98%</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td colspan="2">Moraxella lacunata</td><td>15.8</td><td>0.22</td><td>ESC 0%</td><td>OX 99%</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td colspan="2">Brevundimonas vesicularis</td><td>15.4</td><td>0.35</td><td>NO3 16%</td><td>GEL 12%</td><td>OX 98%</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td colspan="2">Chryseobacterium indologenes</td><td>11.9</td><td>0.39</td><td>NO3 20%</td><td>TRP 81%</td><td>OX 99%</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td colspan="2">Pasteurella spp</td><td>9.3</td><td>0.22</td><td>ESC 1%</td><td>GEL 1%</td><td>OX 87%</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td colspan="10"></td></tr> <tr><td colspan="2">Teste(s) complementare(s)</td><td colspan="2">AMARELO</td><td colspan="2">MOB</td><td colspan="2">MAC CONKEY</td><td colspan="2">OF/O</td></tr> <tr><td colspan="2">Brevundimonas vesicularis</td><td colspan="2">91%</td><td colspan="2">98%</td><td colspan="2">85%</td><td colspan="2">NT</td></tr> <tr><td colspan="2">Chryseobacterium indologenes</td><td colspan="2">98%</td><td colspan="2">0%</td><td colspan="2">57%</td><td colspan="2">91%</td></tr> <tr><td colspan="2">Moraxella lacunata</td><td colspan="2">2%</td><td colspan="2">0%</td><td colspan="2">-</td><td colspan="2">0%</td></tr> <tr><td colspan="2">Pasteurella multocida</td><td colspan="2">0%</td><td colspan="2">0%</td><td colspan="2">v</td><td colspan="2">23%</td></tr> <tr><td colspan="2">Neisseria animaloris/zoodegmatidis</td><td colspan="2">2%</td><td colspan="2">0%</td><td colspan="2">98%</td><td colspan="2">91%</td></tr> <tr><td colspan="2">Eikenella corrodens</td><td colspan="2">NT</td><td colspan="2">-</td><td colspan="2">-</td><td colspan="2">NT</td></tr> <tr><td colspan="2">Weeksella virosa</td><td colspan="2">2%</td><td colspan="2">0%</td><td colspan="2">3%</td><td colspan="2">0%</td></tr> <tr><td colspan="2">Brevundimonas diminuta</td><td colspan="2">2%</td><td colspan="2">100%</td><td colspan="2">85%</td><td colspan="2">NT</td></tr> <tr><td colspan="2">Empedobacter brevis</td><td colspan="2">98%</td><td colspan="2">0%</td><td colspan="2">57%</td><td colspan="2">91%</td></tr> </table>	IDENTIFICAÇÃO INCORRECTA										Galeria	API 20 NE V8.0									Perfil	1 4 1 0 0 0 0									Nota(s)	ID.INVÁLIDA ANTES DE 48H/POSSIBILIDADE DE B.diminuta									ID.INVÁLIDA ANTES DE 48H/POSSIBILIDADE DE Brucella spp									ID.INVÁLIDA ANTES DE 48 H DE INCUBAÇÃO !									ID.INVÁLIDA ANTES DE 48H/POSSIBILIDADE DE Eik.corrodens																			Taxa significativos		% ID	T	Teste(s) discordantes						Weeksella virosa/Empedobacter brevis		33.6	0.28	NO3 12%	ESC 1%	OX 98%				Moraxella lacunata		15.8	0.22	ESC 0%	OX 99%					Brevundimonas vesicularis		15.4	0.35	NO3 16%	GEL 12%	OX 98%				Chryseobacterium indologenes		11.9	0.39	NO3 20%	TRP 81%	OX 99%				Pasteurella spp		9.3	0.22	ESC 1%	GEL 1%	OX 87%														Teste(s) complementare(s)		AMARELO		MOB		MAC CONKEY		OF/O		Brevundimonas vesicularis		91%		98%		85%		NT		Chryseobacterium indologenes		98%		0%		57%		91%		Moraxella lacunata		2%		0%		-		0%		Pasteurella multocida		0%		0%		v		23%		Neisseria animaloris/zoodegmatidis		2%		0%		98%		91%		Eikenella corrodens		NT		-		-		NT		Weeksella virosa		2%		0%		3%		0%		Brevundimonas diminuta		2%		100%		85%		NT		Empedobacter brevis		98%		0%		57%		91%	
IDENTIFICAÇÃO INCORRECTA																																																																																																																																																																																																																																																								
Galeria	API 20 NE V8.0																																																																																																																																																																																																																																																							
Perfil	1 4 1 0 0 0 0																																																																																																																																																																																																																																																							
Nota(s)	ID.INVÁLIDA ANTES DE 48H/POSSIBILIDADE DE B.diminuta																																																																																																																																																																																																																																																							
	ID.INVÁLIDA ANTES DE 48H/POSSIBILIDADE DE Brucella spp																																																																																																																																																																																																																																																							
	ID.INVÁLIDA ANTES DE 48 H DE INCUBAÇÃO !																																																																																																																																																																																																																																																							
	ID.INVÁLIDA ANTES DE 48H/POSSIBILIDADE DE Eik.corrodens																																																																																																																																																																																																																																																							
Taxa significativos		% ID	T	Teste(s) discordantes																																																																																																																																																																																																																																																				
Weeksella virosa/Empedobacter brevis		33.6	0.28	NO3 12%	ESC 1%	OX 98%																																																																																																																																																																																																																																																		
Moraxella lacunata		15.8	0.22	ESC 0%	OX 99%																																																																																																																																																																																																																																																			
Brevundimonas vesicularis		15.4	0.35	NO3 16%	GEL 12%	OX 98%																																																																																																																																																																																																																																																		
Chryseobacterium indologenes		11.9	0.39	NO3 20%	TRP 81%	OX 99%																																																																																																																																																																																																																																																		
Pasteurella spp		9.3	0.22	ESC 1%	GEL 1%	OX 87%																																																																																																																																																																																																																																																		
Teste(s) complementare(s)		AMARELO		MOB		MAC CONKEY		OF/O																																																																																																																																																																																																																																																
Brevundimonas vesicularis		91%		98%		85%		NT																																																																																																																																																																																																																																																
Chryseobacterium indologenes		98%		0%		57%		91%																																																																																																																																																																																																																																																
Moraxella lacunata		2%		0%		-		0%																																																																																																																																																																																																																																																
Pasteurella multocida		0%		0%		v		23%																																																																																																																																																																																																																																																
Neisseria animaloris/zoodegmatidis		2%		0%		98%		91%																																																																																																																																																																																																																																																
Eikenella corrodens		NT		-		-		NT																																																																																																																																																																																																																																																
Weeksella virosa		2%		0%		3%		0%																																																																																																																																																																																																																																																
Brevundimonas diminuta		2%		100%		85%		NT																																																																																																																																																																																																																																																
Empedobacter brevis		98%		0%		57%		91%																																																																																																																																																																																																																																																
Rio.H	<table> <tr><th colspan="10">EXCELENTE IDENTIFICAÇÃO</th></tr> <tr><td>Galeria</td><td colspan="9">API 20 NE V8.0</td></tr> <tr><td>Perfil</td><td colspan="9">0 1 5 7 5 5 5</td></tr> <tr><td>Nota(s)</td><td colspan="9" rowspan="2"></td></tr> <tr><td colspan="10"></td></tr> <tr><td colspan="2">Taxa significativos</td><td>% ID</td><td>T</td><td colspan="6">Teste(s) discordantes</td></tr> <tr><td colspan="2">Pseudomonas fluorescens</td><td>99.9</td><td>0.97</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td colspan="10"></td></tr> <tr><td colspan="2">Taxon seguinte</td><td>% ID</td><td>T</td><td colspan="6">Teste(s) discordantes</td></tr> <tr><td colspan="2">Pseudomonas putida</td><td>0.1</td><td>0.16</td><td>GEL 1%</td><td>MANa 5%</td><td>NAGa 2%</td><td></td><td></td><td></td></tr> </table>	EXCELENTE IDENTIFICAÇÃO										Galeria	API 20 NE V8.0									Perfil	0 1 5 7 5 5 5									Nota(s)																				Taxa significativos		% ID	T	Teste(s) discordantes						Pseudomonas fluorescens		99.9	0.97																	Taxon seguinte		% ID	T	Teste(s) discordantes						Pseudomonas putida		0.1	0.16	GEL 1%	MANa 5%	NAGa 2%																																																																																																																																																						
EXCELENTE IDENTIFICAÇÃO																																																																																																																																																																																																																																																								
Galeria	API 20 NE V8.0																																																																																																																																																																																																																																																							
Perfil	0 1 5 7 5 5 5																																																																																																																																																																																																																																																							
Nota(s)																																																																																																																																																																																																																																																								
Taxa significativos		% ID	T	Teste(s) discordantes																																																																																																																																																																																																																																																				
Pseudomonas fluorescens		99.9	0.97																																																																																																																																																																																																																																																					
Taxon seguinte		% ID	T	Teste(s) discordantes																																																																																																																																																																																																																																																				
Pseudomonas putida		0.1	0.16	GEL 1%	MANa 5%	NAGa 2%																																																																																																																																																																																																																																																		
Rio.I	<table> <tr><th colspan="10">MUITO BOA IDENTIFICAÇÃO</th></tr> <tr><td>Galeria</td><td colspan="9">API 20 NE V8.0</td></tr> <tr><td>Perfil</td><td colspan="9">2 6 3 0 0 0 4</td></tr> <tr><td>Nota(s)</td><td colspan="9" rowspan="2">ID.INVÁLIDA ANTES DE 48 H DE INCUBAÇÃO !</td></tr> <tr><td colspan="10"></td></tr> <tr><td colspan="2">Taxa significativos</td><td>% ID</td><td>T</td><td colspan="6">Teste(s) discordantes</td></tr> <tr><td colspan="2">Chryseobacterium indologenes</td><td>99.6</td><td>0.85</td><td>PNPG 22%</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td colspan="10"></td></tr> <tr><td colspan="2">Taxon seguinte</td><td>% ID</td><td>T</td><td colspan="6">Teste(s) discordantes</td></tr> <tr><td colspan="2">Elizabethkingia meningoseptica</td><td>0.3</td><td>0.39</td><td>URE 5%</td><td>GLUa 86%</td><td>MNEa 80%</td><td>MANa 76%</td><td></td><td></td></tr> </table>	MUITO BOA IDENTIFICAÇÃO										Galeria	API 20 NE V8.0									Perfil	2 6 3 0 0 0 4									Nota(s)	ID.INVÁLIDA ANTES DE 48 H DE INCUBAÇÃO !																			Taxa significativos		% ID	T	Teste(s) discordantes						Chryseobacterium indologenes		99.6	0.85	PNPG 22%																Taxon seguinte		% ID	T	Teste(s) discordantes						Elizabethkingia meningoseptica		0.3	0.39	URE 5%	GLUa 86%	MNEa 80%	MANa 76%																																																																																																																																																					
MUITO BOA IDENTIFICAÇÃO																																																																																																																																																																																																																																																								
Galeria	API 20 NE V8.0																																																																																																																																																																																																																																																							
Perfil	2 6 3 0 0 0 4																																																																																																																																																																																																																																																							
Nota(s)	ID.INVÁLIDA ANTES DE 48 H DE INCUBAÇÃO !																																																																																																																																																																																																																																																							
Taxa significativos		% ID	T	Teste(s) discordantes																																																																																																																																																																																																																																																				
Chryseobacterium indologenes		99.6	0.85	PNPG 22%																																																																																																																																																																																																																																																				
Taxon seguinte		% ID	T	Teste(s) discordantes																																																																																																																																																																																																																																																				
Elizabethkingia meningoseptica		0.3	0.39	URE 5%	GLUa 86%	MNEa 80%	MANa 76%																																																																																																																																																																																																																																																	

