

Mestrado Integrado em Engenharia Química

Avaliação da capacidade de microrganismos presentes em água residual afluyente e lamas activadas degradarem a ciprofloxacina

Tese de Mestrado

desenvolvida no âmbito da disciplina de

Projecto de Desenvolvimento em Ambiente Académico

Diana Isabel Soares Ribeiro



Universidade do Porto

Faculdade de Engenharia

FEUP

Departamento de Engenharia Química

Orientador: Doutora Olga Nunes

Julho de 2008

Agradecimentos

A minha primeira palavra de agradecimento vai para o meu namorado, para a minha família e amigos, por todo o apoio que me deram e por sempre terem acreditado no meu trabalho.

Expresso o meu sincero agradecimento, à minha orientadora, Doutora Olga Nunes, que, com o seu largo profissionalismo, responsabilidade, largo saber e experiência, me orientou e entusiasmou, ajudando-me a dissipar dúvidas e a fazer opções nos momentos de incerteza. Agradeço-lhe pela oportunidade cedida, por todo o apoio e pela disponibilidade tanto de tempo, como de recursos, sem os quais este projecto não teria sido exequível.

Um agradecimento, muito especial, à Doutora Luisa Barreiros, não só pela forma como contribuiu para a realização deste projecto, mas também pela sua disponibilidade, paciência, experiência, conselhos, recomendações, amabilidade, correcção e compreensão, perante algumas dúvidas e dificuldades, em resumo, por todo o apoio prestado, sempre que necessitei.

Uma palavra também de gratidão e agradecimento, à Ana, pela ajuda no método de antibiograma, à Cátia, pelo apoio na sequenciação do gene 16S rRNA, à Ivone, pela ajuda nos géis de DGGE, à Márcia, à Rita e à Vânia, pelo apoio na quantificação do antibiótico, em suma, a todas pelo auxílio no momento certo, por toda a amabilidade, consideração, cumplicidade, força, generosidade, positivismo, disponibilidade, motivação e pelo excelente ambiente de trabalho criado e proporcionado por todas elas, sem as quais, a realização deste projecto teria sido menos conseguida.

Por fim, a todos aqueles, que directa ou indirectamente me apoiaram e que me acompanharam nesta importante etapa da minha vida e que sempre estiveram presentes ao longo deste percurso, o meu sincero reconhecimento e agradecimento.

Resumo

Um dos objectivos deste projecto foi caracterizar a população bacteriana total e cultivável, na presença e ausência de antibiótico de uma estação de tratamento de águas residuais, ETAR, da região Norte de Portugal, por electroforese em gel com gradiente desnaturante, DGGE, um método independente do cultivo e neste estudo, identificaram-se 34 géneros e/ou espécies microbiológicas. Constatou-se que a população bacteriana total da ETAR é diferente da cultivável, uma vez que, em ambas as caracterizações não existem géneros e/ou espécies microbiológicas iguais.

Outro dos objectivos deste projecto foi avaliar a capacidade dos microrganismos presentes na água residual afluente e nas lamas activadas dessa ETAR degradarem um antibiótico específico, a ciprofloxacina. O método usado para isolar esses organismos prendeu-se com a adição de uma elevada quantidade de antibiótico, através do método de enriquecimento, à população bacteriana dessa mesma ETAR. Usou-se os microrganismos da água residual afluente e das lamas activadas, para avaliar a presença de bactérias resistentes ao antibiótico e conseguiu avaliar-se essa capacidade, através da obtenção de isolados das culturas mistas finais dos enriquecimentos, resistentes à ciprofloxacina.

Por último, pretendeu fazer-se a caracterização total e cultivável, também por DGGE, na presença e ausência de antibiótico, da população bacteriana das culturas mistas finais dos enriquecimentos, identificando-se 11 géneros e/ou espécies microbiológicas. As bactérias A-22 e SVAL 2.36 e as espécies *Comamonas testosteroni* e *Pseudomonas aeruginosa*, apresentam-se, tanto na população bacteriana total e cultivável das culturas mistas finais dos enriquecimentos, como na caracterização da ETAR.

Das culturas mistas finais dos enriquecimentos, seleccionaram-se 8 colónias, com morfologia colonial diferente e fez-se o seu isolamento e a sua caracterização fenotípica preliminar, em termos de morfologia colonial, coloração de Gram, presença de catalase, de citocromo c oxidase, testes de sensibilidade a 12 antibióticos diferentes, através do uso do método de antibiograma e por último a sua identificação através da sequenciação do gene 16S rRNA.

Dos isolados obtidos, 50 % são resistentes à amoxicilina, 25 % à gentamicina, 100 %, à ciprofloxacina, 12,5 % ao sulfametoxazol+trimetropim, 25 % à tetraciclina, 25 % à cefalotina, nenhum é resistente ao meronemo, 12,5 % à ceftazina, 25 % à tricarciclina, 12,5 % ao colistine sulfato, 75 % ao sulfametoxazol e 62,5 % à estreptomicina. Foram identificados 8 géneros e/ou espécies microbiológicas desses isolados.

A espécie *Comamonas testosteroni* apresenta-se tanto na população bacteriana total e cultivável das culturas mistas finais dos enriquecimentos, como na caracterização da ETAR.

Por último, foi também efectuada a quantificação do antibiótico usado, no tempo inicial e final, das culturas mistas dos enriquecimentos e constatou-se que a ciprofloxacina não se degrada biologicamente.

Para as amostras de água residual afluyente, pode dizer-se que os microrganismos presentes nestas amostras podem ter capacidade para degradar a ciprofloxacina, contudo novos ensaios confirmativos teriam que ser efectuados.

Palavras-chave: Água residual afluyente, Ciprofloxacina, DGGE, Efluente final, ETAR e Lamas activadas

Abstract

One of the objectives of this project was to characterize the total and cultivable bacterial population, in the presence and absence of antibiotic from a wastewater treatment plant, in the North region of Portugal, by denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE, one method independent from culture and in this study, 34 microbiological species were identified. In fact, the total bacterial population from the wastewater treatment plant is different from the cultivable, since both of the populations had different species.

One other objective of this project was to evaluate the capacity of microorganisms in inflow wastewater and in activated sludge, from that wastewater treatment plant to degraded one specific antibiotic, ciprofloxacin. The method to isolate those organisms was the addition of a high quantity of antibiotic, through an enrichment method, to the bacterial population of that wastewater treatment plant. Microorganisms from the inflow wastewater and the activated sludge were used to evaluate the presence of resistant bacteria to the antibiotic and it was possible to evaluate that capacity, through the obtaining of isolates from the final enrichments cultures, resistant to ciprofloxacin.

It was also made the total and cultivable characterization, also by DGGE, in the presence and absence of antibiotic, from the bacterial population, from the final enrichments cultures, identifying 11 microbiological species. The bacteria A-22 and SVAL 2.36, and the species *Comamonas testosteroni* and *Pseudomonas aeruginosa* were in the total and cultivable bacterial population, from the final enrichments cultures, as well as, in the characterization of the wastewater treatment plant.

From the final enrichments cultures, 8 colonies were selected since they had different colonial morphology and the isolation and phenotypical preliminary characterization of those were made, in terms of colonial morphology, Gram coloration, presence of catalase, oxidase c citocrom, sensible tests to 12 different antibiotics using the antibiogram method and lastly its identification by the sequencing of 16S rRNA gene.

From the obtained isolates, 50 % were resistant to amoxicillin, 25 % to gentamicin, 100 % to ciprofloxacin, 12,5 % to *sulfametoxazol+trimetropim*, 25 % to tetracycline, 25 % to cephalothin, none were resistant to *meronemo*, 12,5 % to ceftazime, 25 % to tricarcycline, 12,5 % to colisthin sulphate, 75 % to *sulfametoxazol* and finally, 62,5 % to streptomycin. From those isolates it was identified 8 microbiological species.

The specie *Comamonas testosteroni*, were in the total and cultivable bacterial population from the final enrichments cultures, as well as, in the initial characterization of the wastewater treatment plant.

Lastly, it was also made the quantification of the antibiotic used, in the initial and final time of the enrichments cultures and it was proved that ciprofloxacin doesn't degrade itself biologically.

For the inflow wastewater samples, the microorganisms present may have the ability to degraded ciprofloxacin, but several new studies were necessary to prove this capacity.

Keywords: Activated sludge, Ciprofloxacin, DGGE, Final effluent, Inflow wastewater and Wastewater treatment plant

ÍNDICE

ÍNDICE	I
NOTAÇÃO E GLOSSÁRIO	VIII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. ANTIBIÓTICOS	1
1.2. CONSUMO EXCESSIVO DE ANTIBIÓTICOS	1
1.3. RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS.....	1
1.4. CONTAMINAÇÃO POR ANTIBIÓTICOS EM AMBIENTE HOSPITALAR	2
1.5. CONTAMINAÇÃO POR ANTIBIÓTICOS NO AMBIENTE VIA PRODUTOS DA EXCREÇÃO HUMANA	2
1.6. ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUAIS (ETAR)	3
1.7. CIPROFLOXACINA.....	4
2. OBJECTIVOS.....	5
3. ESTADO DA ARTE.....	6
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	8
4.1. AMOSTRAGEM.....	8
4.2. ENUMERAÇÃO DA POPULAÇÃO MICROBIANA CULTIVÁVEL TOTAL E RESISTENTE	8
4.3. CULTURAS DE ENRIQUECIMENTO.....	9
4.4. QUANTIFICAÇÃO DA CIPROFLOXACINA.....	9
4.5. CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO BACTERIANA TOTAL E CULTIVÁVEL ATRAVÉS DE UM MÉTODO INDEPENDENTE DO CULTIVO	10
4.6. ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS RESISTENTES À CIPROFLOXACINA.....	11
4.6.1. Caracterização Fenotípica Preliminar.....	11
4.6.2. Determinação da Suscetibilidade a Antibióticos – Antibiogramas	11
4.6.3. Sequenciação do Gene 16S rRNA.....	11
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
5.1. CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO BACTERIANA DA ETAR	12
5.2. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DOS MICRORGANISMOS PARA DEGRADAREM A CIPROFLOXACINA.....	23
6. CONCLUSÕES	38
7. AVALIAÇÃO DO TRABALHO REALIZADO	40
7.1. OBJECTIVOS REALIZADOS.....	40
7.2. OUTROS TRABALHOS REALIZADOS.....	40
7.3. LIMITAÇÕES E TRABALHO FUTURO	40
7.4. APRECIÇÃO FINAL	40

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
8.1. ARTIGOS, LIVROS E REVISTAS	41
8.2. SÍTIOS (CONSULTADOS EM JUNHO DE 2008).....	43
9. ANEXOS	45
9.1. CULTURA DE BACTÉRIAS.....	45
9.2. MEIO DE CULTURA.....	46
9.2.1. Plate Count Agar (PCA)	46
9.3. PREPARAÇÃO DAS CULTURAS DE ENRIQUECIMENTO.....	46
9.4. FILTRAÇÃO ATRAVÉS DO USO DA TÉCNICA DAS MEMBRANAS FILTRANTES.....	48
9.4.1. Filtração através do uso da Técnica das Membranas Filtrantes para a Enumeração da População Microbiana Total e Resistente	49
9.5. EXTRACÇÃO DE HETEROTRÓFICOS PARA A CARACTERIZAÇÃO INICIAL E FINAL DA POPULAÇÃO BACTERIANA CULTIVÁVEL NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE ANTIBIÓTICO.....	55
9.6. CONGELAMENTO DAS CULTURAS MISTAS FINAIS DOS ENRIQUECIMENTOS	55
9.7. BIOLOGIA MOLECULAR	56
9.7.1. Técnicas em Biologia Molecular	56
9.7.2. Filtração das Amostras para a Caracterização Inicial e Final da População Bacteriana Total	57
9.7.3. Extração do DNA	58
9.7.4. Reacção em Cadeia de Polimerase (PCR)	59
9.7.5. Electroforese em Gel de Agarose	63
9.7.6. Electroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE)	66
9.7.7. Purificação/Sequenciação	82
9.8. ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS RESISTENTES À CIPROFLOXACINA.....	91
9.8.1. Morfologia Colonial	91
9.8.2. Coloração de Gram	92
9.8.3. Testes de Metabolismo	93
9.8.4. Teste de Sensibilidade a Antibióticos (TSA)	94
9.8.5. Teste de Sensibilidade a Antibióticos (TSA) através do Método de Antibiograma	94
9.8.6. RNA	97
9.8.7. Sequenciação do Gene 16S rRNA	98
9.8.8. Primers Universais	98
9.8.9. Extração do DNA	99
9.8.10. Reacção em Cadeia de Polimerase (PCR)	99
9.8.11. Electroforese em Gel de Agarose	101
9.8.12. Purificação/Sequenciação	102
9.8.13. Congelamento dos vários Isolados	107
9.9. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC).....	108