3.3.2 Isolados da ETA de Lever

Para os isolados da ETA, obtiveram-se as interpretações dos resultados das galerias API que estão presentes na Tabela A3. 3.

Tabela A3. 3. Resultados devolvidos pela ferramenta apiweb para os isolados da ETA de Lever.

ETA.B

PERFIL DUVIDOSO									
Galeria	API STAPH V5.0								
Perfil	6 3 3 7 7 5 0								
Nota(s)									
Taxa significativos				% ID	T	Teste(s) discordantes			
Staphylococcus lentus				97.8	0.57	LAC 100%	PAL 21%		
Taxon seguinte				% ID	T	Teste(s) discordantes			
Staphylococcus xylosus				2.1	0.41	LAC 85%	MEL 9%	RAF 11%	URE 90%

ETA.C

PERFIL DUVIDOSO									
Galeria	API STAPH V5.0								
Perfil	6 3 3 7 7 5 0								
Nota(s)									
Taxa significativos				% ID	T	Teste(s) discordantes			
Staphylococcus lentus				97.8	0.57	LAC 100%	PAL 21%		
Taxon seguinte				% ID	T	Teste(s) discordantes			
Staphylococcus xylosus				2.1	0.41	LAC 85%	MEL 9%	RAF 11%	URE 90%

ETA.E

IDENTIFICAÇÃO ACEITÁVEL									
Galeria	API STAPH V5.0								
Perfil	6 3 3 6 7 5 0								
Nota(s)									
Taxa significativos				% ID	T	Teste(s) discordantes			
Staphylococcus xylosus				89.2	0.57	LAC 85%	RAF 11%	URE 90%	
Taxon seguinte				% ID	T	Teste(s) discordantes			
Staphylococcus lentus				8.3	0.29	LAC 100%	MEL 99%	PAL 21%	

ETA.F

IDENTIFICAÇÃO ACEITÁVEL NO GÊNERO									
Galeria	API STAPH V5.0								
Perfil	6 6 1 4 1 5 2								
Nota(s)									
Taxa significativos				% ID	T	Teste(s) discordantes			
Staphylococcus saprophyticus				51.9	0.73	MAN 88%	PAL 14%		
Staphylococcus hominis				36.7	0.82	NIT 82%			
Taxon seguinte				% ID	T	Teste(s) discordantes			
Staphylococcus aureus				5.0	0.49	MNE 95%	MAN 80%	NIT 83%	ADH 80%
Teste(s) complementare(s)				NOVO R		COL.>5mm		15°C	
Staphylococcus hominis				-		-		-(+)	
Staphylococcus saprophyticus				+		+		+	

3.3.3 Isolados do Reservatório de Pedrouços

As caracterizações bioquímicas obtidas para os isolados do RP estão apresentadas na Tabela A3. 4.

Tabela A3. 4. Resultados devolvidos pela ferramenta apiweb para os isolados do Reservatório de Pedrouços.

RP.bio.A

PERFIL DUVIDOSO

Galeria	API STAPH V5.0									
Perfil	6 3 3 7 7 5 0									
Nota(s)										

Taxa significativos	% ID	T	Teste(s) discordantes							
Staphylococcus lentus	97.8	0.57	LAC	100%	PAL	21%				

Taxon seguinte	% ID	T	Teste(s) discordantes							
Staphylococcus xylosus	2.1	0.41	LAC	85%	MEL	9%	RAF	11%	URE	90%

RP.ag.A

MUITO BOA IDENTIFICAÇÃO

Galeria	API STAPH V5.0									
Perfil	0 0 0 0 0 0 4									
Nota(s)	POSSIBILIDADE DE Dermacoccus OU Kytococcus spp									

Taxa significativos	% ID	T	Teste(s) discordantes							
Micrococcus spp	99.8	1.0								

Taxon seguinte	% ID	T	Teste(s) discordantes							
Kocuria varians/rosea	0.1	0.59	GLU	91%	FRU	92%	NIT	75%		

Teste(s) complementare(s)	OX		AMARELO		ArgA					
Micrococcus luteus	+		+		+					
Micrococcus lylae	+		-		v					
Dermacoccus nishinomiyaensis	+		+		-					
Kytococcus sedentarius	-		+(-)		NT					

RP.ag.C

FRACA DISCRIMINAÇÃO

Galeria	API 20 E V5.0									
Perfil	0 0 0 1 0 0 0									
Nota(s)	POSSIBILIDADE DE Acinetobacter baumannii/calcoaceticus									
	POSSIBILIDADE DE Brucella spp									

Taxa significativos	% ID	T	Teste(s) discordantes							
Pseudomonas oryzihabitans	39.8	0.77	CIT	89%	VP	25%				
Ochrobactrum anthropi	20.1	0.72	VP	15%	OX	90%				
Bordetella/Alcaligenes/Moraxella spp	18.8	0.71	VP	25%	OX	95%				
Non-fermenter spp	17.9	0.7	VP	15%	OX	93%				

Taxon seguinte	% ID	T	Teste(s) discordantes							
Pasteurella pneumotropica/Mannheimia haemolytica	2.8	0.69	VP	7%	OX	80%				

Teste(s) complementare(s)	OF/O		Tween 80		GLUCOSEas		42°C			
Ochrobactrum anthropi	47%		-		+		-(+)			
Bordetella spp	0%		-		2%		+(-)			
Alcaligenes spp	0%		-		-(+)		-(+)			
Moraxella spp	0%		v		2%		v			
Brucella spp	0%		NT		NT		-			
Pseudomonas oryzihabitans	98%		2%		98%		2%			
Acinetobacter baumannii	98%		100%		-(+)		+			
Acinetobacter calcoaceticus	98%		100%		-(-)		-			
Non-fermenter spp	48%		+(-)		+(-)		+(-)			

3.3.4 Isolados do Reservatório de Vila Nova

Para os isolados do RVN, obtiveram-se as identificações bioquímicas presentes na Tabela A3. 5.

Tabela A3. 5. Resultados devolvidos pela ferramenta apiweb para os isolados do Reservatório de Vila Nova.

RVN.bio.B

PERFIL DUVIDOSO									
Galeria	API 20 NE V8.0								
Perfil	0 4 4 4 4 5 5								
Nota(s)	ID.INVÁLIDA ANTES DE 48 H DE INCUBAÇÃO !								
Taxa significativos		% ID	T	Teste(s) discordantes					
Ralstonia pickettii		52.7	0.31	ESC	0%	MANa	10%		
Pseudomonas stutzeri		36.3	0.23	NO3	94%	ESC	0%	MALa	75%
Taxon seguinte		% ID	T	Teste(s) discordantes					
Pseudomonas fluorescens		6.7	0.16	ADH	80%	ESC	1%	MNEa	97%
Teste(s) complementare(s)		NaCl 4%							
Pseudomonas stutzeri		0%							
Ralstonia pickettii		98%							

RVN.ag.A

MUITO BOA IDENTIFICAÇÃO									
Galeria	API STAPH V5.0								
Perfil	0 0 0 0 0 4								
Nota(s)	POSSIBILIDADE DE Dermacoccus OU Kytococcus spp								
Taxa significativos		% ID	T	Teste(s) discordantes					
Micrococcus spp		99.8	1.0						
Taxon seguinte		% ID	T	Teste(s) discordantes					
Kocuria varians/rosea		0.1	0.59	GLU	91%	FRU	92%	NIT	75%
Teste(s) complementare(s)		OX		AMARELO		ArgA			
Micrococcus luteus		+		+		+			
Micrococcus lylae		+		-		v			
Dermacoccus nishinomiyaensis		+		+		-			
Kytococcus sedentarius		-		+(-)		NT			

RVN.ag.B

IDENTIFICAÇÃO ACEITÁVEL									
Galeria	API 20 NE V8.0								
Perfil	0 4 0 0 4 4 0								
Nota(s)	ID.INVÁLIDA ANTES DE 48 H DE INCUBAÇÃO !								
Taxa significativos		% ID	T	Teste(s) discordantes					
Brevundimonas vesicularis		85.8	0.26	GNTa	1%	OX	98%		
Taxon seguinte		% ID	T	Teste(s) discordantes					
Comamonas testosteroni/Pseudomonas alcaligenes		6.9	0.13	NO3	75%	ESC	0%	OX	98%

RVN.ag.C

MUITO BOA IDENTIFICAÇÃO									
Galeria	API 20 NE V8.0								
Perfil	0 4 7 2 3 4 5								
Nota(s)									
Taxa significativos		% ID	T	Teste(s) discordantes					
Stenotrophomonas maltophilia		99.7	0.81	OX	7%				
Taxon seguinte		% ID	T	Teste(s) discordantes					
Sphingomonas paucimobilis		0.2	0.55	GEL	1%	ARAa	83%		

RVN.ag.D	FRACA DISCRIMINAÇÃO						
	Galeria	API 20 NE V8.0					
	Perfil	0 4 6 6 0 4 1					
	Nota(s)	POSSIBILIDADE DE Sphmon.trueperi or adhaesiva					
	Taxa significativos	% ID	T	Teste(s) discordantes			
	Sphingomonas paucimobilis	65.1	0.44	ARAa 83%	MANa 15%	MALa 95%	
	Pseudomonas luteola	34.4	0.32	NO3 78%	ARAa 99%	MALa 76%	GNTa 85%
	Taxon seguinte	% ID	T	Teste(s) discordantes			
	Stenotrophomonas maltophilia	0.4	0.0	GEL 99%	MANa 2%	NAGa 98%	MALa 99%
	Teste(s) complementare(s)	42°C	MAC CONKEY	SACas			
	Pseudomonas luteola	98%	91%	-(+)			
	Sphingomonas paucimobilis	2%	0%	+			

Anexo 4 Curvas de crescimento

4.1 Cálculo da taxa específica de crescimento

Foram traçados os gráficos com os valores do logaritmo neperiano de $DO_{610\text{ nm}}$ ($\ln(DO_{610\text{ nm}})$) em função do tempo, em horas. Com os valores da fase exponencial deste gráfico, efetuou-se uma regressão linear, sendo o declive desta reta a taxa específica de crescimento celular (μ), em h^{-1} , segundo o que se pode retirar da Equação A.3.2, obtida pela integração da Equação A.3.1.

$$\frac{dDO_{610\text{ nm}}}{dt} = \mu \times DO_{610\text{ nm}} \quad (\text{A.3.1})$$

$$\ln(DO_{610\text{ nm}}) = \mu \times t \quad (\text{A.3.2})$$

Com os valores de μ , calcularam-se os tempos de duplicação, t_d , em horas, de acordo com a Equação A.3.3.

$$t_d = \frac{\ln(2)}{\mu} \quad (\text{A.3.3})$$

4.2 Resultados obtidos

Os valores de μ , em h^{-1} , e de t_d , em horas, obtidos para os isolados do Rio Douro e da ETA de Lever encontram-se na Tabela A4. 1. Os resultados obtidos para os isolados dos reservatórios encontram-se na Tabela A4. 2.

Tabela A4. 1. Resultados obtidos para a taxa específica de crescimento e para o tempo de duplicação dos isolados do Rio Douro e da ETA de Lever.

	μ (h^{-1})	t_d (h)
Rio.A	0.59 ± 0.05	1.2 ± 0.1
Rio.B	0.43 ± 0.02	1.60 ± 0.08
Rio.C	0.205 ± 0.009	3.4 ± 0.2
Rio.D	0.325 ± 0.006	2.1 ± 0.04
Rio.E	0.30 ± 0.01	2.33 ± 0.09
Rio.F	0.38 ± 0.02	1.8 ± 0.1
Rio.G	0.32 ± 0.02	2.1 ± 0.1
Rio.H	0.39 ± 0.02	1.80 ± 0.09
Rio.I	0.120 ± 0.003	5.8 ± 0.1
Média	0.340	2.46

	μ (h^{-1})	t_d (h)
ETA.A	0.16 ± 0.02	4.4 ± 0.6
ETA.B	0.13 ± 0.01	5.4 ± 0.5
ETA.C	0.34 ± 0.04	2.1 ± 0.2
ETA.D	0.21 ± 0.02	3.4 ± 0.3
ETA.E	0.088 ± 0.006	7.9 ± 0.5
ETA.F	0.29 ± 0.03	2.4 ± 0.2
Média	0.203	4.27

Tabela A4. 2. Resultados obtidos para a taxa específica de crescimento e para o tempo de duplicação dos isolados dos reservatórios.

	μ (h ⁻¹)	t _d (h)
RP.bio.A	0.28 ± 0.03	2.5 ± 0.3
RP.ag.A	0.079 ± 0.002	8.8 ± 0.2
RP.ag.B	0.32 ± 0.03	2.2 ± 0.2
RP.ag.C	0.162 ± 0.006	4.3 ± 0.2
RP.ag.D	0.101 ± 0.007	6.9 ± 0.5
RP.ag.E	0.107 ± 0.001	6.47 ± 0.08
Média RP.bio	0.279	2.48
Média RP.ag	0.154	5.71

	μ (h ⁻¹)	t _d (h)
RVN.bio.A	0.132 ± 0.005	5.3 ± 0.2
RVN.bio.B	0.48 ± 0.02	1.44 ± 0.08
RVN.ag.A	0.156 ± 0.006	4.4 ± 0.2
RVN.ag.B	0.203 ± 0.005	3.41 ± 0.09
RVN.ag.C	0.21 ± 0.01	3.3 ± 0.2
RVN.ag.D	0.037 ± 0.001	18.6 ± 0.7
Média RVN.bio	0.307	3.36
Média RVN.ag	0.151	7.45

Anexo 5 Fatores de Virulência

5.1 Resultados: capacidade de formação de biofilmes

Os resultados obtidos para a quantificação da biomassa pelo método do CV e para a culturabilidade do biofilme ($\log_{10}$ (UFC/cm²)) para os isolados do Rio, ETA, RP e RVN encontram-se na Tabela A5. 1.

Tabela A5. 1. Quantidade de biomassa e culturabilidade dos biofilmes formados para 0 e 160 rpm.

	Biofilme (0 rpm)		Biofilme (160 rpm)	
	CV (DO ₅₇₀ nm)	$\log_{10}$ (UFC/cm ²)	CV (DO ₅₇₀ nm)	$\log_{10}$ (UFC/cm ²)
Rio.A	1.132 ± 0.088	5.33 ± 0.07	1.266 ± 0.159	7.32 ± 0.04
Rio.B	1.305 ± 0.181	4.99 ± 0.03	1.943 ± 0.141	5.72 ± 0.01
Rio.C	1.402 ± 0.164	5.86 ± 0.04	1.967 ± 0.163	5.70 ± 0.01
Rio.D	0.693 ± 0.122	6.43 ± 0.05	0.920 ± 0.075	6.16 ± 0.03
Rio.E	0.465 ± 0.054	6.26 ± 0.09	0.821 ± 0.115	6.99 ± 0.09
Rio.F	0.418 ± 0.040	6.01 ± 0.10	0.640 ± 0.088	6.14 ± 0.03
Rio.G	0.467 ± 0.073	7.92 ± 0.06	0.646 ± 0.093	8.22 ± 0.07
Rio.H	0.576 ± 0.070	7.32 ± 0.05	0.526 ± 0.039	6.96 ± 0.03
Rio.I	0.446 ± 0.032	6.26 ± 0.05	0.355 ± 0.038	7.88 ± 0.06
ETA.A	1.164 ± 0.100	5.38 ± 0.01	1.191 ± 0.102	5.70 ± 0.01
ETA.B	1.459 ± 0.275	7.36 ± 0.06	2.974 ± 0.518	8.01 ± 0.06
ETA.C	1.341 ± 0.124	5.19 ± 0.07	3.057 ± 0.640	4.89 ± 0.04
ETA.D	1.294 ± 0.256	5.51 ± 0.01	1.273 ± 0.234	4.52 ± 0.01
ETA.E	1.634 ± 0.262	8.19 ± 0.03	1.922 ± 0.239	7.50 ± 0.02
ETA.F	1.274 ± 0.276	6.40 ± 0.01	3.195 ± 0.412	6.26 ± 0.04
RP.bio.A	1.304 ± 0.173	8.42 ± 0.04	1.329 ± 0.188	7.69 ± 0.03
RP.ag.A	1.257 ± 0.289	6.58 ± 0.00	2.091 ± 0.316	6.07 ± 0.02
RP.ag.B	2.317 ± 0.137	7.68 ± 0.02	1.785 ± 0.112	4.3 ± 0.1
RP.ag.C	1.612 ± 0.163	6.78 ± 0.02	1.453 ± 0.287	10.38±0.09
RP.ag.D	2.872 ± 0.776	7.40 ± 0.06	1.976 ± 0.265	7.1 ± 0.1
RP.ag.E	3.109 ± 0.379	7.29 ± 0.08	1.762 ± 0.388	6.99 ± 0.03
RVN.bio.A	2.068 ± 0.274	4.61 ± 0.02	1.824 ± 0.284	4.34 ± 0.04
RVN.bio.B	3.187 ± 0.331	5.47 ± 0.05	1.127 ± 0.049	4.94 ± 0.02
RVN.ag.A	3.419 ± 0.063	4.96 ± 0.03	3.116 ± 0.368	7.37 ± 0.01
RVN.ag.B	1.376 ± 0.116	4.38 ± 0.07	1.126 ± 0.233	4.44 ± 0.07
RVN.ag.C	1.399 ± 0.220	4.98 ± 0.03	1.290 ± 0.049	4.38 ± 0.05
RVN.ag.D	1.636 ± 0.211	4.50 ± 0.05	1.457 ± 0.282	5.35 ± 0.08