9.9.1.	Quantificação da Ciprofoxacina	109
---------------	---	------------

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 - FÓRMULA QUÍMICA DA CIPROFLOXACINA	4
FIGURA 2 - IMAGEM DO GEL DE DGGE COM UM GRADIENTE DE 29,5 E 50 % DAS AMOSTRAS DE ÁGUA RESIDUAL AFLUENTE, EFLUENTE FINAL E LAMAS ACTIVADAS COLHIDAS A 11 DE MARÇO	14
FIGURA 3 - IMAGEM DO GEL DE DGGE COM UM GRADIENTE DE 29,5 E 50 % DAS AMOSTRAS DE ÁGUA RESIDUAL AFLUENTE, EFLUENTE FINAL E LAMAS ACTIVADAS COLHIDAS A 21 DE ABRIL	14
FIGURA 4 - IMAGEM DO GEL DE DGGE COM UM GRADIENTE DE 29,5 E 50 % DAS AMOSTRAS DE ÁGUA RESIDUAL AFLUENTE, EFLUENTE FINAL E LAMAS ACTIVADAS CULTIVÁVEIS EM MEIO PCA E PCA COM CIPROFLOXACINA COLHIDAS A 11 DE MARÇO.....	15
FIGURA 5 - IMAGEM DO GEL DE DGGE COM UM GRADIENTE DE 29,5 E 50 % DAS AMOSTRAS DE ÁGUA RESIDUAL AFLUENTE, EFLUENTE FINAL E LAMAS ACTIVADAS CULTIVÁVEIS EM MEIO PCA COLHIDAS A 11 DE MARÇO	15
FIGURA 6 - IMAGEM DO GEL DE DGGE COM UM GRADIENTE DE 29,5 E 50 % DAS AMOSTRAS DE ENRIQUECIMENTO FINAL DE ÁGUA RESIDUAL AFLUENTE E LAMAS ACTIVADAS.....	27
FIGURA 7 - MATERIAL CORRENTE DE LABORATÓRIO USADO PARA A APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE MEMBRANAS FILTRANTES	54
FIGURA 8 - MODO DE INCORPORAÇÃO DA MEMBRANA FILTRANTE NA CAIXA DE PETRI QUE CONTÉM O MEIO SÓLIDO.....	54
FIGURA 9 - IMAGENS DE CAIXAS DE PETRI QUE CONTÉM O MEIO SÓLIDO, COM A MEMBRANA INCORPORADA. À ESQUERDA APÓS 24 HORAS DE INCUBAÇÃO A T= 30 °C E À DIREITA APÓS 48 HORAS DE INCUBAÇÃO A T= 30 °C.....	54
FIGURA 10 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA EVOLUÇÃO DA TEMPERATURA E IDENTIFICAÇÃO DAS VÁRIAS FASES NO DECORRER DOS DIVERSOS CICLOS DE PCR.....	63
FIGURA 11 - EQUIPAMENTO TERMOCICLADOR, RESPONSÁVEL PELA OCORRÊNCIA DOS VÁRIOS CICLOS E PRODUTOS DE PCR	63
FIGURA 12 - IMAGEM REPRESENTATIVA DA APLICAÇÃO DAS AMOSTRAS EM GEL DE AGAROSE	65
FIGURA 13 - IMAGENS DA ELECTROFORESE EM GEL DE AGAROSE. À ESQUERDA A TINA HORIZONTAL E À DIREITA UMA IMAGEM REPRESENTATIVA DO ASPECTO DO GEL NO FINAL DA ELECTROFORESE EM GEL DE	66
FIGURA 14 - IMAGEM DO TRANSILUMINADOR USADO NA VISUALIZAÇÃO DAS BANDAS DESENVOLVIDAS NO GEL	66
FIGURA 15 - EXEMPLO DE UMA IMAGEM OBTIDA ATRAVÉS DO TRANSILUMINADOR, COM A VISUALIZAÇÃO DAS BANDAS DESENVOLVIDAS NO GEL, NO PRIMEIRO POÇO COLOCOU-SE O MARCADOR DE PESO MOLECULAR, NO TERCEIRO A AMOSTRA BRANCO E NOS RESTANTES AS VÁRIAS AMOSTRAS A ANALISAR	66
FIGURA 16 - VISUALIZAÇÃO DAS PLACAS COM OS ESPAÇADORES	68
FIGURA 17 - COMPONENTES DA TÉCNICA DE DGGE, DOIS ADAPTADORES E DOIS ESPAÇADORES ENTRE AS DUAS PLACAS DE VIDRO	68
FIGURA 18 - VISUALIZAÇÃO DA CÂMARA DE GEL COM AS PLACAS DE VIDRO. À ESQUERDA, MONTAGEM DAS PLACAS E ESPAÇADORES E ENCAIXE NO SUPORTE E À DIREITA, AJUSTE DA PRESSÃO COM O CARTÃO DE ALINHAMENTO.....	69

FIGURA 19 - PREENCHIMENTO DA CÂMARA DE GEL, ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DO GERADOR DE GEL DE GRADIENTE DESNATURANTE.....	70
FIGURA 20 - CÂMARA DE GEL COM O PENTE INSERIDO.....	71
FIGURA 21 - ENCAIXE DO GEL NO CORE ASSEMBLY E COLOCAÇÃO DO SISTEMA NO INTERIOR DA TINA DE SOLUÇÃO TAMPÃO DE DGGE	72
FIGURA 22 - CÂMARA DE GEL ANEXADA AO CORE ASSEMBLY.....	72
FIGURA 23 - EQUIPAMENTO DE DGGE, COMPOSTO POR UMA TINA DE SOLUÇÃO TAMPÃO DE DGGE E O SUPORTE CORE ASSEMBLY	72
FIGURA 24 - IMAGEM DO GEL DE DGGE COM O GRADIENTE 28 E 57 % A 8 DE ABRIL.....	74
FIGURA 25 - IMAGEM DO GEL DE DGGE COM O GRADIENTE 29,5 E 50 % A 17 DE ABRIL.....	74
FIGURA 26 - IMAGEM DO GEL DE DGGE COM O GRADIENTE 29,5 E 50 % A 22 DE ABRIL.....	75
FIGURA 27 - IMAGEM DO GEL DE DGGE COM O GRADIENTE 29,5 E 50 % A 6 DE MAIO.....	75
FIGURA 28 - IMAGEM DO GEL DE DGGE COM O GRADIENTE 29,5 E 50 % A 28 DE MAIO	76
FIGURA 29 - IMAGEM DO GEL DE DGGE COM O GRADIENTE 29,5 E 50 % A 28 DE MAIO	76
FIGURA 30 - IMAGEM DO GEL DE DGGE COM O GRADIENTE 29,5 E 50 % A 3 DE JUNHO	77
FIGURA 31 - IMAGEM DO GEL DE DGGE COM O GRADIENTE 29,5 E 50 % A 18 DE JUNHO.....	77
FIGURA 32 - IMAGEM DO GEL DE DGGE COM O GRADIENTE 29,5 E 50 % A 20 DE JUNHO.....	78
FIGURA 33 - IMAGEM DO GEL DE DGGE COM O GRADIENTE 29,5 E 50 % A 20 DE JUNHO.....	78
FIGURA 34 - IMAGEM DO GEL DE DGGE COM O GRADIENTE 29,5 E 50 % A 23 DE JUNHO.....	79
FIGURA 35 - IMAGEM DO GEL DE DGGE COM O GRADIENTE 29,5 E 50 % A 23 DE JUNHO.....	79
FIGURA 36 - IMAGEM DO GEL DE DGGE COM O GRADIENTE 29,5 E 50 % A 26 DE JUNHO.....	80
FIGURA 37 - IMAGEM DO GEL DE DGGE COM O GRADIENTE 29,5 E 50 % A 1 DE JULHO.....	80
FIGURA 38 - IMAGEM DO GEL DE DGGE COM O GRADIENTE 29,5 E 50 % A 3 DE JULHO.....	81
FIGURA 39 - IMAGEM DO GEL DE DGGE COM O GRADIENTE 29,5 E 50 % A 18 DE JULHO	81
FIGURA 40 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA EVOLUÇÃO DA TEMPERATURA E IDENTIFICAÇÃO DAS VÁRIAS FASES NO DECORRER DOS DIVERSOS CICLOS DE PCR.....	101
FIGURA 41 - RECTA DE CALIBRAÇÃO DA CIPROFLOXACINA.....	110

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1 - DATA DA AMOSTRAGEM E ENUMERAÇÃO DA POPULAÇÃO CULTIVÁVEL TOTAL E RESISTENTE À CIPROFLOXACINA, NA ÁGUA RESIDUAL AFLUENTE, EFLUENTE FINAL E NAS LAMAS ACTIVADAS DA ETAR .	13
TABELA 2 - BANDAS, % DE SIMILARIDADE, GÉNERO E/OU ESPÉCIE MICROBIOLÓGICA IDENTIFICADA E ORIGEM	16
TABELA 3 - DATA DAS CULTURAS DE ENRIQUECIMENTO DE ÁGUA RESIDUAL AFLUENTE, VOLUME DE INÓCULO, CONCENTRAÇÃO DE CIPROFLOXACINA E DE EXTRACTO DE LEVEDURA, ENUMERAÇÃO DE CÉLULAS CULTIVÁVEIS TOTAIS E RESISTENTES À CIPROFLOXACINA E CÁLCULO DA PERCENTAGEM DE CÉLULAS RESISTENTES.....	24
TABELA 4 - DATA DAS CULTURAS DE ENRIQUECIMENTO DE LAMAS ACTIVADAS, VOLUME DE INÓCULO, CONCENTRAÇÃO DE CIPROFLOXACINA E DE EXTRACTO DE LEVEDURA, ENUMERAÇÃO DE CÉLULAS CULTIVÁVEIS TOTAIS E RESISTENTES À CIPROFLOXACINA E CÁLCULO DA PERCENTAGEM DE CÉLULAS RESISTENTES.....	25
TABELA 5 - BANDAS, % DE SIMILARIDADE, GÉNERO E/OU ESPÉCIE MICROBIOLÓGICA IDENTIFICADA E ORIGEM	28
TABELA 6 - MORFOLOGIA COLONIAL, TÉCNICA DE GRAM, CATALASE E OXIDASE DOS VÁRIOS ISOLADOS.....	32
TABELA 7 - DIÂMETRO DOS HALOS DE INIBIÇÃO DAS VÁRIAS COLÓNIAS, PARA O PRIMEIRO GRUPO DE ANTIBIÓTICOS E SUA IDENTIFICAÇÃO COMO RESISTENTE, INTERMÉDIA OU SENSÍVEL	33
TABELA 8 - DIÂMETRO DOS HALOS DE INIBIÇÃO DAS VÁRIAS COLÓNIAS, PARA O SEGUNDO GRUPO DE ANTIBIÓTICOS E SUA IDENTIFICAÇÃO COMO RESISTENTE, INTERMÉDIA OU SENSÍVEL	33
TABELA 9 - PRODUTOS DE PCR, % DE SIMILARIDADE, GÉNERO E /OU ESPÉCIE MICROBIOLÓGICA E ORIGEM...	34
TABELA 10 - RESULTADOS DA QUANTIFICAÇÃO, EM HPLC, DAS DIVERSAS AMOSTRAS, EM TERMOS DE CONCENTRAÇÃO, NOS TEMPOS INICIAIS E FINAIS E PERCENTAGEM DE REDUÇÃO.....	36
TABELA 11 - DILUIÇÕES E FILTRAÇÕES PARA A ENUMERAÇÃO DA POPULAÇÃO MICROBIANA H TOTAL E RESISTENTE DIRECTAMENTE DAS AMOSTRAS RECOLHIDAS DA ÁGUA RESIDUAL AFLUENTE, EFLUENTE FINAL E LAMAS ACTIVADAS EM MEIO PCA E EM MEIO PCA COM CIPROFLOXACINA A UMA CONCENTRAÇÃO DE 4 MG/L.....	50
TABELA 12 - DATAS DAS CULTURAS DE ENRIQUECIMENTO DE ÁGUA RESIDUAL AFLUENTE E LAMAS ACTIVADAS E RESPECTIVAS DILUIÇÕES E FILTRAÇÕES EM MEIO PCA E EM MEIO PCA COM CIPROFLOXACINA A UMA CONCENTRAÇÃO DE 4 MG/L.....	51
TABELA 13 - MASSAS E VOLUMES PARA OS DIFERENTES COMPONENTES UTILIZADOS NA PREPARAÇÃO DOS GÉIS COM DIFERENTES PERCENTAGENS DE DESNATURAÇÃO	69
TABELA 14 - BANDAS, <i>PRIMER</i> FORNECIDO, SEQUÊNCIA USADA NA COMPARAÇÃO, % DE SIMILARIDADE, GÉNERO E /OU ESPÉCIE MICROBIOLÓGICA IDENTIFICADA E ORIGEM.....	83
TABELA 15 - DIFERENTES GRUPOS DE ANTIBIÓTICOS USADOS	96
TABELA 16 - DIFERENÇAS EM TAMANHO E NA GRANDE E PEQUENA SUBUNIDADE ENTRE PROCARIONTES E EUCARIONTES.....	98
TABELA 17 - PRODUTOS DE PCR, <i>PRIMER</i> FORNECIDO, SEQUÊNCIA USADA NA COMPARAÇÃO, % DE SIMILARIDADE, GÉNERO E /OU ESPÉCIE MICROBIOLÓGICA IDENTIFICADA E ORIGEM.....	103
TABELA 18 - DIFERENTES PADRÕES USADOS PARA A CURVA DE CALIBRAÇÃO DA CIPROFLOXACINA E RESPECTIVAS ÁREAS DE PICO.....	109