5.2 Resultados: mobilidade

Os diâmetros dos halos, em milímetros (mm), obtidos para os três tipos de mobilidade avaliados, para os isolados do Rio Douro e da ETA de Lever, encontram-se na Tabela A5. 2.

Tabela A5. 2. Valores dos diâmetros dos halos de mobilidade para os isolados do Rio Douro e da ETA de Lever.

	Swimming (0.3% agar)			Swarming (0.7% agar)			Twitching (1.5% agar)		
	24 horas	48 horas	72 horas	24 horas	48 horas	72 horas	24 horas	48 horas	72 horas
Rio.A	22 ± 2	33 ± 4	50 ± 5	37.2 ± 0.3	45.5 ± 0.7	50 ± 5	10.5 ± 0.5	11.8 ± 0.8	12.8 ± 0.8
Rio.B	9.2 ± 0.3	24.5 ± 0.5	39 ± 2	11* ± 1	14* ± 1	16* ± 2	12.0* ± 0.0	12.0* ± 0.5	12.3* ± 0.6
Rio.C	9.3 ± 0.3	10.7 ± 0.6	11.8 ± 0.3	10.5 ± 0.5	13 ± 1	14 ± 1	10.7 ± 0.3	11.5 ± 0.5	12.2 ± 0.3
Rio.D	10.8 ± 0.8	12.5 ± 0.9	15 ± 1	13 ± 1	15 ± 1	15.8 ± 0.8	11.8 ± 0.3	12.7 ± 0.3	13.8 ± 0.8
Rio.E	11.3 ± 0.8	13.3 ± 0.6	15 ± 2	13 ± 0.5	14 ± 2	15.5 ± 0.5	11.5* ± 0.5	12* ± 1	12* ± 1
Rio.F	11 ± 1	21 ± 2	28 ± 5	10.8 ± 0.3	12.0 ± 0.5	13 ± 1	10.8 ± 0.6	12 ± 1	13.3 ± 0.6
Rio.G	8.7* ± 0.3	9* ± 0.5	9.7* ± 0.6	9.3* ± 0.6	9.3* ± 0.6	9* ± 1	8.8* ± 0.3	9.2* ± 0.3	9.3* ± 0.6
Rio.H	34 ± 2	54 ± 5	>**	54 ± 3	59 ± 1	67.7 ± 0.6	10* ± 0.5	10.8* ± 0.8	12* ± 2
Rio.I	12.0* ± 0.5	12.7* ± 0.6	12.7* ± 0.6	11.2 ± 0.3	11.7 ± 0.6	15.3 ± 0.6	10.2* ± 0.3	10.7* ± 0.3	11.3* ± 0.6
ETA.A	22.3 ± 0.6	41 ± 1	75 ± 2	8.7 ± 0.6	12 ± 2	17 ± 1	17.7 ± 0.6	39.5 ± 0.7	44 ± 2
ETA.B	27.3 ± 0.6	54 ± 1	67 ± 1	21 ± 1	35 ± 2	>**	13.3 ± 0.6	31 ± 2	32 ± 1
ETA.C	29 ± 2	46 ± 1	60.3 ± 0.6	7.7 ± 0.6	8.3 ± 0.6	8.3 ± 0.6	9.3 ± 0.6	9.7 ± 0.6	11 ± 2
ETA.D	32 ± 2	56 ± 1	>**	75 ± 5	>**	>**	8.3* ± 0.6	8.7* ± 0.6	9.3* ± 0.6
ETA.E	31 ± 3	50 ± 2	51 ± 1	12.3 ± 0.6	14 ± 1	15.3 ± 0.6	10.2* ± 0.8	11* ± 1	12* ± 1
ETA.F	7.3* ± 0.6	8.8* ± 0.8	8.7* ± 0.6	8.3* ± 0.6	9.3* ± 0.6	9.0* ± 0.0	9.3* ± 0.6	9.3* ± 0.6	9* ± 1

*diâmetro semelhante ($p>0.05$) ao diâmetro da gota inicialmente plaqueada.

**diâmetro do halo superior ao diâmetro da placa de Petri (90 mm).

Nota: Os diâmetros dos halos encontram-se em mm.

Para os isolados dos reservatórios, obtiveram-se para os diâmetros dos halos de mobilidade, em mm, os valores apresentados na Tabela A5.

3.

Tabela A5. 3. Valores dos diâmetros dos halos de mobilidade para os isolados dos reservatórios.

	Swimming (0.3% agar)			Swarming (0.7% agar)			Twitching (1.5% agar)		
	24 horas	48 horas	72 horas	24 horas	48 horas	72 horas	24 horas	48 horas	72 horas
RP.bio.A	14 ± 1	30 ± 2	46 ± 2	7.3* ± 0.6	7.3* ± 0.6	7.7* ± 0.6	8.7* ± 0.6	9.7* ± 0.6	10* ± 2
RP.ag.A	5.0* ± 0.0	5.3* ± 0.6	5.7* ± 0.6	8.3* ± 0.6	9* ± 1	9* ± 1	9.3* ± 0.6	9.3* ± 0.6	9.7* ± 0.6
RP.ag.B	5.3* ± 0.6	5.3* ± 0.6	5.3* ± 0.6	7.3* ± 0.6	7.7* ± 0.6	7.7* ± 0.6	9.3* ± 0.6	9.3* ± 0.6	9.7* ± 0.6
RP.ag.C	4.7 ± 0.6	17 ± 2	19 ± 2	7* ± 1	7.3* ± 0.6	8* ± 1	11* ± 2	11* ± 1	11* ± 2
RP.ag.D	5.7 ± 0.6	23 ± 3	38 ± 2	7.3 ± 0.6	7.3 ± 0.6	15.5 ± 0.5	8.3* ± 0.6	8.7* ± 0.6	10* ± 1
RP.ag.E	12 ± 1	20.3 ± 0.6	25 ± 1	6.7* ± 0.6	7.3* ± 0.6	7.3* ± 0.6	7.3* ± 0.6	8.3* ± 0.6	8.3* ± 0.6
RVN.bio.A	5.7* ± 0.6	5.7* ± 0.6	5.7* ± 0.6	13* ± 2	14.7* ± 0.6	14.3* ± 0.6	9.7* ± 0.6	10* ± 1	11* ± 2
RVN.bio.B	9 ± 1	13 ± 1	16 ± 1	12* ± 2	12* ± 1	12* ± 1	10.7* ± 0.6	13* ± 2	13.7* ± 0.6
RVN.ag.A	5.3* ± 0.6	5.3* ± 0.6	5.7* ± 0.6	10* ± 1	10.7* ± 0.6	11* ± 2	9.3* ± 0.6	12* ± 2	12* ± 2
RVN.ag.B	5.7 ± 0.6	9.3 ± 0.6	13.3 ± 0.6	11* ± 2	11* ± 2	11* ± 3	10* ± 1	11* ± 1	12* ± 1
RVN.ag.C	10.7 ± 0.6	16.0 ± 0.0	21.0 ± 0.0	9.0 ± 0.0	13.0 ± 0.0	15.3 ± 0.6	14.3 ± 0.6	20 ± 1	22 ± 1
RVN.ag.D	6.0 ± 0.0	6.0 ± 0.0	6.7 ± 0.6	11 ± 2	11 ± 2	13 ± 3	9 ± 1	10.7 ± 0.6	11 ± 1

*diâmetro semelhante ($p > 0.05$) ao diâmetro da gota inicialmente plaqueada.

Nota: Os diâmetros dos halos encontram-se em mm.

Anexo 6 Suscetibilidade aos antibióticos

6.1 Classificação dos isolados: intervalos de referência

Os intervalos de referência para cada antibiótico testado foram obtidos tendo em conta as tabelas de interpretação dos diâmetros dos halos do método da difusão em disco dos seguintes documentos do CLSI:

- M45 - *Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria*;
- M100-S25 - *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement*.