TABELA 19 - RESULTADOS DA QUANTIFICAÇÃO, EM HPLC, DAS DIVERSAS AMOSTRAS, EM TERMOS DE ÁREA DO PICO E CONCENTRAÇÃO, NOS TEMPOS INICIAIS E FINAIS E PERCENTAGEM DE REDUÇÃO 113

Notação e Glossário

A - Amostras da extracção de heterotróficos obtidos em meio PCA

B - Amostras da extracção de heterotróficos obtidos em meio PCA com antibiótico, a uma concentração de 4 mg/L

Lista de Siglas

AML - Amoxicilina

CAZ - Ceftazina

CN - Gentamicina

CIP - Ciprofloxacina

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute

CT - Colistine Sulfato

DGGE - Electroforese em Gel com Gradiente Desnaturante

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

ETAR - Estação de Tratamento de Água Residual

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

KF - Cefalotina

LEPAE - Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente e Energia

MEM - Meronemo

mRNA - Ácido Ribonucléico mensageiro

PCA - *Plate Count Agar*

PCR - Reacção em Cadeia de Polimerase

RL - Sulfametoxazol

RNA - Ácido Ribonucléico

rRNA - Ácido Ribonucléico ribossómico

S - Estreptomina

SXT - Sulfametoxazol+Trimetropim

TE - Tetraciclina

TIC - Tricarilina

tRNA - Ácido Ribonucléico transportador

TSA - Teste de Sensibilidade a Antibióticos

UFC - Unidades Formadoras de Colónias

1. Introdução

1.1. Antibióticos

Os antibióticos são substâncias produzidas por microrganismos, bactérias ou fungos e têm a capacidade para inibir a multiplicação bacteriana, exercendo acção bactericida, provocando a morte de bactérias alvo. Atendendo ao sentido etimológico da palavra, as substâncias produzidas sinteticamente (sulfonamidas, quinolonas, etc.), não devem ser designadas por antibióticos, mas por agentes antimicrobianos e desta forma, este conceito, inclui todas as substâncias capazes de causar a morte e inibir o crescimento dos microrganismos. Os antibióticos constituem uma das classes de substâncias mais importantes produzidas, em larga escala, por processos microbianos [25, 47].

1.2. Consumo Excessivo de Antibióticos

Portugal ocupa o quarto lugar no *ranking* dos países da União Europeia que mais utilizam antibióticos e é o segundo que mais recorre aos de largo espectro, um consumo que é, muitas vezes, sugerido ao médico pelo próprio doente. Apesar de os antibióticos serem indicados para o tratamento de infecções bacterianas, estes são, muitas vezes, indevidamente utilizados [36, 58]. A automedicação é uma das causas para a utilização indiscriminada de medicamentos, por conta própria e sem controlo médico, como forma de encontrar a cura para doenças e promover o bem-estar, o que leva ao seu consumo excessivo e à resistência a antibióticos [39].

1.3. Resistência a Antibióticos

As bactérias são conhecidas pela sua ubiquidade e plasticidade. As bactérias resistentes a antibióticos e os seus genes de resistência têm uma distribuição generalizada, sendo detectados em produtos alimentares, em ambientes domésticos, em animais de estimação e em humanos saudáveis. A água, sendo o habitat mais importante para as bactérias, representa o maior vector desta disseminação.

Os mecanismos de acção dos antibióticos compreendem a inibição da síntese da parede celular, inibição da síntese proteica, por acção nos ribossomas, alteração da síntese dos ácidos nucleicos e inibição de diversas enzimas do metabolismo celular. Os principais processos de resistência a antibióticos podem envolver: a inactivação do antibiótico através de ataque enzimático, diminuição da permeabilidade ou alteração dos locais alvo e mecanismos de efluxo, cujos genes podem estar em elementos genéticos móveis, como os plasmídeos, conferindo vantagem selectiva à bactéria que os abriga.

A resistência a antibióticos pode ser intrínseca/natural ou adquirida. O primeiro caso ocorre em bactérias que são insensíveis ao agente, sem que tenha havido

aquisição de factores de resistência; são devidos a aspectos fisiológicos e estruturais da célula e resultam de um longo processo de evolução genética. Por outro lado, a resistência adquirida surge numa população microbiana como consequência da ocorrência de modificações no DNA da bactéria, por mutação cromossómica ou por transferência horizontal de genes; este tipo de resistência pode surgir num curto espaço de tempo. Quanto existe mistura de bactérias, umas resistentes e outras não, na presença do antibiótico, as sensíveis irão morrer e sobrevivem as que possuem um dos mecanismos de resistência, podendo, então transferir essa resistência para outras anteriormente sensíveis.

Desta forma, a resistência bacteriana emerge como um problema de saúde pública à escala mundial, que se traduz num inevitável aumento da morbilidade e da mortalidade por doenças infecciosas e que terá como consequência, a diminuição da qualidade de vida e o aumento dos custos com a saúde e os cuidados médicos [25, 36, 49, 50].

1.4. Contaminação por Antibióticos em Ambiente Hospitalar

Os hospitais são por natureza locais onde as bactérias e os vírus habitam e proliferam.

A prevalência de infecções causadas por bactérias, frequentemente, multirresistentes é vigiada, anualmente, nos serviços de risco, contudo, a flora de uma pessoa pode ser alterada durante a sua hospitalização, principalmente, devido ao uso de antibióticos e à maior concentração de pessoas doentes. Estudos recentes demonstraram que, sete em cada cem pessoas, nos países desenvolvidos, que entram num hospital, com as medidas higiénicas e sanitárias adequadas, são infectadas com uma bactéria ou um fungo resistente [45, 48, 57].

1.5. Contaminação por Antibióticos no Ambiente Via Produtos da Excreção Humana

A libertação de fármacos para o ambiente tem ocorrido desde há décadas, mas só recentemente foi iniciado o estudo dos seus possíveis efeitos no ambiente. A lista dos fármacos detectados nas águas é extensa e envolve praticamente todo o tipo de compostos.

Os medicamentos podem ser libertados no meio ambiente de várias formas. Após administração em humanos, parte dos fármacos ou produtos resultantes do seu metabolismo ou da sua degradação são excretados nas fezes e urina, sendo encaminhados para Estações de Tratamento de Água Residual, ETAR, que têm por função receber e tratar as águas residuais domésticas brutas, reduzindo a carga orgânica, antes de essas serem devolvidas aos cursos de água naturais.

A outra via importante de entrada de antibióticos, no meio ambiente, pode resultar da eliminação indevida destes ou das suas embalagens.

Embora seja consensual que os desinfectantes, metais pesados e antibióticos são continuamente libertados nos esgotos municipais, não é claro que estes não se

encontram na água residual tratada. Também não é claro, se a presença destes resíduos nas águas residuais impõe a selecção de bactérias resistentes a agentes antimicrobianos. Uma ETAR a funcionar normalmente, apesar de reduzir a carga microbiana, pode não eliminar as bactérias resistentes a antibióticos e estes locais de tratamento podem contribuir para a disseminação/proliferação destes organismos e/ou dos seus genes. Para além da selecção clonal, também a transferência horizontal de genes pode contribuir para a obtenção de elevadas percentagens de bactérias resistentes a antibióticos em águas residuais domésticas.

Os efluentes das ETAR's poderão ser a mais importante via de entrada dos fármacos de consumo humano e de bactérias resistentes nos meios receptores hídricos. Para além dos efluentes, as lamas produzidas nas ETAR's são também passíveis de conter elevados níveis destes poluentes que, ao serem aplicadas nos solos, podem por sua vez contaminar os aquíferos.

É assim importante que se tomem medidas para minimizar este problema que passa, não só pela monitorização e melhoramento, no que concerne à remoção destes poluentes, mas também à sensibilização do funcionamento das ETAR's. Os medicamentos são essenciais ao bem-estar, mas o seu uso deve ser feito de uma forma criteriosa e consciente, que contribua para minimizar este problema. A eliminação biológica de resíduos de antibióticos que chegam às ETAR's é uma vantagem para evitar a sua dispersão no ambiente e conseqüentemente do aumento de bactérias resistentes [36, 38].

1.6. Estação de Tratamento de Águas Residuais (ETAR)

As ETAR's têm como objectivo o tratamento final das águas residuais, permitindo uma possível reutilização destas, através de um processo longo e faseado. As águas residuais podem ter origem doméstica e/ou industrial, sendo normalmente designadas de esgotos sanitários ou descargas industriais, para depois serem lançadas no mar ou rio com um nível de poluição aceitável.

O tratamento de águas residuais numa ETAR deve consistir em quatro fases, designadas de pré-tratamento, tratamento primário, secundário e terciário.

A primeira etapa é a de pré-tratamento, que é constituída pela obra de entrada, o desarenamento e o desengorduramento. A operação unitária de gradagem tem o objectivo de remover sólidos grosseiros, flutuantes e sedimentáveis, de maiores dimensões. As operações unitárias de desarenação e desengorduramento têm como finalidade remover as areias e gorduras existentes na água residual, respectivamente.

Segue-se o tratamento primário, onde a matéria poluente é separada da água por sedimentação. Este processo, exclusivamente de acção física pode, em alguns casos, ser ajudado pela adição de agentes químicos, que através de um processo de coagulação/floculação possibilitam a obtenção de flocos de matéria poluente de maiores dimensões e assim mais facilmente decantáveis.

O tratamento secundário consiste num processo biológico e contrastando com os antecedentes, tem à sua disposição várias tecnologias que funcionam sobre

princípios semelhantes, destacando-se os sistemas aeróbios intensivos, quer por biomassa (microrganismos), suspensa (lamas activadas), quer por biomassa fixa (leitões percoladores e biodiscos ou discos biológicos) e os sistemas aquáticos por biomassa suspensa (lagunagem) [41].

O sistema por biomassa suspensa de lamas activadas é um processo destinado à mineralização de poluentes orgânicos, biodegradáveis, presentes em águas residuais, efluentes e esgotos. O processo baseia-se na oxidação da matéria orgânica, por microrganismos, normalmente bactérias aeróbias, controlada pelo excesso de oxigénio, em tanques aeróbios e posteriormente direccionado a decantadores. O efluente do tratamento preliminar é encaminhado para o decantador primário, seguindo para o tanque de arejamento, geralmente com recirculação permanente e deste, após sedimentação das lamas, é descarregado numa linha de água. Parte das lamas sedimentadas são recirculadas ao tanque de arejamento, para reactivação da população de bactérias no tanque aeróbio. Este retorno dá-se na entrada do tanque onde a lama, em fase endógena, se mistura ao efluente rico em poluente, aumentando assim a eficiência do processo [56].

Algumas ETAR's, normalmente, antes do lançamento final no meio receptor procedem à desinfecção das águas residuais tratadas, através de um tratamento terciário, para a remoção de eventuais organismos patogénicos ou, em casos especiais, à remoção de determinados nutrientes, como o azoto e o fósforo [41].

1.7. Ciprofloxacina

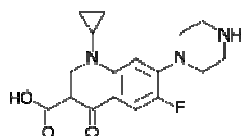


Figura 1 – Fórmula química da ciprofloxacina

A ciprofloxacina foi o antibiótico seleccionado para este estudo. Muitos outros antibióticos podiam ter sido testados, uma vez que a resistência a antibióticos assume-se como um problema à escala mundial.

A ciprofloxacina é do grupo das quinolonas, tem toxicidade relativamente reduzida e custo elevado (a fórmula química apresenta-se na figura 1). As quinolonas e fluoroquinolonas são grupos relacionados de antibióticos, derivados do ácido nalidixico, usados no tratamento das infecções bacterianas. Trata-se de um bactericida que é efectivo contra bactérias Gram negativas e positivas. O ciprofloxacino é o componente activo da ciprofloxacina e é inibidor da enzima bacteriana DNA topoisomerase II (girase de DNA), que tem um papel vital na reprodução bacteriana. Sem esta função, a bactéria não consegue prosseguir com a replicação do DNA e cessa a sua multiplicação.

Este tipo de antibiótico é usado no tratamento de infecções do trato respiratório, de otite média, de sinusite, dos olhos, dos rins e/ou do trato urinário eferente e dos órgãos reprodutores. Há conhecimento de resistência de algumas estirpes de bactérias quer Gram-positivas (*Streptococcus*, *Staphylococcus aureus*), quer Gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa*), que têm sido descritas como resistentes à ciprofloxacina [35, 51].

2. Objectivos

Este estudo teve como principal objectivo caracterizar a população bacteriana total e resistente à ciprofloxacina de uma ETAR da região Norte de Portugal. Pretendeu também avaliar-se a sua capacidade para eliminar este fármaco por bactérias resistentes à ciprofloxacina.

3. Estado da Arte

A crescente prevalência de resistência a antibióticos em múltiplos grupos bacterianos tem vindo a assumir níveis preocupantes a nível clínico, onde o problema assume uma elevada expressão. Um estudo ao nível dos esgotos de hospitais mostrou que bactérias humanas fecais são expostas a medicamentos, levando a que alguns microrganismos apresentem resistência a estes, constatando-se que, para alguns antibióticos, os níveis de resistência chegam a ser da mesma ordem de grandeza dos descritos para isolados clínicos. Neste estudo, encontraram-se baixos níveis de ciprofloxacina e de ofloxacina na água residual, mas altas concentrações em fezes. Apesar destas altas concentrações, não se encontrou resistência a fluoroquinolonas em estirpes de enterobactérias e de enterococos fecais isoladas a partir das fezes [17].

É cada vez mais evidente que a selecção e dispersão de organismos resistentes ocorre também no ambiente e sendo a água um dos mais importantes habitats dos microrganismos, será um excelente veículo de tal disseminação. De facto, a resistência a antibióticos tem sido detectada em águas residuais. Foi estudada a resistência a antibióticos em isolados de enterococos em águas residuais do Chile. Destes isolados, foram identificadas cinco espécies, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. hirae*, *E. durans* e *E. gallinarum*. Estes apresentavam alta resistência a gentamicina e estreptomicina, moderada resistência a ampicilina, cloranfenicol, tetraciclina e ciprofloxacina e eram sensíveis a vancomicina [34]. A resistência a antibióticos foi também estudada em isolados de *Escherichia coli* de águas residuais em Hamilton, Ontario. Dois dos 12 isolados eram resistentes aos antibióticos ampicilina, ciprofloxacina, gentamicina e tetraciclina [5]. A resistência a antibióticos foi também investigada em 288 isolados de enterococos de águas residuais de Brighton e Hove, Inglaterra. Destes, os pertencentes à espécie *Enterococcus faecium* provaram ser resistentes à vancomicina e frequentemente à ciprofloxacina [3].

Desde o tratamento dos esgotos nas ETAR's, até à preparação e distribuição de água para consumo, criam-se múltiplas oportunidades para a selecção e dispersão de bactérias resistentes a antibióticos. Nas ETAR's dão entrada não só bactérias, mas também resíduos de antibióticos e outros geradores de pressão selectiva. De facto, a resistência a antibióticos tem sido detectada em águas residuais afluentes, efluentes finais e lamas activadas das ETAR's. A partir da água residual afluente de uma ETAR, obtiveram-se isolados de enterobactérias. Foi testada a resistência a inúmeros antibióticos, de entre eles, a ciprofloxacina. O estudo demonstrou que, comparativamente com a água residual afluente dessa ETAR, o efluente final apresentava altas concentrações de isolados de *Escherichia sp*, resistentes tanto a ciprofloxacina, como a cefalotina [9]. A partir da água residual afluente e efluente final de uma ETAR de origem doméstica e industrial, estudou-se a ecologia de enterococos e bactérias relacionadas com este tipo e testou-se a eficácia do tratamento da ETAR, na prevalência de fenótipos deste grupo de bactérias. As espécies predominantes na água residual afluente eram

Enterococcus hirae, *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis*. A concentração desta última espécie permaneceu a mesma no efluente final, mas o tratamento resultou num aumento da espécie *Enterococcus faecium* e uma diminuição da espécie *Enterococcus hirae*. Para estes isolados não foi encontrada resistência a vancomicina, mas sim a ciprofloxacina, eritromicina e tetraciclina. A presença de estirpes resistentes a antibióticos mantinha-se no efluente final [8]. As características de isolados de *Salmonella* foram estudadas em águas residuais, antes e após tratamento por lamas activadas. Foram estudadas 21 estirpes, 11 da água residual afluente e 10 do efluente final. Os resultados não mostraram grandes diferenças nas características dos isolados antes e depois do tratamento, o que indica que o tratamento convencional por lamas activadas não constitui um factor de risco na selecção de estirpes de *Salmonella* com potencial patogénico [7].

Compararam-se também amostras de água residual e de água do rio Mahananda, tendo sido identificadas estirpes resistentes a ampicilina, cloranfenicol, ciprofloxacina, canamicina, netilmicina, estreptomina e tetraciclina, em ambas as amostras [30].

O uso de antibióticos na veterinária também contribui para o aumento de resistências. Por um lado, promove a selecção de bactérias resistentes no hospedeiro, com a sua consequente libertação para o ambiente e por outro conduz à libertação de resíduos de antibióticos. A presença de ciprofloxacina, norfloxacina e cefalexina foram detectadas em águas residuais e em aquaculturas. A presença destes antibióticos foi pesquisada no efluente final, antes da descarga para o meio hídrico e directamente na aquacultura. Estes estudos indicam que os antibióticos entram nos sistemas aquáticos e podem provocar danos no ecossistema e potencialmente na saúde pública. Outro estudo usou um total de 99 isolados de *Acinetobacter* de aquaculturas. As espécies do tipo *Ac. johnsonii* e *Ac. Iwoffii* constituíam a maioria dos isolados resistentes a diversos antibióticos testados e espécies de *Ac. calcoaceticus*, *Ac. baumannii* e *Acinetobacter juni* foram encontradas na água, como sendo também resistentes [14].

A permanente libertação de bactérias resistentes a antibióticos leva a uma progressiva acumulação destes organismos no ambiente, designadamente nos cursos de águas naturais. A contaminação de águas de superfície é inevitável e quando estas se destinam a consumo humano, o tratamento de desinfecção, apesar de indispensável para assegurar a desejável qualidade da água, pode impor pressões selectivas capazes de promover a elevada prevalência de bactérias resistentes a antibióticos. De facto, a resistência a antibióticos tem sido detectada em águas de consumo. Um estudo indicou a presença de fluoroquinolonas, uma classe de antibióticos mundialmente usados, detectados em águas de superfície. Devido às suas propriedades antimicrobianas, a presença destes compostos pode alterar a composição da população microbiana existente e promover a resistência a antibióticos no ambiente [4].

4. Materiais e Métodos

4.1. Amostragem

A etapa de amostragem é considerada de extrema importância, uma vez que mal executada, poderá falsear os resultados obtidos em laboratório. Devido à grande variação das características da água residual, geralmente mais observada no esgoto afluente das ETAR's, é relevante proceder à recolha de amostras representativas, isto é, à recolha de porções de água residual, que embora em pequeno volume, possuam as características da água residual de onde foram extraídas. Deste modo, será possível validar, em laboratório, os resultados das amostras recolhidas. Ao longo do trabalho experimental, recolheram-se amostras compostas, representativas das características médias da água "bruta", resultantes da junção de um certo número de amostras instantâneas – (tomas), recolhidas a intervalos de tempo regulares, ao longo de um período de 24 horas. Cada uma destas é proporcional ao caudal instantâneo, correspondente ao momento em que se faz a respectiva "colheita", para que a representatividade da amostra composta resultante, não seja desvirtuada.

Recolheram-se amostras compostas de água residual afluente, de efluente final e de lamas activadas, a 11 de Março de 2008 e a 21 de Abril de 2008. Estas amostras foram recolhidas em frascos Schott estéreis. Na primeira amostragem recolheram-se 500 mL de água residual afluente e efluente final e 100 mL de lamas activadas. Na segunda amostragem recolheram-se 100 mL de água residual afluente, de efluente final e de lamas activadas. Posteriormente, com o intuito de impedir a alteração das características microbiológicas das amostras, estas foram transportadas até ao laboratório, devidamente acondicionadas e convenientemente identificadas, com o dia da recolha e o local de amostragem. Ao abrir e fechar os frascos, durante a recolha das amostras, deve ter-se o maior cuidado para evitar a ocorrência de contaminações.

4.2. Enumeração da População Microbiana Cultivável Total e Resistente

Enumerou-se a população microbiana cultivável total e resistente da água residual afluente, efluente final e das lamas activadas utilizando o método de filtração, através do uso da técnica das membranas filtrantes. As amostras foram diluídas serialmente, em solução salina estéril e filtrou-se 1 mL, através de membranas com poro de 0,45 µm. As membranas foram colocadas sobre meio PCA e meio PCA com ciprofloxacina, a uma concentração de 4 mg/L. A enumeração foi realizada após 24 e 48 h de incubação a 30 °C (tabela 1).

4.3. Culturas de Enriquecimento

Como um dos objectivos deste trabalho experimental foi determinar se a água residual afluyente e as lamas activadas da ETAR possuíam microrganismos capazes de degradar a ciprofloxacina, efectuaram-se, em duplicado, culturas de enriquecimento usando como inóculo água residual afluyente e lamas activadas. As culturas foram realizadas em meio mínimo (anexo 9.3.), com antibiótico e extracto de levedura e incubaram durante 7 dias, a 30 °C e 120 rpm, ao fim do qual foram realizadas sucessivas transferências para meio fresco, onde se fez variar a concentração de ciprofloxacina, que foi crescente e a concentração de extracto de levedura e quantidade de inóculo, que foram ambas decrescentes. Semanalmente, procedeu-se à quantificação da ciprofloxacina (como descrito abaixo) e à enumeração da população microbiana cultivável total e resistente (como descrito acima).

Quando a percentagem de células resistentes atingiu os 100 %, terminaram-se os enriquecimentos (após 11 transferências) e obtiveram-se culturas mistas finais, tanto de água residual afluyente, como de lamas activadas. Estas culturas foram transferidas para um volume de meio mínimo dez vezes superior e a concentração de antibiótico seguiu a mesma proporção, não se tendo adicionado extracto de levedura. Procedeu-se, de seguida, à incubação das várias amostras, durante 7 dias, a 30 °C e 120 rpm, para avaliar a capacidade das culturas degradarem a ciprofloxacina e caracterizar a população microbiana (como descrito nas secções 4.2. e 4.5.). Para o congelamento das culturas mistas finais de água residual afluyente e de lamas activadas, filtraram-se 200 mL de cada cultura, através de membranas de policarbonato com poros de 0,2 µm. O conteúdo retido nos filtros foi transferido para tubos *Eppendorf* estéreis, aos quais se adicionou uma solução estéril de glicerol a 30 %, previamente preparada, que favorece o seu correcto congelamento a -80 °C (tabelas 3 e 4).

4.4. Quantificação da Ciprofloxacina

A quantificação da ciprofloxacina realizou-se através do uso da cromatografia líquida de alta eficiência, HPLC. Utilizou-se um aparelho de HPLC Beckman, automatizado e equipado com um módulo detector UV-Visível. O *software* usado foi o System Gold (V6.0 Beckman, USA). A coluna usada foi uma Chromolith^R Performance RP-18 e 100-3 nm. A fase móvel era constituída por um solvente A com 0,1 % de ácido fórmico e um solvente B com 0,1 % de ácido fórmico em acetonitrilo. Ambas as soluções foram filtradas e desgaseificadas antes de se proceder à análise. O comprimento de onda usado foi de 280 nm e o método de análise foi isocrático e consistiu na utilização de 30 e 70 % de eluente A e B, respectivamente. O tempo de corrida foi de 10 min a um caudal de 1,2 mL/min e a uma pressão aproximadamente constante de 1,6 Kpsi.

Antes de se proceder à análise propriamente dita das amostras, fez-se uma curva de calibração, onde se usaram padrões com concentrações crescentes de ciprofloxacina, rigorosamente preparados (tabela 10).

4.5. Caracterização da População Bacteriana Total e Cultivável através de um Método Independente do Cultivo

A caracterização da composição da população bacteriana total da ETAR e da população bacteriana cultivável na presença e ausência de antibiótico foi realizada por electroforese em gel com gradiente desnaturante, DGGE.

Para analisar a população total da ETAR, filtrou-se 30 mL de água residual afluyente e 100 mL de efluente final através de membranas de policarbonato com poros de 0,2 µm. O conteúdo retido nos filtros foi colocado em caixas de Petri estéreis e guardado a -20 °C. Para as amostras de lamas activadas, retirou-se 1 mL de amostra, centrifugou-se e lavou-se com solução salina estéril, por duas vezes. Na última centrifugação efectuada, rejeitou-se o sobrenadante e fez-se o aproveitamento do *pellet*, que foi guardado a -20 °C. Todos os ensaios foram efectuados em triplicado.

Para caracterizar a população bacteriana total cultivável, após a enumeração das unidades formadoras de colónias, UFC, adicionou-se 1 mL de solução salina estéril às culturas em PCA e PCA com ciprofloxacina e com a ajuda de um espalhador, ressuspendeu-se a biomassa. A suspensão foi colhida para um tubo *Eppendorf* e tratada como descrito para as amostras de lamas activadas.

Para se caracterizar a população bacteriana total e cultivável das culturas mistas finais dos enriquecimentos, usou-se um procedimento análogo ao referido anteriormente, mas a filtração foi realizada através de membranas de policarbonato com poros de 0,2 µm e utilizaram-se 200 mL de cada amostra.