Verificou-se, para cada microrganismo ou grupo de microrganismos, quais os intervalos de referência para os diâmetros dos halos correspondentes às diferentes classificações possíveis: suscetível (S), resistência intermédia (I) ou resistente (R). Para cada antibiótico, no caso de existirem intervalos de referência diferentes, consideraram-se os valores extremos:

- Para os intervalos que classificam o isolado como suscetível, selecionou-se como limite inferior o diâmetro de maior valor entre os vários valores de referência;
- Para os intervalos que classificam o isolado como resistente, selecionou-se como limite superior o diâmetro de menor valor entre os vários valores de referência.

Na Tabela A6. 1, é apresentado um exemplo da forma como foram selecionados os intervalos de referência, para cada antibiótico.

Tabela A6. 1. Exemplo da seleção dos intervalos de referência para classificação dos isolados quanto à suscetibilidade a antibióticos.

	<i>Enterobacteriaceae</i>			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			Intervalo de Referência		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R
Ceftazidima	≥ 21	16-20	≤ 17	≥ 18	15-17	≤ 14	≥ 21	15-20	≤ 14

Os valores de referência para os antibióticos avaliados contra as bactérias Gram negativas e Gram positivas encontram-se nas Tabela A6. 2 e Tabela A6. 3, respetivamente.

Tabela A6. 2. Intervalos de referência considerados para a classificação dos isolados Gram negativos como suscetíveis (S), com resistência intermédia (I) ou como resistentes (R).

	S	I	R
GAT	≥ 18	15-17	≤ 14
F	≥ 17	15-16	≤ 14
MN	≥ 19	13-18	≤ 12
NET	≥ 15	13-14	≤ 12
TC	≥ 24	15-23	≤ 14
MRP	≥ 23	15-22	≤ 14
CIN	≥ 19	15-18	≤ 14
AZM	≥ 13	-	≤ 12

	S	I	R
TZP	≥ 21	15-20	≤ 14
TTC	≥ 24	15-23	≤ 14
CN	≥ 15	13-14	≤ 12
AK	≥ 17	15-16	≤ 14
CAZ	≥ 21	15-20	≤ 14
TE	≥ 15	12-14	≤ 11
SXT	≥ 16	11-15	≤ 10
C	≥ 18	13-17	≤ 12

Tabela A6. 3. Intervalos de referência considerados para a classificação dos isolados Gram positivos como suscetíveis (S), com resistência intermédia (I) ou como resistentes (R).

	S	I	R
LNZ	≥ 23	21-22	≤ 20
QDA	≥ 19	16-18	≤ 15
VA	≥ 17	15-16	≤ 14
TEC	≥ 14	11-13	≤ 10
RD	≥ 20	17-19	≤ 16
E	≥ 23	14-22	≤ 13

	S	I	R
P	≥ 29	-	≤ 28
CPT	≥ 24	21-23	≤ 20
TE	≥ 19	15-18	≤ 14
SXT	≥ 16	11-15	≤ 10
C	≥ 18	13-17	≤ 12

6.2 Diâmetros dos halos obtidos

Os diâmetros dos halos obtidos para o método da difusão em disco para os isolados dos diferentes locais de amostragem encontram-se nas Tabela A6. 4 a Tabela A6. 7.

Tabela A6. 4. Valores dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento para os isolados do Rio Douro.

Gram Negativo					Gram Positivo		
	Rio.D	Rio.E	Rio.H	Rio.I		Rio.B	Rio.F
GAT	35 ± 2	34.3 ± 0.8	40 ± 1	40 ± 1	LNZ	34.7 ± 0.6	33.7 ± 0.6
F	27 ± 1	23.7 ± 0.8	27.7 ± 0.6	29 ± 1	QDA	20.8 ± 0.3	21.7 ± 0.6
MN	37 ± 1	35 ± 1	31.7 ± 0.6	29.7 ± 0.6	VA	20.0 ± 0.0	18.8 ± 0.3
NET	32.7 ± 0.3	12.3 ± 0.8	29 ± 1	17.7 ± 0.6	TEC	18.7 ± 0.6	19.8 ± 0.3
TC	25 ± 4	n.d.	33.3 ± 0.6	n.d.	RD	20.7 ± 0.6	19.3 ± 0.6
MRP	34.5 ± 0.9	n.d.	33.3 ± 0.6	n.d.	E	29.3 ± 0.6	28 ± 1
CIN	22.5 ± 0.5	10.0 ± 0.9	30 ± 1	9.3 ± 0.6	P	12.0 ± 1.0	8.7 ± 0.6
AZM	31 ± 2	14.8 ± 0.3	28.3 ± 0.6	21.7 ± 0.6	CPT	15.7 ± 0.6	14.5 ± 0.5
TZP	30.7 ± 0.8	21.8 ± 0.8	30.7 ± 0.6	22.7 ± 0.6	TE	24.3 ± 0.6	27 ± 3
TTC	24.5 ± 0.5	n.d.	34 ± 2	n.d.	SXT	24 ± 2	28 ± 2
CN	26.3 ± 0.6	12.2 ± 0.3	26 ± 1	16 ± 1	C	25.7 ± 0.6	29 ± 2
AK	29 ± 1	14.0 ± 0.5	26.0 ± 0.0	18.3 ± 0.6			
CAZ	n.d.	17.8 ± 0.3	9.7 ± 0.6	17.0 ± 0.0			
TE	34.3 ± 0.6	19.3 ± 0.6	21.7 ± 0.6	18.0 ± 0.0			
SXT	35 ± 3	32 ± 1	37 ± 1	35.3 ± 0.6			
C	19 ± 1	24 ± 1	30.7 ± 0.6	28 ± 2			

n.d. - não detetado (sem halo de inibição do crescimento).

Nota: os diâmetros dos halos apresentados encontram-se em mm.

Tabela A6. 5. Valores dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento para os isolados da ETA de Lever

	Gram Positivo					
	ETA.A	ETA.B	ETA.C	ETA.D	ETA.E	ETA.F
LNZ	32 ± 1	12.7 ± 0.5	39 ± 1	33 ± 2	13.0 ± 0.0	38.0 ± 1.0
QDA	20.3 ± 0.6	n.d.	15.3 ± 0.6	22 ± 1	n.d.	30.3 ± 0.6
VA	19.7 ± 0.6	n.d.	21.3 ± 0.6	20.7 ± 0.6	n.d.	22.3 ± 0.6
TEC	24.7 ± 1.2	n.d.	19 ± 1	21 ± 2	n.d.	20.0 ± 1.0
RD	23.0 ± 0.0	12.0 ± 1.0	18.7 ± 0.6	23.7 ± 0.6	16 ± 4	39.7 ± 0.6
E	22 ± 1	10.0 ± 1.7	n.d.	22.7 ± 0.6	n.d.	28.7 ± 1.5
P	34.0 ± 0.0	n.d.	10 ± 1	32.3 ± 0.6	n.d.	29.3 ± 0.6
CPT	23.3 ± 0.6	18.0 ± 1.0	14 ± 2	22.7 ± 0.6	19.7 ± 0.6	34.7 ± 0.6
TE	27 ± 2	20.7 ± 0.6	19.3 ± 0.6	26.3 ± 0.6	25 ± 1	30.3 ± 0.6
SXT	40 ± 1	28.3 ± 0.6	34.3 ± 0.6	40.7 ± 0.6	32 ± 3	34.0 ± 1.0
C	20.7 ± 0.6	30.7 ± 0.6	16.7 ± 0.6	21.3 ± 0.6	29 ± 1	29.0 ± 1.0

n.d. - não detetado (sem halo de inibição do crescimento).

Nota: os diâmetros dos halos apresentados encontram-se em mm.

Tabela A6. 6. Valores dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento para os isolados do Reservatório de Pedrouços.

	Gram Negativo		Gram Positivo				
	RP.ag.C		RP.bio.A	RP.ag.A	RP.ag.B	RP.ag.D	RP.ag.E
GAT	37.7 ± 0.6	LNZ	11.3 ± 0.6	43 ± 2	11.7 ± 0.6	11.7 ± 0.6	9.7 ± 0.6
F	34 ± 1	QDA	n.d.	37 ± 1	n.d.	n.d.	n.d.
MN	28 ± 2	VA	n.d.	24.7 ± 0.6	n.d.	n.d.	12 ± 2
NET	30.7 ± 0.6	TEC	n.d.	25 ± 1	n.d.	n.d.	n.d.
TC	52 ± 1	RD	12.7 ± 0.6	42.3 ± 0.6	n.d.	n.d.	26 ± 2
MRP	34.3 ± 0.6	E	8.3 ± 0.6	10.3 ± 0.6	8.3 ± 0.6	8.7 ± 0.6	9 ± 1
CIN	n.d.	P	n.d.	43 ± 1	n.d.	n.d.	16 ± 1
AZM	28 ± 1	CPT	19 ± 1	41.3 ± 0.6	17.7 ± 0.6	21 ± 1	24 ± 2
TZP	44.3 ± 0.6	TE	16 ± 2	28.3 ± 0.6	15.7 ± 0.6	21 ± 2	28 ± 1
TTC	51 ± 1	SXT	27.3 ± 0.6	38 ± 2	23 ± 1	31 ± 1	34 ± 1
CN	27.3 ± 0.6	C	26.3 ± 0.6	36 ± 1	25 ± 1	28 ± 2	36.7 ± 0.6
AK	27 ± 1						
CAZ	7.7 ± 0.6						
TE	32 ± 1						
SXT	39 ± 1						
C	28 ± 2						

n.d. - não detetado (sem halo de inibição do crescimento).