A extracção do DNA foi realizada através do uso do *PowerSoil™ DNA Isolation Kit*, capaz de promover o isolamento/purificação do DNA genómico dos microrganismos presentes na amostra, com um elevado grau de pureza (anexo 9.7.3.). Um fragmento de 200 pares de bases, do gene 16S rRNA foi amplificado usando os *primers forward* 338F-GC (59-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGACTCCTACGG-39) e *reverse* 518R (59-ATTACCGCGGCTGCTGG-39). Misturas reaccionais de 50 µL foram preparadas e as condições de PCR estabelecidas foram: 5 min a 94 °C, 30 ciclos de (30 s a 92 °C, 30 s a 55 °C, 30 s a 72 °C) e 7 min a 72 °C (anexo 9.7.4.). Os produtos de PCR obtidos foram separados num gel de poliacríamida a 8 % (m/v) com um gradiente desnaturante de 29,5 e 50 % (tendo por base, o facto de uma solução detentora de 100 % de poder desnaturante, possuir uma fracção de 40 % (v/v) de formamida e 7 M de ureia). A corrida teve início a 20 V durante 15 min, seguindo-se 5 h e 30 min a 200 V, a 60 °C. As bandas de DGGE maioritárias foram cortadas e eluídas em 20 µL de água ultra pura e reamplificadas por PCR com os mesmos *primers* (anexo 9.7.6.). De seguida fez-se a purificação dos produtos de PCR obtidos usando o *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* e estes foram,

após confirmação por nova electroforese (DGGE), posteriormente, sequenciados com o *primer* 518R. Os resultados obtidos das sequências do gene para o 16S rRNA foram comparados com a base de dados mundial, disponível via internet (figuras 2 a 6, tabelas 2 e 5 e anexo 9.7.7.) [23, 37].

4.6. Isolamento, Caracterização e Identificação de Microrganismos Resistentes à Ciprofloxacina

4.6.1. Caracterização Fenotípica Preliminar

Para caracterizar a população bacteriana cultivável das culturas de enriquecimento mistas finais, após a enumeração das UFC, seleccionaram-se diversas colónias, com morfologia colonial distinta, das culturas em meio PCA com ciprofloxacina, que foram repicadas para meio PCA. Após a sua purificação, os isolados foram caracterizados através da sua morfologia colonial, coloração de Gram e presença de catalase e de citocromo c oxidase (tabela 6).

4.6.2. Determinação da Susceptibilidade a Antibióticos – Antibiogramas

Os isolados obtidos foram submetidos a testes de sensibilidade a antibióticos, através do método de antibiograma (método de Kirby-Bauer, com base nas recomendações do CLSI, 2006), onde se testaram 12 antibióticos diferentes, sendo eles: amoxicilina, gentamicina, ciprofloxacina, sulfametoxazol+trimetropim, tetraciclina, cefalotina, meronemo, ceftazina, tricarciclina, colistine sulfato, sulfametoxazol e estreptomina. Uma estripe de *Escherichia coli* foi usada como controlo (tabelas 7 e 8).

4.6.3. Sequenciação do Gene 16S rRNA

Para obter DNA total de cada isolado, ressuspendeu-se uma ansa de biomassa em 50 µL de água ultra pura num tubo *Eppendorf* de 1,5 mL, que se colocou num banho a 95 °C. Após 10 min, retirou-se e colocou-se em gelo (5 min) e por último centrifugou-se durante 5 min. De seguida, rejeitou-se o *pellet* e transferiu-se, o sobrenadante, para novo tubo *Eppendorf*, que se armazenou a -20 °C (anexo 9.8.9.). Um fragmento do gene 16S rRNA foi amplificado usando os *primers forward* 27F e *reverse* 1492R. Misturas reaccionais de 50 µL foram preparadas e as condições de PCR estabelecidas foram: 5 min a 95 °C, 29 ciclos de (1 min a 92 °C, 1 min a 55 °C, 1 min e meio a 72 °C) e 10 min a 72 °C (anexo 9.8.10.). De seguida fez-se a purificação dos produtos de PCR obtidos usando o *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* e estes foram, posteriormente, sequenciados com o *primer* 518R. Os resultados obtidos das sequências do gene para o 16S rRNA, foram comparados com a base de dados mundial, disponível via internet (tabela 9 e anexo 9.8.12.) [29, 37].

5. Resultados e Discussão

5.1. Caracterização da População Bacteriana da ETAR

Na primeira fase do trabalho experimental, fez-se a enumeração da densidade bacteriana total e resistente à ciprofloxacina da ETAR (tabela 1).

A água residual afluyente da ETAR em estudo apresentou uma densidade bacteriana de cerca de 10^6 UFC/mL, enquanto as lamas activadas, constituídas pelos organismos responsáveis pelo tratamento dessa água, apresentaram uma densidade 10 vezes superior.

O sistema de tratamento permitiu reduzir a carga microbiana cultivável total em cerca de 99 %, como descrito anteriormente para sistemas de tratamento idênticos [41, 56].

Embora esta ETAR tenha capacidade para remover entre 75 a 93 % das células cultiváveis totais resistentes à ciprofloxacina, os resultados obtidos parecem indicar que o sistema de tratamento parece criar condições para as manter, uma vez que 40 a 60 % das células totais cultiváveis das lamas activadas apresentavam resistência a este antibiótico. Assim, a percentagem de células resistentes à ciprofloxacina, libertadas no ambiente através do efluente tratado era cerca de 10 vezes superior ao da água antes do tratamento. Este fenómeno pode ser explicado pela não sedimentação de células resistentes das lamas activadas durante a sedimentação secundária.

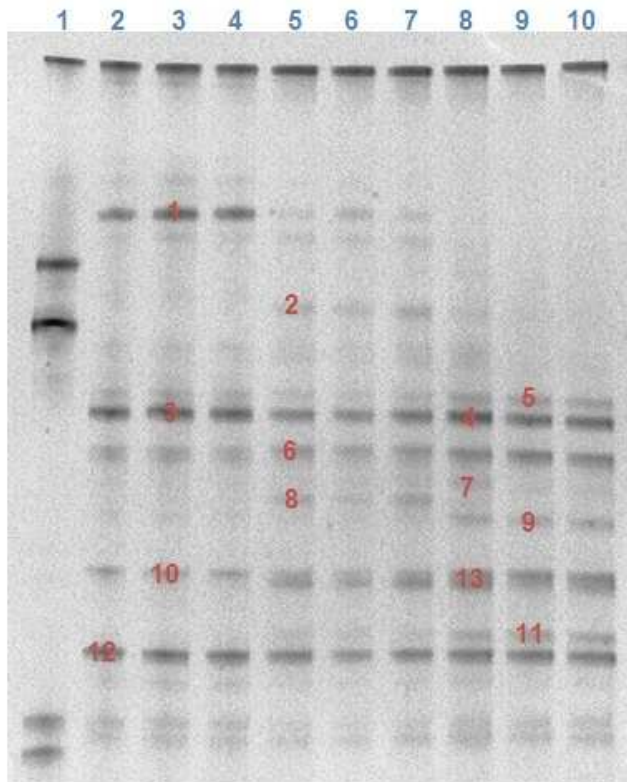
Com base nos dados obtidos e sabendo que o caudal de água residual tratada pela ETAR, é da ordem dos $18.000 \text{ m}^3/\text{dia}$, pode verificar-se que são susceptíveis de serem descarregadas, pela ETAR, para o meio hídrico, diariamente, cerca de $7,11 \times 10^{13}$ células resistentes à ciprofloxacina.

Tabela 1 - Data da amostragem e enumeração da população cultivável total e resistente à ciprofloxacina, na água residual afluyente, efluente final e nas lamas activadas da ETAR

Data da amostragem	Amostras	Parâmetros analisados		Percentagem de células resistentes (%)	Percentagem de remoção de células cultiváveis totais** (%)	Percentagem de remoção de células cultiváveis totais resistentes à ciprofloxacina** (%)
		Nº de células cultiváveis totais (UFC/mL)	Nº células cultiváveis totais resistentes à ciprofloxacina (UFC/mL)			
21/04	Água residual afluyente	$1,3 \times 10^6$	$2,0 \times 10^4$	1,6	-	-
		$8,7 \times 10^{6*}$	$4,0 \times 10^{4*}$	0,5		
21/04	Efluente final	$4,8 \times 10^4$	$5,0 \times 10^3$	10,4	96,2	75,0
		$4,5 \times 10^{4*}$	$2,9 \times 10^{3*}$	6,4	99,5	92,8
18/03	Lamas activadas	$2,9 \times 10^7$	$1,8 \times 10^7$	62,1	-	-
21/04		$1,0 \times 10^7$	$4,4 \times 10^6$	43,6		
21/04		$7,0 \times 10^{6*}$	$3,4 \times 10^{6*}$	48,6		

Notas: * - Dados relativos ao duplicado

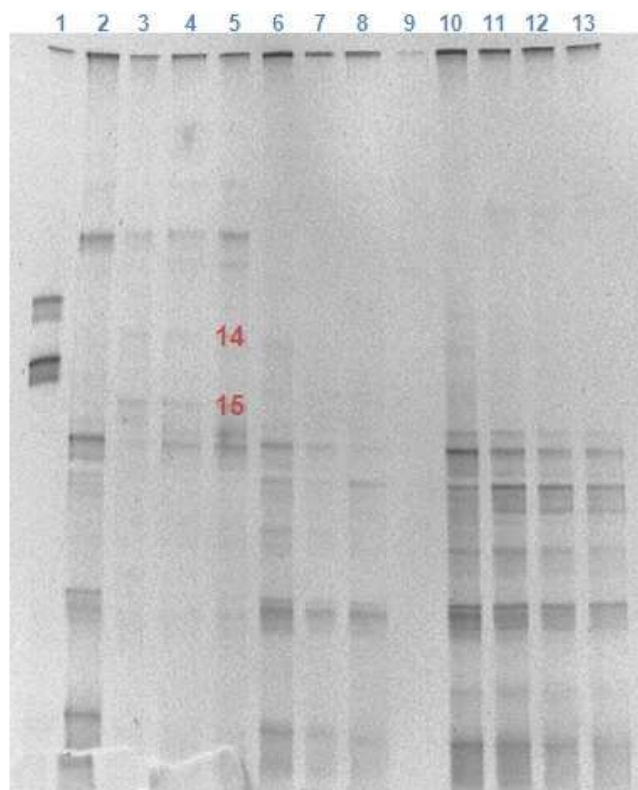
$$** - \% \text{ remoção} = 1 - \left(\frac{\text{Nº de células resistentes}}{\text{Nº de células totais}} \right) \times 100\%$$



Legenda:

- 1 – Amostra padrão
- 2 – Amostra de Afluente
- 3 – Duplicado da amostra de Afluente
- 4 – Triplicado da amostra de Afluente
- 5 – Amostra de Efluente
- 6 – Duplicado da amostra de Efluente
- 7 – Triplicado da amostra de Efluente
- 8 – Amostra de Lamas activadas
- 9 – Duplicado da amostra de Lamas activadas
- 10 – Triplicado da amostra de Lamas activadas
- 1 a 13 – Diversas bandas cortadas

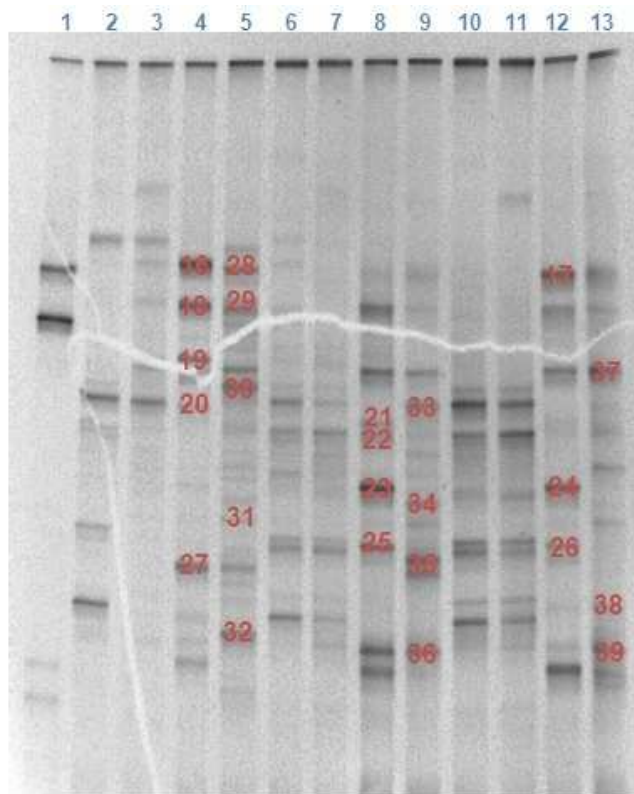
Figura 2 - Imagem do gel de DGGE com um gradiente de 29,5 e 50 % das amostras de água residual afluente, efluente final e lamas activadas colhidas a 11 de Março



Legenda:

- 1 – Amostra padrão
- 2 – Amostra de Afluente colhida a 11 de Março
- 3 – Amostra de Afluente colhida a 21 de Abril
- 4 – Duplicado da amostra de Afluente colhida a 21 de Abril
- 5 – Triplicado da amostra de Afluente colhida a 21 de Abril
- 6 – Amostra de Efluente colhida a 11 de Março
- 7 – Amostra de Efluente colhida a 21 de Abril
- 8 – Duplicado da amostra de Efluente colhida a 21 de Abril
- 9 – Triplicado da amostra de Efluente colhida a 21 de Abril
- 10 – Amostra de Lamas activadas colhida a 11 de Março
- 11 – Amostra de Lamas activadas colhida a 21 de Abril
- 12 – Duplicado da amostra de Lamas activadas colhida a 21 de Abril
- 13 – Triplicado da amostra de Lamas activadas colhida a 21 de Abril
- 14 e 15 – Bandas cortadas

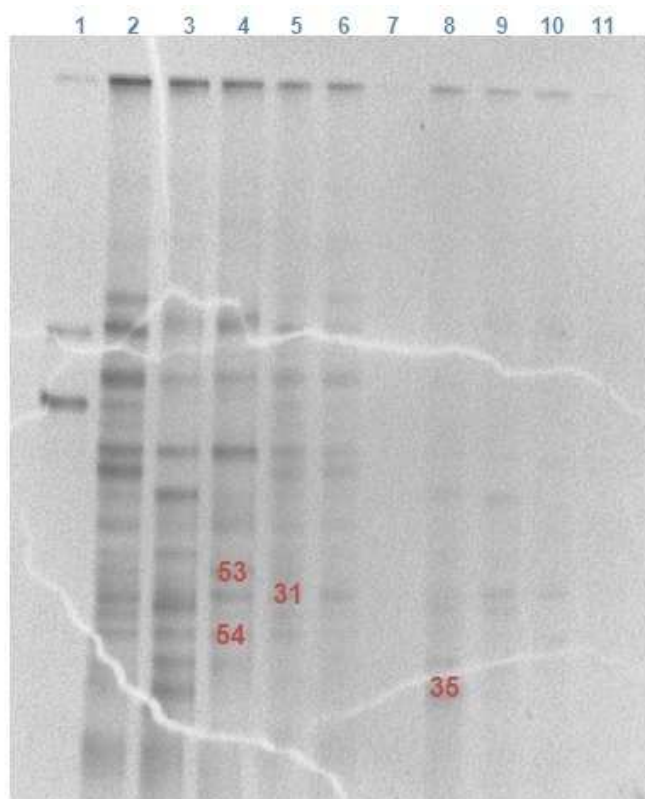
Figura 3 - Imagem do gel de DGGE com um gradiente de 29,5 e 50 % das amostras de água residual afluente, efluente final e lamas activadas colhidas a 21 de Abril



Legenda:

- 1 – Amostra padrão
- 2 – Amostra de Afluente colhida a 11 de Março
- 3 – Amostra de Afluente colhida a 21 de Abril
- 4 – Amostra de Afluente cultivável em meio PCA com ciprofloxacina
- 5 – Amostra de Afluente cultivável em meio PCA
- 6 – Amostra de Efluente colhida a 11 de Março
- 7 – Amostra de Efluente colhida a 21 de Abril
- 8 – Amostra de Efluente cultivável em meio PCA com ciprofloxacina
- 9 – Amostra de Efluente cultivável em meio PCA
- 10 – Amostra de Lamas activadas colhida a 11 de Março
- 11 – Amostra de Lamas activadas colhida a 21 de Abril
- 12 – Amostra de Lamas activadas cultiváveis em meio PCA com ciprofloxacina
- 13 – Amostra de Lamas activadas cultiváveis em meio PCA
- 16 a 39 – Diversas bandas cortadas

Figura 4 - Imagem do gel de DGGE com um gradiente de 29,5 e 50 % das amostras de água residual afluente, efluente final e lamas activadas cultiváveis em meio PCA e PCA com ciprofloxacina colhidas a 11 de Março



Legenda:

- 1 – Amostra padrão
- 2 – Amostra de Afluente cultivável em meio PCA
- 3 – Amostra de Efluente cultivável em meio PCA
- 4 – Amostra de Lamas activadas cultiváveis em meio PCA
- 5 – Banda 31
- 6 – Banda 32, esta banda foi desprezada, dado que não se conseguia purificar
- 7 – Banda 34
- 8 – Banda 35
- 9 – Banda 36, esta banda foi desprezada, dado que não se conseguia purificar
- 10 – Banda 38, esta banda foi desprezada, dado que não se conseguia purificar
- 11 – Banda 39, esta banda foi desprezada, dado que não se conseguia purificar
- 31, 35, 53 e 54 – As duas primeiras bandas foram cortadas novamente, dado que ainda não estavam puras e as duas últimas bandas foram cortadas da amostra original

Figura 5 - Imagem do gel de DGGE com um gradiente de 29,5 e 50 % das amostras de água residual afluente, efluente final e lamas activadas cultiváveis em meio PCA colhidas a 11 de Março

Tabela 2 - Bandas, % de similaridade, género e/ou espécie microbiológica identificada e origem [37]

Dados sobre o gel	Bandas	% de Similaridade	Género e/ou Espécie Microbiológica Identificada	Origem
População total da ETAR da amostra de 11 de Março	1 Comum a água residual afluente e efluente final	100	<i>Arcobacter cryaerophilus</i>	Isolado clínico humano resistente à ciprofloxacina
	2 Efluente final	95	Bactéria A-22	Bactéria isolada de um solo
	3 Comum a todas as amostras	90	<i>Candidatus comitans</i>	Bactéria que vive em culturas com <i>Chondromyces crocatus</i>
	4 Comum a todas as amostras	97	Bactéria SVAL 2.36	Heterotróficos encontrados num lago de uma praia em Great Basin
	5 Comum a todas as amostras	91	<i>Adhaeribacter</i> sp.	Isolado de bactérias de amostras de solo florestal
	6 Comum a todas as amostras	97	<i>Acidovorax</i> sp.	Isolado usado na biodegradação de moléculas policíclicas, de elevado peso molecular e de hidrocarbonetos aromáticos
	7 Lamas activadas	97	<i>Flavobacterium columnare</i>	Bactéria isolada de lamas activadas
	8 Efluente final	96	<i>Flavobacterium cheniae</i>	Bactéria isolada de sedimentos de um reservatório eutotrófico
	9 Lamas activadas	97	<i>Sphingomonas</i> sp.	Desconhecida
	10 Comum a todas as amostras	96	<i>Rhodoferax</i> sp.	Bactéria aeróbia cultivável de uma região montanhosa presente num curso de água
	11 Lamas activadas	99	<i>Hydrogenophaga</i> sp. Pd 1	Bactéria isolada de comunidades microbianas mistas de aeróbios e anaeróbios em águas contaminadas com benzeno
	12 Comum a todas as amostras	97	<i>Hydrogenophaga</i> sp. EMB 85	Bactéria isolada de comunidades microbianas de culturas dependentes e independentes de um reactor SBR aeróbio e anaeróbio

População total da ETAR da amostra de 11 de Abril	14 Água residual afluente	100	<i>Clostridiaceae</i>	Desconhecida
	15 Água residual afluente	97	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	Bactéria isolada de comunidade microbiana de leite materno em mulheres com mastite
População da ETAR cultivável em meio PCA e em meio PCA com ciprofloxacina	16 Comum a água residual afluente e lamas activadas	98	<i>Empedobacter brevis</i>	Bactéria isolada de um solo contaminado com óleo
	17 Comum a água residual afluente e lamas activadas	98	<i>Pseudomonas argentinensis</i>	Bactéria aeróbia cultivável de uma região montanhosa presente num curso de água
	18 Comum a todas as amostras	94	<i>Pedobacter heparinus</i>	Bactéria isolada de comunidades microbianas dinâmicas
	19 Comum a todas as amostras	90	<i>Enterobacter cloacae</i>	Desconhecida
	20 Água residual afluente	94	<i>Alcaligenes sp.</i>	Bactéria isolada de comunidade microbiana da bacia rio Gundar em Thirumangalam, sul da Índia
	21 Efluente final	92	<i>Comamonas denitrificans</i>	Bactéria desnitrificante isolada de lamas activadas
	22 Efluente final	91	<i>Comamonas denitrificans</i>	Bactéria desnitrificante isolada de lamas activadas
	23 Comum a efluente final afluente e lamas activadas	95	<i>Comamonas testosteroni</i>	Bactéria que degrada <i>taurocholate</i>
	24 Comum a efluente final afluente e lamas activadas	96	<i>Sporobacter termitidis</i>	Bactéria do tracto digestivo da térmita da madeira <i>Nasutitermeslujae</i>
25 Comum a efluente final afluente e lamas	100	<i>Psychrobacter maritimus</i>	Bactéria isolada de comunidades microbianas para produção de antibióticos de águas residuais e efluente final usando técnicas de culturas dependentes e independentes	

	ativadas			
	26 Comum a efluente final afluente e lamas activadas	93	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Isolado de bactérias Gram negativas de cinco hospitais da Índia
	27 Água residual afluente	90	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	Desconhecida
	28 Comum a todas as amostras	95	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Bactéria isolada do camarão tigre
	29 Comum a todas as amostras	97	<i>Chryseobacterium soldanellicola</i>	Bactéria isolada de um solo da ilha de Dokdo
	30 Água residual afluente	100	Bactéria não cultivável	Bactéria isolada de comunidade microbiana de sedimentos hidrotermais de Yonaguni Knoll IV, no sul de Okinawa Trough
	31 Comum a todas as amostras	100	<i>Gordonia</i> sp.	Desconhecida
	33 Efluente final	92	<i>Providencia alcalifaciens</i>	Desconhecida
	35 Comum a água residual afluente e efluente final	100	<i>Bifidobacterium scardovii</i>	Bactéria isolada de um laboratório clínico
	37 Comum a todas as amostras	94	<i>Ehrlichia</i> sp.	Desconhecida
	53 Água residual afluente	94	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bactéria isolada de um solo contaminado com óleo

A população bacteriana da ETAR foi também caracterizada por um método independente do cultivo (DGGE), que permitiu não só comparar a composição bacteriana das diferentes amostras, como identificar alguns dos microrganismos presentes.

Os resultados dos triplicados obtidos, das amostras de água residual afluenta, efluente final e lamas activadas, colhidas a 11 de Março (primeira recolha), mostraram-se idênticos entre si (figura 2), podendo por isso, ser considerados fiáveis. E contrariamente àquilo que seria esperado, estes, assinalam a inexistência de uma grande variedade de espécies microbiológicas presentes, uma vez que o perfil de bandas obtido para cada amostra não era muito complexo. Estabelecendo uma comparação directa entre o perfil das bandas obtidas, para as diferentes amostras, observa-se que estas são pouco distintas entre si, isto é, verifica-se que muitas bandas apresentam mobilidades electroforéticas iguais, indiciando a existência de bandas comuns e portanto, a presença do mesmo tipo de microrganismos. Este facto indica que a população bacteriana, embora sofra modificações, a nível da sua composição, durante o tratamento biológico da ETAR, estas não são muito significativas.

Deste gel foram cortadas 13 bandas maioritárias, identificadas com os números 1 a 13. As bandas 3 a 6, 10 e 12 são comuns a todas as amostras. A banda 1 é comum às amostras de água residual afluenta e efluente final, mas apresenta-se mais evidenciada na amostra de água residual afluenta, podendo indicar a presença de um maior número deste tipo de indivíduos na água bruta. As bandas 7, 9 e 11 são exclusivas das amostras de lamas activadas e as bandas 2 e 8 são exclusivas das amostras de efluente final.

Após a comparação das sequências das bandas isoladas, correspondente a uma fracção de 200 pb do gene para o 16S rRNA, com a base de dados mundial, foi possível identificá-las, uma vez que, as suas sequências apresentaram uma elevada qualidade e elevada percentagem de identidade, isto é, um elevado grau de paridade relativamente às sequências de estirpes previamente depositadas na base de dados.

Note-se, porém, que devido ao facto do fragmento sequenciado constituir apenas cerca de 1/7 da total sequência do gene 16S rRNA, esta metodologia poderá apenas indicar a identificação dos organismos presentes até ao género.

O microrganismo da banda 1 apresentou 100 % de similaridade com um isolado clínico humano de *Arcobacter cryaerophilus*, que apresenta resistência à ciprofloxacina. Esta banda foi detectada tanto nas amostras de águas residuais afluenta como de efluente final, o que é prejudicial, dado que o efluente final é descarregado no meio hídrico. O microrganismo da banda 7, identificado como *Flavobacterium columnare*, pertence a um isolado de lamas activadas, enquadrando-se perfeitamente no estudo efectuado, uma vez que esta banda se apresenta, exclusivamente, nas amostras de lamas activadas, que, juntamente com os microrganismos das bandas 9 e 11, identificados, respectivamente como *Sphingomonas* sp. e *Hydrogenophaga* sp. Pd 1, também da mesma amostra, podem desempenhar papéis importantes no processo de tratamento por lamas activadas, uma vez que fazem parte integrante, do licor biológico da ETAR. Os microrganismos das bandas 2 e 8 apresentam similaridade de,

respectivamente, 95 e 96 % com, respectivamente, Bactéria A-22 e *Flavobacterium cheniae* e apenas se apresentam no efluente final.