Nota: os diâmetros dos halos apresentados encontram-se em mm.

Tabela A6. 7. Valores dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento para os isolados do Reservatório de Vila Nova.

	Gram Negativo		
	RVN.bio.B	RVN.ag.C	RVN.ag.D
GAT	34.7 ± 0.6	43 ± 1	50 ± 2
F	n.d.	n.d.	n.d.
MN	24 ± 1	37 ± 2	47 ± 2
NET	33 ± 2	39.7 ± 0.6	44 ± 2
TC	n.d.	39.3 ± 0.6	47.7 ± 0.6
MRP	35 ± 3	32.7 ± 0.6	42 ± 2
CIN	n.d.	22 ± 2	31 ± 2
AZM	23 ± 1	45.7 ± 0.6	28.7 ± 0.6
TZP	33 ± 1	27 ± 1	32 ± 3
TTC	n.d.	39.3 ± 0.6	47 ± 2
CN	29 ± 2	31.3 ± 0.6	32 ± 2
AK	37 ± 2	33.7 ± 0.6	33 ± 2
CAZ	12.3 ± 0.6	18.0 ± 0.0	n.d.
TE	20 ± 1	19.3 ± 0.6	22 ± 2
SXT	14.3 ± 0.6	25.3 ± 0.6	37 ± 3
C	19 ± 2	29 ± 1	37 ± 2

n.d. - não detetado (sem halo de inibição do crescimento).

Nota: os diâmetros dos halos apresentados encontram-se em mm.

Anexo 7 Resultados da exposição a glifosato

7.1 Produção de proteases, gelatinases e sideróforos

Os diâmetros dos halos, em mm, no caso da produção de proteases e gelatinases, e os resultados qualitativos, no que diz respeito à produção de sideróforos, para as células expostas ao glifosato e para as do controlo, encontram-se na Tabela A7. 1.

Tabela A7. 1. Efeitos da exposição ao glifosato na produção de proteases, gelatinases e sideróforos.

			Proteases	Gelatinases	Sideróforos
	Rio Douro	Controlo	31 ± 1	24 ± 2	+
		70 mg/L	36.3 ± 0.6	26.7 ± 0.6	n.d.
	ETA de Lever	Controlo	-	12 ± 1	n.d.
		70 mg/L	-	12.3 ± 0.6	n.d.
Reservatório de Pedrouços	Biofilme	Controlo	33 ± 3	38 ± 2	+
		70 mg/L	34 ± 2	34 ± 2	+
	Água	Controlo	-	14 ± 1	-
		70 mg/L	-	14 ± 2	-
Reservatório de Vila Nova	Biofilme	Controlo	-	-	n.d.
		70 mg/L	-	-	n.d.
	Água	Controlo	33 ± 2	14.7 ± 0.6	-
		70 mg/L	36 ± 2	15 ± 2	-

n.d. - não detetado (sem crescimento).

*halos cor de laranja.

Nota: os diâmetros dos halos apresentados encontram-se em mm.

7.2 Mobilidade

Na Tabela A7. 2, estão presentes os diâmetros dos halos, em mm, obtidos para as células expostas e as do controlo para os tipos de mobilidade estudados.

Tabela A7. 2. Efeitos da exposição ao glifosato nos diâmetros dos halos de mobilidade.

			Swimming (0.3% agar)			Swarming (0.7% agar)			Twitching (1.5% agar)		
			24 horas	48 horas	72 horas	24 horas	48 horas	72 horas	24 horas	48 horas	72 horas
Reservatório de Pedrouços	Rio Douro	Controlo	20 ± 2	39 ± 1	51 ± 1	11 ± 1	14 ± 1	16 ± 2	10.3 ± 0.6	12.3 ± 0.6	13.3 ± 0.6
		70 mg/L	8.7 ± 0.6	10.7 ± 0.6	15 ± 1	9 ± 1	9.3 ± 0.6	10.7 ± 0.6	10.3 ± 0.6	11 ± 1	12 ± 1
	ETA de Lever	Controlo	16 ± 1	28 ± 1	43 ± 2	7.7 ± 0.6	8.3 ± 0.6	8.3 ± 0.6	9.3 ± 0.6	9.7 ± 0.6	11 ± 2
		70 mg/L	22 ± 3	35 ± 1	>	10.7 ± 0.6	12 ± 1	12.3 ± 0.6	9 ± 1	9.7 ± 0.6	9.7 ± 0.6
	Biofilme	Controlo	22.3 ± 0.6	47 ± 2	62 ± 3	13 ± 1	13.3 ± 0.6	14 ± 1	11.0 ± 0.0	12.7 ± 0.6	14.7 ± 0.6
		70 mg/L	20.7 ± 0.6	39 ± 2	52 ± 2	13 ± 1	13.7 ± 0.6	14 ± 1	15.3 ± 0.6	20 ± 2	21 ± 1
	Água	Controlo	12 ± 1	20.3 ± 0.6	25 ± 1	8.7 ± 0.6	12 ± 2	12 ± 1	10 ± 1	12 ± 1	13 ± 2
		70 mg/L	11.7 ± 0.6	19 ± 2	21 ± 2	10 ± 1	13 ± 1	13.3 ± 0.6	8.7 ± 0.6	10.7 ± 0.6	11 ± 1
Reservatório de Vila Nova	Biofilme	Controlo	6.3 ± 0.6	8 ± 1	8.7 ± 0.6	7.7 ± 0.6	9.3 ± 0.6	9.3 ± 0.6	9.7 ± 0.6	11 ± 1	11 ± 2
		70 mg/L	7.0 ± 0.0	7.3 ± 0.6	7.7 ± 0.6	7.7 ± 0.6	8.0 ± 0.0	8 ± 1	9.7 ± 0.6	11 ± 1	12 ± 1
	Água	Controlo	10.7 ± 0.6	17 ± 1	23 ± 1	8.0 ± 0.0	13.0 ± 0.0	15.3 ± 0.6	14.3 ± 0.6	20 ± 1	22 ± 1
		70 mg/L	10.7 ± 0.6	17.0 ± 0.0	24.0 ± 0.0	9.0 ± 0.0	12.7 ± 0.6	17 ± 1	13.3 ± 0.6	20 ± 1	21 ± 2

*diâmetro do halo superior ao diâmetro da placa de Petri (90 mm).

Nota: os diâmetros dos halos apresentados encontram-se em mm.

7.3 Suscetibilidade aos antibióticos

Na Tabela A7. 3, podem ser consultados os diâmetros dos halos, em mm, obtidos através do método da difusão em disco para cada antibiótico testado, quer para as células do controlo, quer para as células após exposição ao glifosato.

Tabela A7. 3. Efeitos da exposição ao glifosato nos diâmetros dos halos de inibição do crescimento para os antibióticos testados.

	RVN Água			Rio Douro		ETA de Lever		RP Biofilme		RP Água	
	Controlo	70 mg/L		Controlo	70 mg/L	Controlo	70 mg/L	Controlo	70 mg/L	Controlo	70 mg/L
GAT	35 ± 1	35 ± 2	LNZ	31.7 ± 0.6	35.0 ± 0.0	37 ± 3	34 ± 1	11.7 ± 0.6	11.7 ± 0.6	9.7 ± 0.6	8.3 ± 0.6
F	7.3 ± 0.6	7 ± 1	QDA	19.3 ± 0.6	20.3 ± 0.6	13 ± 1	13.7 ± 0.6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
MN	34.7 ± 0.6	35 ± 1	VA	19 ± 1	21.3 ± 0.6	21 ± 1	19.7 ± 0.6	n.d.	n.d.	12 ± 2	12.3 ± 0.6
NET	32.3 ± 0.6	30 ± 1	TEC	17 ± 1	21 ± 1	17.7 ± 0.6	18 ± 1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
TC	39.3 ± 0.6	38 ± 1	RD	19.7 ± 0.6	21 ± 1	19.7 ± 0.6	17 ± 2	14 ± 1	12.7 ± 0.6	26 ± 2	24 ± 1
MRP	33 ± 1	33 ± 2	E	27 ± 2	33 ± 3	n.d.	n.d.	8 ± 1	7.0 ± 0.0	9 ± 1	8.7 ± 0.6
CIN	28 ± 2	28.7 ± 0.6	P	9 ± 1	14 ± 1	13 ± 3	10 ± 2	n.d.	n.d.	16 ± 1	16.3 ± 0.6
AZM	24 ± 1	27 ± 1	CPT	13.3 ± 0.6	16 ± 2	17 ± 1	16 ± 1	18 ± 1	17.0 ± 0.0	24 ± 2	25.7 ± 0.6
TZP	20 ± 1	21.7 ± 0.6	TE	20.7 ± 0.6	23.0 ± 0.0	22 ± 1	22.3 ± 0.6	20 ± 1	17 ± 2	28 ± 1	24.7 ± 0.6
TTC	39 ± 1	39 ± 2	SXT	13.7 ± 0.6	24 ± 1	35 ± 1	36 ± 1	26 ± 2	24.7 ± 0.6	34 ± 1	22 ± 2
CN	27 ± 2	27 ± 2	C	22 ± 1	27 ± 1	19 ± 2	19.7 ± 0.6	26 ± 1	24.7 ± 0.6	36.7 ± 0.6	35 ± 2
AK	33 ± 1	31 ± 2									
CAZ	20.7 ± 1	20.3 ± 0.6									
TE	28 ± 1	24.7 ± 0.6									
SXT	34 ± 1	22 ± 2									
C	36.7 ± 0.6	35 ± 2									

n.d. - não detetado (sem halo de inibição do crescimento).