A presença de bandas comuns, pode indicar-nos que a população da ETAR vai-se mantendo ao longo do tratamento e é pouco variável e distinta, tal como pode ser observado no gel de DGGE correspondente a esta identificação (figura 2).

Relativamente ao gel de DGGE de 21 de Abril (segunda recolha), os resultados obtidos, para as amostras de água residual afluyente, efluente final e lamas activadas, mostraram-se idênticos entre si e idênticos aos da primeira colheita efectuada (figuras 2 e 3) sendo possível verificar a existência de bandas, quase todas em comum, com a primeira recolha, indicando a presença das mesmas espécies bacterianas, igualmente representativas. Estes resultados puderam, assim, ser considerados fiáveis.

Assim sendo, pode inferir-se, que após 1 mês e 10 dias (entre a primeira e a segunda colheita efectuada), de operação da ETAR, não ocorreu um aumento/diminuição significativa do número de espécies bacterianas distintas, isto é, não ocorreram modificações ao nível da estrutura da comunidade microbiológica, presente na água residual afluyente, efluente final e lamas activadas.

Deste gel foram cortadas 2 bandas maioritárias e estas, identificadas com os números, 14 e 15 são exclusivas das amostras de água residual afluyente e foram cortadas, dado que pareceu serem as únicas a não existir nas amostras de água residual afluyente da primeira colheita e nas restantes amostras.

Estas bandas apresentam similaridade superior a 97 %, com, respectivamente, *Clostridiaceae* e *Acinetobacter johnsonii*.

Relativamente ao gel de DGGE das amostras cultiváveis em meio PCA e em PCA com ciprofloxacina, colhidas a 11 de Março (figura 4), este apresenta uma maior diversidade microbiológica (aparecimento de um maior número de bandas com diferentes mobilidades electroforéticas), quando comparado com os anteriores, para as diferentes amostras. Contudo, normalmente, a maior diversidade microbiológica verifica-se nas amostras maioritárias (figuras 2 e 3). As amostras cultiváveis, seriam as correspondentes à população cultivável maioritária, porque foram obtidas e cresceram nas diluições -3, -4 e -6.

Do gel referido anteriormente, foram cortadas 12 bandas maioritárias, das amostras cultiváveis, em meio PCA com antibiótico e identificadas com os números 16 a 27. As bandas 18 e 19 são comuns a todas as amostras, as bandas 16 e 17 são comuns às amostras de água residual afluyente e lamas activadas, as bandas 23 a 26 são comuns às amostras de lamas activadas e efluente final, as bandas 20 e 27 são exclusivas das amostras de água residual afluyente e as bandas 21 e 22 são exclusivas das amostras de efluente final. Todos os microrganismos identificados são cultiváveis, em meio PCA com antibiótico, a uma concentração de 4 mg/L, o que indica que toleram o antibiótico usado e que inclusive crescem neste meio, baseado nos dados das UFC em meio PCA com ciprofloxacina.

Os microrganismos das bandas 21, 22 são da mesma espécie, *Comamonas denitrificans*, dado que apresentam a mesma mobilidade electroforética, tal como é evidenciado no respectivo gel (figura 4). Quando se cortaram estas bandas do respectivo gel, pensou-se terem mobilidades electroforéticas diferentes, contudo, como

se identificou a mesma espécie para ambas as bandas, provou-se que se tratava de uma banda com igual mobilidade electroforética. O microrganismo da banda 19, identificado como *Enterobacter cloacae*, faz parte das enterobactérias, que são um grupo de bactérias, classicamente, utilizadas para determinar contaminações causadas por fezes, pois são encontradas no intestino e em regiões extra-intestinais e algumas destas são patogénicas para o homem. Este microrganismo apresenta-se ao longo de todo o tratamento da ETAR, o que é prejudicial, uma vez que também será descarregado no recurso hídrico. No entanto, como às ETAR's chega toda a água residual doméstica, que contém produtos da excreção humana, a existência deste tipo de microrganismos era esperado ser uma prática comum. Os microrganismos das bandas 20 e 27, identificados, respectivamente como *Alcaligenes* sp. e *Acinetobacter lwoffii*, apenas surgem na população resistente da água residual afluyente, o que é problemático, uma vez que dão entrada na ETAR vindas de água residual doméstica, microrganismos que são susceptíveis de resistir à ciprofloxacina. Os microrganismos das bandas 21 e 22 resistentes, identificados, respectivamente como *Comamonas denitrificans*, abandonam a ETAR através do efluente final, que é descarregado no curso de água, contribuindo para a problemática da disseminação/proliferação ambiental de bactérias resistentes a antibióticos e por último, os microrganismos das bandas 23 a 26, identificados, respectivamente como *Comamonas testosteroni*, *Sporobacter termitidis*, *Psychrobacter maritimus* e *Acinetobacter baumannii* são comuns às lamas activadas e ao efluente final, contribuindo também para a problemática anteriormente descrita.

Do gel referido anteriormente, de onde se haviam cortado as bandas 16 a 27, também foram cortadas outras 12 bandas maioritárias, das amostras cultiváveis, em meio PCA sem antibiótico, identificadas com os números 28 a 39. As bandas 28, 29, 31 e 37 são comuns a todas as amostras, a banda 35 é comum às amostras de água residual afluyente e efluente final, a banda 30 é exclusiva das amostras de água residual afluyente e a banda 33 é exclusiva das amostras de efluente final.

Relativamente ao gel de DGGE das amostras cultiváveis em meio PCA colhidas a 11 de Março (figura 5), cortaram-se 2 bandas maioritárias, identificadas com os números 53 e 54. Este gel foi efectuado e estas bandas foram cortadas da amostra original de lamas activadas cultiváveis em meio PCA, dado que, anteriormente, as bandas 38 e 39, na mesma posição electroforética que tinham sido cortadas não apresentavam pureza suficiente de modo a poderem ser identificadas. A banda 53 foi identificada, como *Pseudomonas aeruginosa*.

Quando se comparou a composição da população cultivável da água residual afluyente, efluente final e lamas activadas, colhidas em datas diferentes, obtiveram-se resultados diferentes dos descritos para a população total e constatou-se que a população bacteriana total da ETAR é diferente da cultivável, uma vez que, em ambas as caracterizações não existem géneros e/ou espécies microbiológicas iguais.

As bandas 16 a 22, 24 a 26, 28, 29, 31, 33, 36 e 38 (figura 4), foram encontradas nas amostras totais e nas cultiváveis em meio PCA e em meio PCA com ciprofloxacina. Todas as outras apenas foram identificadas nas amostras cultiváveis, contudo existe também um conjunto elevado de bandas que apenas existem nas amostras totais.

Comparando directamente as amostras cultiváveis entre si, meio PCA e meio PCA com ciprofloxacina, pode afirmar-se que as bandas 16 a 18, 27 a 29 e 37 são comuns a todas estas amostras. As bandas 19 a 26 apenas foram identificadas nas amostras cultiváveis em meio PCA com ciprofloxacina. Todas as outras apenas foram identificadas nas amostras cultiváveis em meio PCA.

A comparação feita anteriormente foi um pouco dificultada, quando se comparou a figura 2 com a 5, uma vez que, apesar dos géis apresentarem o mesmo gradiente, as imagens não se apresentam numa mesma escala.

Outro dos factos importantes de ressaltar neste trabalho é que a quantidade de DNA de cada amostra, aplicado no mesmo gel e entre diferentes géis pensa-se não ter sido a mesma, contudo deveria ter sido feita a quantificação do DNA para confirmar este facto.

Todas as bandas cuja identificação não consta da tabela 2, bandas 13, 32, 34, 36, 38, 39 e 54, por não apresentarem pureza suficiente, não puderam ser identificadas através das bases de dados disponíveis via internet.

Algumas bandas que constam da tabela 2 apresentam percentagens de similaridade entre 90 e 92 %. Estas percentagens de similaridade são baixas, o que pode levar a concluir, que a identificação efectuada pode estar incorrecta. Isto pode também dever-se à pouca qualidade apresentada em algumas das sequências obtidas.

5.2. Avaliação da Capacidade dos Microrganismos para Degradarem a Ciprofloxacina

Sendo a ETAR um local propício para a disseminação e dispersão de microrganismos resistentes a antibióticos, usou-se os microrganismos da água residual afluyente e das lamas activadas para avaliar a presença de bactérias resistentes ao antibiótico usado, através do método de enriquecimento. O princípio deste método é permitir o crescimento de uma espécie microbiana em detrimento de outras, através da criação de uma pressão selectiva, com o objectivo de se obterem no final, culturas mistas resistentes e com possibilidade de degradarem a ciprofloxacina. Ou seja, partindo de amostras de água residual afluyente e de lamas activadas, pretendeu-se ao longo de várias semanas, através da redução da quantidade de extracto de levedura e aumento da concentração de ciprofloxacina até 250 mg/L, criar uma pressão selectiva que fosse favorável ao desenvolvimento dos microrganismos resistentes a essa concentração de antibiótico. Uma vez que o meio final de enriquecimento não possui extracto de levedura (fonte de carbono e de energia), pretendia-se averiguar se os organismos presentes na cultura final tinham capacidade para utilizar a ciprofloxacina como nutriente, e portanto, degradá-la (tabelas 3 e 4).

Tabela 3 - Data das culturas de enriquecimento de água residual afluyente, volume de inóculo, concentração de ciprofloxacina e de extracto de levedura, enumeração de células cultiváveis totais e resistentes à ciprofloxacina e cálculo da percentagem de células resistentes

Data das culturas de enriquecimento de água residual afluyente (em duplicado)	Volume de inóculo (%)	Concentração de ciprofloxacina (mg/L)	Concentração de extracto de levedura (g/L)	Parâmetros analisados		Percentagem de células resistentes (%)		
				Nº de células cultiváveis totais (UFC/mL)	Nº células cultiváveis totais resistentes à ciprofloxacina (UFC/mL)			
11/03	25	4	1	$4,6 \times 10^5$	$2,0 \times 10^4$	4,3		
				$5,4 \times 10^{5*}$	$2,0 \times 10^{4*}$	3,7		
18/03	20			$4,6 \times 10^5$	$2,7 \times 10^5$	58,7		
				$1,0 \times 10^{6*}$	$8,5 \times 10^{5*}$	85,0		
25/03	10			0,75	$1,7 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	59,3	
					$1,2 \times 10^{6*}$	$1,0 \times 10^{6*}$	85,7	
01/04				4,5	$7,5 \times 10^5$	$4,9 \times 10^5$	65,3	
					$5,5 \times 10^{5*}$	$4,8 \times 10^{5*}$	87,3	
08/04				45	0,5	$4,7 \times 10^7$	$3,7 \times 10^7$	78,7
						$1,6 \times 10^{6*}$	$1,4 \times 10^{6*}$	88,6
15/04		100	0,4	$1,3 \times 10^7$	$3,8 \times 10^6$	30,2		
				$1,0 \times 10^{7*}$	$3,4 \times 10^{6*}$	34,0		
22/04		200	0,2	$4,7 \times 10^6$	$3,3 \times 10^6$	70,2		
				$1,8 \times 10^{6*}$	$1,3 \times 10^{6*}$	72,2		
29/04	250	0	$1,9 \times 10^6$	$1,8 \times 10^6$	94,7			
			$1,3 \times 10^{6*}$	$1,2 \times 10^{6*}$	92,3			
$2,0 \times 10^5$			$1,9 \times 10^5$	95,0				
$6,0 \times 10^{4*}$			$6,0 \times 10^{4*}$	100,0				
06/05			$3,3 \times 10^5$	$3,3 \times 10^5$	100,0			
			$9,0 \times 10^{4*}$	$9,0 \times 10^{4*}$	100,0			
13/05			$5,0 \times 10^5$	$5,0 \times 10^4$	100,0			
			$3,2 \times 10^{4*}$	$3,2 \times 10^{4*}$	100,0			
21/05								

Notas: * - Dados relativos ao duplicado

Tabela 4 - Data das culturas de enriquecimento de lamas activadas, volume de inóculo, concentração de ciprofloxacina e de extracto de levedura, enumeração de células cultiváveis totais e resistentes à ciprofloxacina e cálculo da percentagem de células resistentes