Nota: os diâmetros dos halos apresentados encontram-se em mm.

Anexo 8 Ensaios de Coagregação

8.1 Materiais e Métodos

As bactérias foram inoculadas (cultura *batch*) em R2A *broth* (200 mL), a $23 \pm 3^\circ\text{C}$, sob condições de agitação (160 rpm) num agitador orbital (*Sigma Aldrich*, IKA KS 130 basic), até ser atingido o estado estacionário. Após crescimento, as células foram recolhidas por centrifugação (*Eppendorf centrifuge* 5810R), durante 20 minutos, a 3777 g e lavadas três vezes com água destilada estéril. Seguiu-se a ressuspensão das bactérias em água destilada, de forma a obter uma densidade ótica, a 600 nm, de 1 ($\text{DO}_{600\text{ nm}} = 1$) [1].

Para avaliação da coagregação, foram misturadas, duas a duas, as suspensões bacterianas obtidas (os isolados provenientes de diferentes locais de amostragem não foram misturados), colocando volumes iguais de cada uma (3 mL) em tubos de ensaio. Realizaram-se controlos para os diferentes isolados, de forma a avaliar a autoagregação, colocando 6 mL de cada suspensão bacteriana no tubo de ensaio. Os tubos foram agitados num agitador *Vortex*, por 10 segundos, e foram deixados à temperatura ambiente. A auto e coagregação foram avaliadas ao longo do tempo (2, 24 e 48 h), agitando as suspensões num agitador *Vortex* (aproximadamente 10 segundos) e atribuindo uma pontuação de 0 a 4+ [2], de acordo com a seguinte escala:

- 0, sem agregados visíveis;
- 1+, agregados uniformes muito pequenos em suspensão, tipicamente visíveis apenas com recurso a uma lupa;
- 2+, agregados definidos, facilmente visíveis, mas com uma suspensão turva sem deposição dos agregados;
- 3+, agregados grandes formados com alguma deposição;
- 4+, agregados grandes que depositam rapidamente, ficando um sobrenadante límpido.

[1] Simões, L. C., Simões, M., & Vieira, M. J. (2008). Intergeneric coaggregation among drinking water bacteria: evidence of a role for *Acinetobacter calcoaceticus* as a bridging bacterium. *Applied and environmental microbiology*, 74(4), 1259-1263.

[2] Cisar, J. O., Kolenbrander, P. E., & McIntire, F. C. (1979). Specificity of coaggregation reactions between human oral streptococci and strains of *Actinomyces viscosus* or *Actinomyces naeslundii*. *Infection and immunity*, 24(3), 742-752.

8.2 Resultados

Este ensaio apenas foi realizado para os isolados obtidos a partir do Rio Douro e da ETA de Lever. Os resultados obtidos, ao fim de 2, 24 e 48 horas, para os isolados do Rio Douro encontram-se na Tabela A8. 1 e para os isolados da ETA na Tabela A8. 2.

Tabela A8. 1. Resultados obtidos para os ensaios de coagregação efetuados com os isolados do Rio Douro.

Rio Douro																											
Tempo (horas)	A			B			C			D			E			F			G			H			I		
	2	24	48	2	24	48	2	24	48	2	24	48	2	24	48	2	24	48	2	24	48	2	24	48	2	24	48
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0/1	0	0	0	0/1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			B	0	0	0	0	0	0	0/1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
				C	0	0	0	1	1	0/1	0	0	0	0	0	0/1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
					D	1	1	1/2	1	1	1/2	1	0/1	0/1	1	1	1	0/1	0/1	1	0/1	0/1	1	0/1	1	1/2	1/2
						E	0	0	0	0	0	0	0/1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
							F	0/1	0/1	0/1	0	0	0/1	0	0	0/1	0	0	0/1	0	0	0	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
								G	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
									H	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
										I	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabela A8. 2. Resultados obtidos para os ensaios de coagregação efetuados com os isolados da ETA de Lever.

ETA de Lever																		
	A			B			C			D			E			F		
Tempo (horas)	2	24	48	2	24	48	2	24	48	2	24	48	2	24	48	2	24	48
A	0	0	0	0	0	0	2	2	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0
			B	0	0	0	2	2/3	2/3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
				C	2	3	3	2	2	2	2	1/2	1/2	1	1	1	1	1
					D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
						E	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
							F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Anexo 9 Fotografias

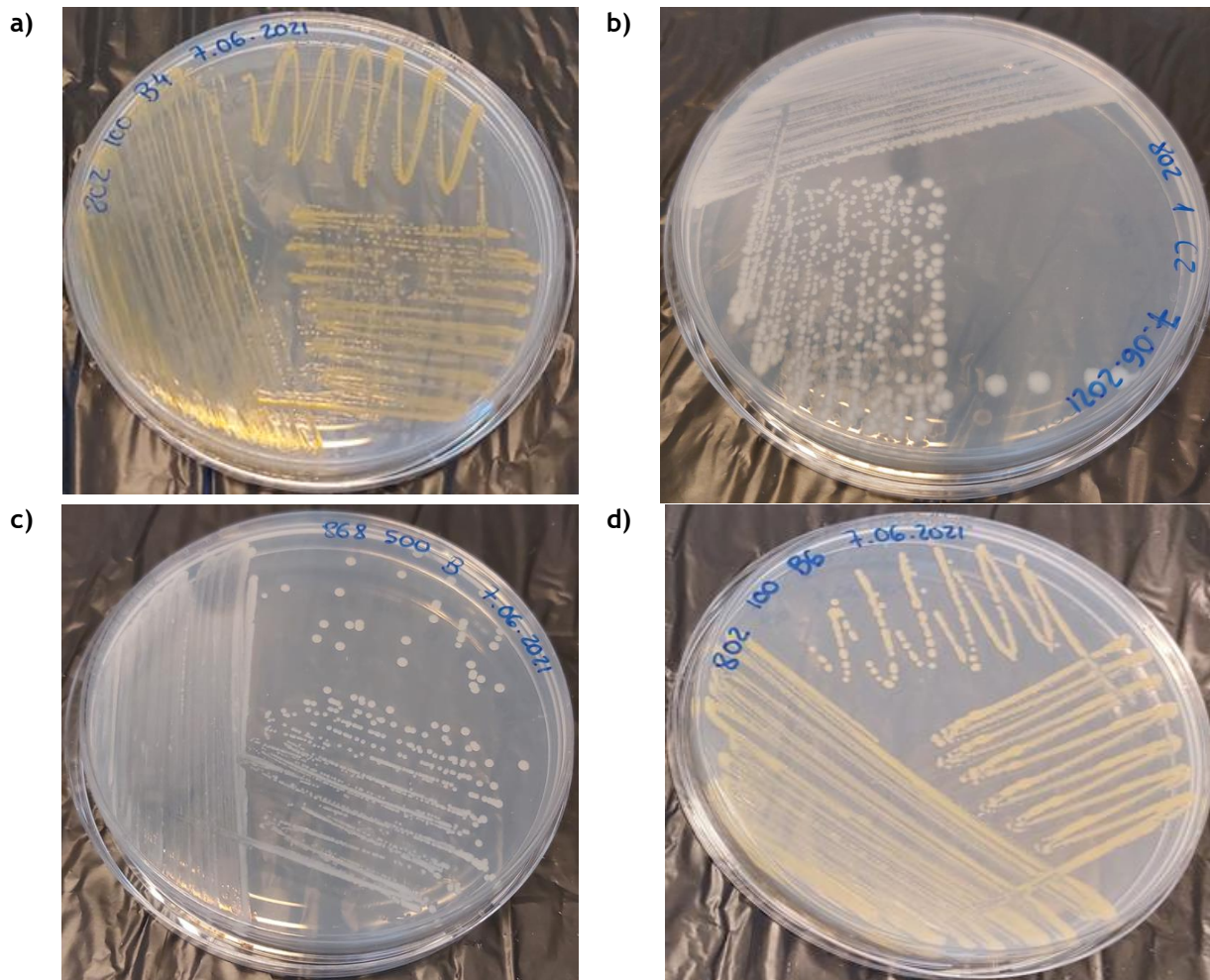


Figura A9. 1. Exemplos de morfologias de colônias obtidas.

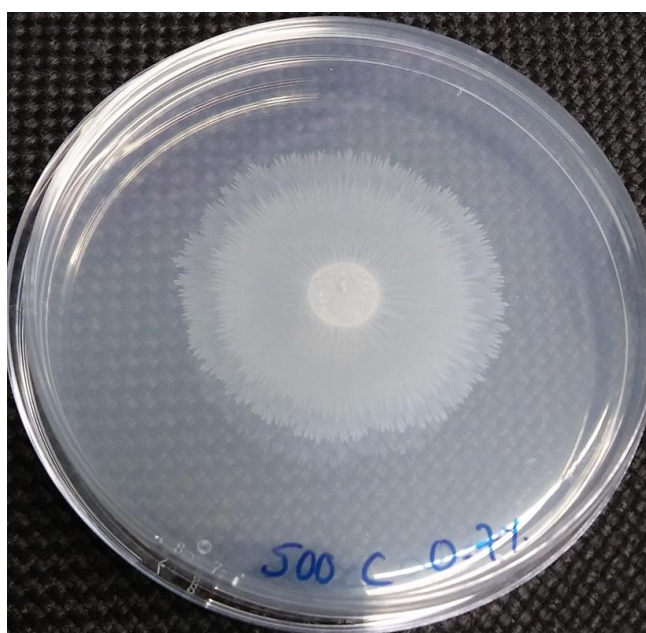


Figura A9. 2. Exemplo de halo de mobilidade (mobilidade do tipo swarming).

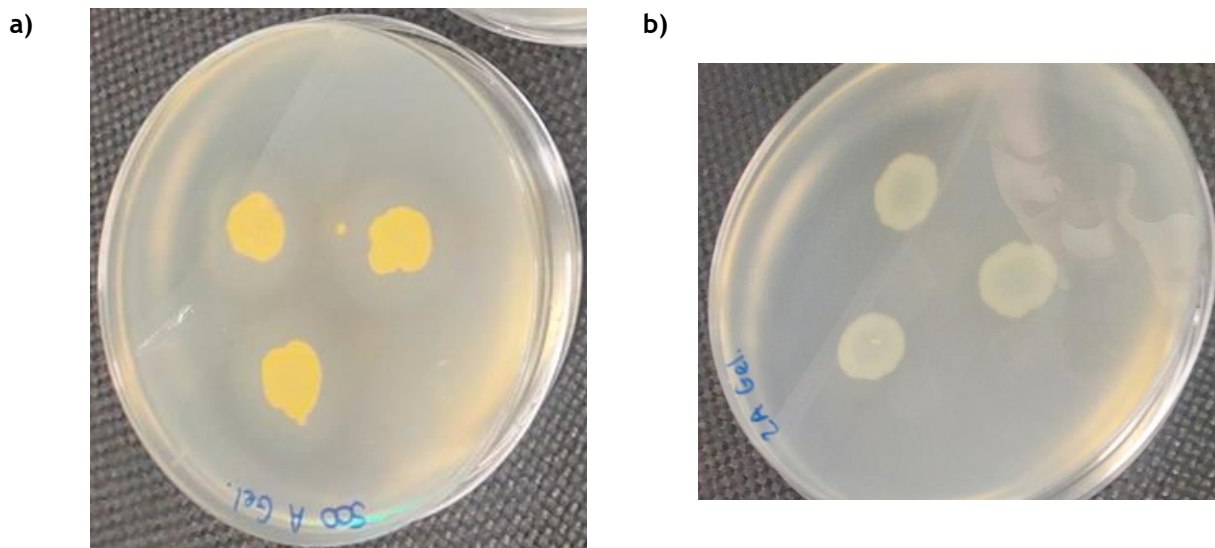


Figura A9. 3. Exemplos de um resultado positivo (a) e de um resultado negativo (b) para a produção de gelatinases.

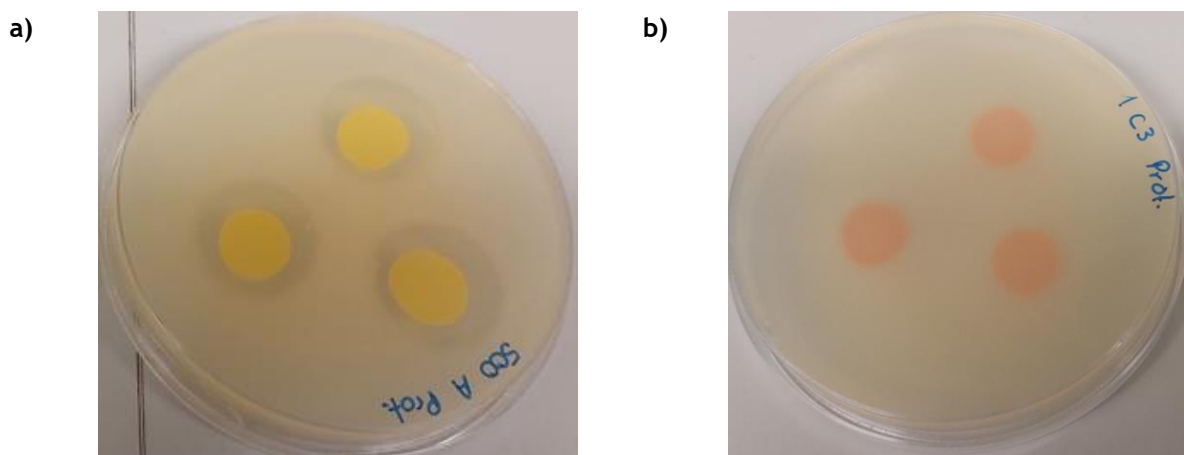


Figura A9. 4. Exemplos de um resultado positivo (a) e de um resultado negativo (b) para a produção de proteases.

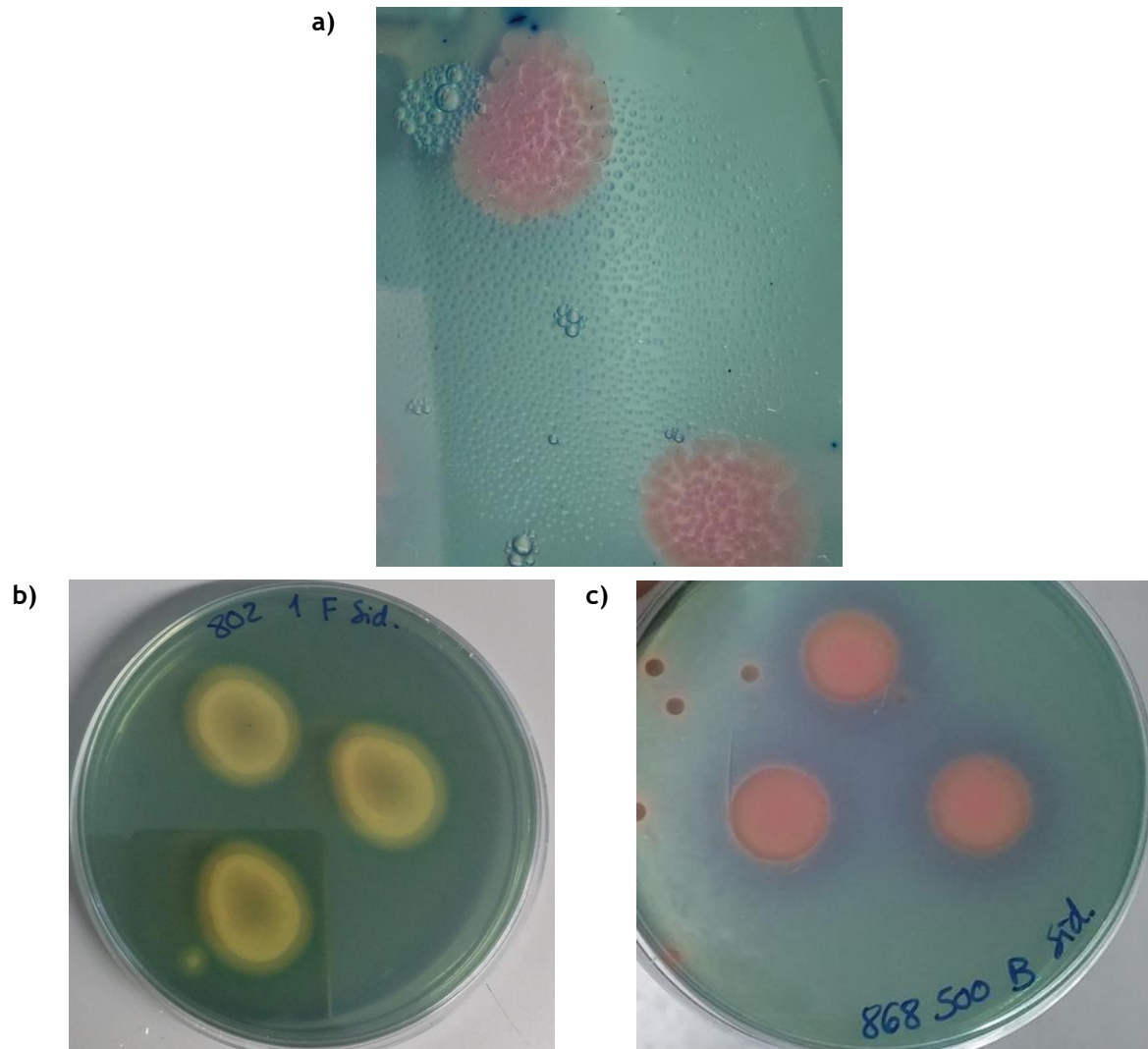


Figura A9. 5. Exemplos de um resultado negativo (a) e de resultados positivos para a produção de sideróforos do tipo hidroxamatos (b) e do tipo catecóis (c).



Figura A9. 6. Exemplos de galerias API 20 E, após incubação.



Figura A9. 7. Exemplos de galerias API 20 NE, após incubação.



Figura A9. 8. Exemplos de galerias API Staph, após incubação.



Figura A9. 9. Exemplos de galerias API 20 Strep, após incubação.