Data das culturas de enriquecimento das lamas activadas (em duplicado)	Volume de inóculo (%)	Concentração de ciprofloxacina (mg/L)	Concentração de extracto de levedura (g/L)	Parâmetros analisados		Percentagem de células resistentes (%)
				Nº de células cultiváveis totais (UFC/mL)	Nº células cultiváveis totais resistentes à ciprofloxacina (UFC/mL)	
18/03	20	4	1	$1,5 \times 10^6$	$4,0 \times 10^5$	26,7
				$2,6 \times 10^{6*}$	$1,6 \times 10^{6*}$	61,5
25/03	10	4,5	0,75	$1,7 \times 10^7$	$1,0 \times 10^7$	58,4
					$3,9 \times 10^{6*}$	$2,5 \times 10^{6*}$
01/04		45	0,5	$2,8 \times 10^5$	$1,8 \times 10^5$	64,3
					$1,0 \times 10^{5*}$	$7,0 \times 10^{4*}$
08/04		100	0,4	$8,0 \times 10^5$	$7,1 \times 10^5$	88,8
					$4,5 \times 10^{6*}$	$3,8 \times 10^{6*}$
15/04		200	0,2	$1,4 \times 10^8$	$1,3 \times 10^8$	86,8
					$2,0 \times 10^{7*}$	$1,5 \times 10^{7*}$
22/04		250	0	$2,2 \times 10^7$	$2,0 \times 10^7$	90,9
					$2,0 \times 10^{6*}$	$1,8 \times 10^{6*}$
29/04		250	0	$1,1 \times 10^7$	$9,8 \times 10^6$	92,5
					$3,4 \times 10^{6*}$	$3,3 \times 10^{6*}$
06/05		250	0	$2,8 \times 10^5$	$2,8 \times 10^5$	100,0
					$2,6 \times 10^{5*}$	$2,6 \times 10^{5*}$
13/05	250	0	$2,0 \times 10^5$	$2,0 \times 10^5$	100,0	
				$1,9 \times 10^{5*}$	$1,9 \times 10^{5*}$	100,0
21/05	250	0	$4,1 \times 10^5$	$4,1 \times 10^5$	100,0	
				$3,8 \times 10^{5*}$	$3,8 \times 10^{5*}$	100,0

Notas: * - Dados relativos ao duplicado

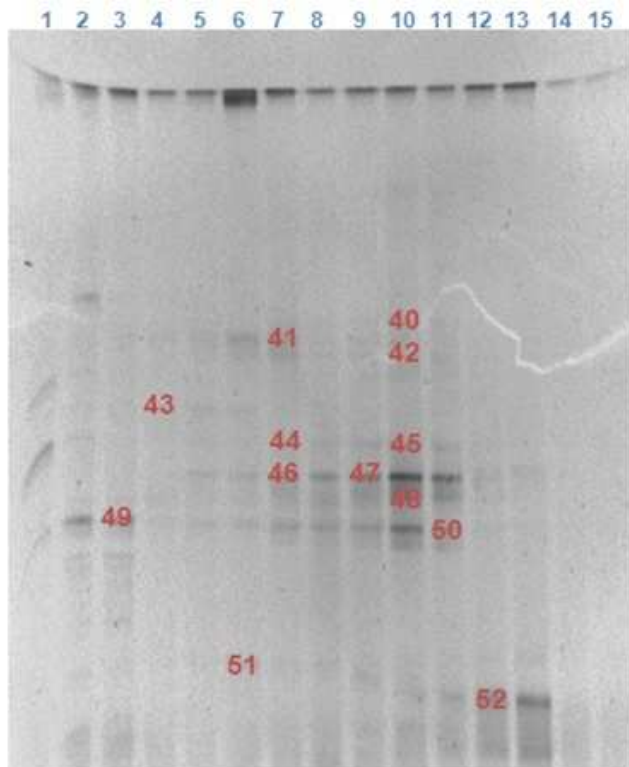
As culturas de enriquecimento finais foram cultivadas em meio mínimo com 250 mg/L e ao fim de um período de incubação de 7 dias apresentavam densidade bacteriana de cerca de 10^5 UFC/mL, enquanto as lamas activadas, constituídas pelos organismos responsáveis pelo tratamento dessa água, apresentaram uma densidade 10 vezes superior.

Relativamente à densidade bacteriana resistente, da água residual afluyente, esta é cerca de 10^4 UFC/mL, enquanto as lamas activadas, tal como anteriormente, apresenta uma densidade também 10 vezes superior.

Este procedimento de enriquecimento permitiu aumentar o número de células resistentes entre 4 e 100 % para a água residual afluyente e analogamente, para as lamas activadas entre 27 e 100 %.

Pode dizer-se que o aumento da densidade bacteriana entre 10^5 e 10^7 UFC/mL, no início e entre transferências, foi devido à presença de extracto de levedura, mas na sua ausência, obteve-se uma cultura mista com cerca de 10^4 UFC/mL para a água residual afluyente e de 10^5 UFC/mL para as lamas activadas, valores comparáveis ao encontrado na ETAR (figura 1).

No ensaio com água residual afluyente, apenas na terceira passagem para meio apenas com ciprofloxacina se obteve uma população 100 % resistente a 250 mg/L, enquanto para o ensaio com lamas activadas, obteve-se após a segunda passagem uma população 100 % resistente a 250 mg/L de ciprofloxacina. Os microrganismos destas culturas sofreram uma pressão selectiva, à medida que lhes foi reduzida a quantidade de extracto de levedura e aumentada a concentração de ciprofloxacina. Como não nos foi possível concluir se entre o tempo inicial dos enriquecimentos e o tempo final, havia crescimento dos microrganismos, devido à ausência de dados experimentais, apenas se pode inferir, que até ao final dos enriquecimentos estes se mantiveram, resistindo a 250 mg/L de ciprofloxacina.



Legenda:

- 1 – Amostra padrão
- 2 – Amostra de Afluente colhida a 11 de Março
- 3 – Amostra de Lamas activadas colhida a 11 de Abril
- 4 – Amostra de enriquecimento final de Afluente
- 5 – Duplicado da amostra de enriquecimento final de Afluente
- 6 – Amostra de enriquecimento final de Lamas activadas
- 7 – Duplicado da amostra de enriquecimento final de Lamas activadas
- 8 – Amostra de enriquecimento final de Afluente cultivável em meio PCA com ciprofloxacina
- 9 – Amostra de enriquecimento final de Afluente cultivável em meio PCA
- 10 – Duplicado da amostra de enriquecimento final de Afluente cultivável em meio PCA com ciprofloxacina
- 11 – Duplicado da amostra de enriquecimento final de Afluente cultivável em meio PCA
- 12 – Amostra de enriquecimento final de Lamas activadas cultiváveis em meio PCA com ciprofloxacina
- 13 – Amostra de enriquecimento final de Lamas activadas cultiváveis em meio PCA

14 – Duplicado da amostra de enriquecimento final de Lamas activadas cultiváveis em meio PCA com ciprofloxacina

15 – Duplicado da amostra de enriquecimento final de Lamas activadas cultiváveis em meio PCA

40 a 52 – Diversas bandas cortadas

Figura 6 - Imagem do gel de DGGE com um gradiente de 29,5 e 50 % das amostras de enriquecimento final de água residual afluente e lamas activadas

Tabela 5 - Bandas, % de similaridade, género e/ou espécie microbiológica identificada e origem [37]

Bandas	% de Similaridade	Género e/ou Espécie Microbiológica Identificada	Origem
41 Amostras de enriquecimento final de água residual afluyente e de lamas activadas	91	Bactéria A-22	Desconhecida
43 Amostras de enriquecimento final de água residual afluyente e de lamas activadas	100	<i>Paenibacillus</i> sp.	Bactéria isolada de campos de trigo do Brasil
44 Comuns a todas as amostras	95	<i>Pseudomonas putida</i>	Bactéria isolada da pele
45 Comuns a todas as amostras	97	<i>Pseudomonas putida</i>	Bactéria isolada da pele
46 Comuns a todas as amostras	98	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bactéria isolada do sistema larval de <i>Macrobrachium rosenbergii</i>
47 Comuns a	94	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bactéria tolerante a cobre

todas as amostras			
48 Amostras de enriquecimento final cultivável de água residual afluyente	94	<i>Sphingobacterium</i> sp.	Bactéria isolada de um solo
49 Comuns a todas as amostras	92	Bactéria SVAL 2.36	Heterotróficos encontrados num lago de uma praia em Great Basin
50 Comuns a todas as amostras	93	<i>Stappia</i> sp.	Bactéria isolada do fundo do Oceano Índico
51 Amostras de enriquecimento final de lamas activadas	97	<i>Chitinimonas taiwanensis</i>	Bactéria isolada de um viveiro de camarões
52 Amostras de enriquecimento final cultivável de lamas activadas	98	<i>Diaphorobacter nitroreducens</i>	Eubactéria isolada de um efluente comum de tratamento de plantas

Relativamente ao gel de DGGE da figura 6, os resultados dos duplicados obtidos, para as várias amostras de enriquecimento final, de água residual afluyente e lamas activadas, mostraram-se idênticos entre si, podendo por isso, ser considerados fiáveis. Por outro lado, os resultados dos duplicados obtidos, para as várias amostras de enriquecimento final cultivável, de água residual afluyente e lamas activadas, também se mostraram idênticos entre si, podendo por isso, também ser considerados fiáveis. Globalmente todas as bandas desenvolvidas neste gel eram muito semelhantes e assim, estes resultados vão de encontro ao que seria esperado, dado que, como se tratam de amostras das culturas mistas finais dos enriquecimentos, supõe-se a inexistência de uma grande variedade de espécies microbiológicas presentes e a redução das mesmas, uma vez que através do método do enriquecimento e da criação de pressão selectiva do mesmo, faz com que apenas resistam certo tipo de microrganismos, que se adaptam às condições impostas, ao longo dos enriquecimentos, uma vez que este método faz com que se evidenciem microrganismos minoritários das amostras iniciais da ETAR.

Estabelecendo uma comparação directa entre o perfil de bandas obtidas, observa-se que estas são muito pouco distintas entre si, isto é, verifica-se que muitas bandas apresentam mobilidades electroforéticas iguais, indiciando a existência de bandas comuns e conseqüentemente, a presença do mesmo tipo de microrganismos.

Do gel referido anteriormente foram cortadas 13 bandas maioritárias, identificadas com os números 40 a 52. As bandas 44 a 47, 49 e 50 são comuns a todas as amostras, as bandas 41 e 43 são exclusivas das amostras de enriquecimento final de água residual afluyente e de lamas activadas, a banda 51 é exclusiva das amostras de enriquecimento final de lamas activadas, a banda 48 é exclusiva das amostras de enriquecimento final cultivável de água residual afluyente e a banda 52 é exclusiva das amostras de enriquecimento final cultivável de lamas activadas.

Os microrganismos das bandas 41 e 43 apresentam similaridade com Bactéria A-22 e *Paenibacillus* e apenas se apresentam nas várias amostras de enriquecimento final. Os microrganismos das bandas 44 a 47, 49 e 50, identificados, respectivamente, como *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa*, Bactéria SVAL 2.3 e *Stappia* sp., são comuns a todas as amostras, o que nos indica que não existe muita variação entre a população dos enriquecimentos finais e a que é passível de ser cultivada. Os microrganismos das bandas 44 e 45, e 46 e 47 são da mesma espécie, respectivamente, *Pseudomonas putida* e *Pseudomonas aeruginosa*, apresentando, por isso, a mesma mobilidade electroforética, tal como pode ser evidenciado no respectivo gel (figura 6). As bandas 49 e 50, foram cortadas, supondo-se que apresentam a mesma mobilidade electroforética, tal facto não se verificou, dado que o microrganismo identificado, em cada uma das bandas é diferente. O microrganismo da banda 49 tem a mesma identificação que o da banda 4, Bactéria SVAL 2.36, assim, como o microrganismo da banda 41 tem também a mesma identificação que o da banda 2, Bactéria A-22, o que significa que tanto o

microrganismo identificado na banda 49, como o da banda 41, para além de presentes nas amostras iniciais de caracterização da ETAR, são resistentes à ciprofloxacina, dado que no final das culturas dos enriquecimentos foram também identificados. O microrganismo das bandas 46 e 47 têm a mesma identificação que o da banda 53, *Pseudomonas aeruginosa*, o que significa que para além de presente nas culturas mistas finais de enriquecimento cultivável, este microrganismo está também presente na população bacteriana cultivável inicial em meio PCA.

Constatou-se que a população bacteriana total da ETAR é diferente da das culturas mistas finais dos enriquecimentos, em termos de população bacteriana total e cultivável, uma vez que, em ambas as caracterizações apenas existem duas bactérias e uma espécie igual. Pode também inferir-se que houve uma redução da diversidade, em termos de população bacteriana inicial, quando comparada com a das culturas mistas finais dos enriquecimentos, nestas existem, possivelmente, microrganismos minoritários, que embora estivessem presentes nas amostras iniciais da ETAR, mas por não serem majoritários, apenas foram identificados nas culturas mistas finais de enriquecimento.

Todas as bandas cuja identificação não conta da tabela 5, bandas 40 e 42, apesar de terem sido cortadas do gel de DGGE (figura 6), por não apresentarem pureza suficiente, não puderam ser identificadas através das bases de dados disponíveis via internet.

Ao mesmo tempo que foi efectuada a caracterização da população bacteriana total e cultivável na presença e ausência de antibiótico, das culturas mistas finais dos enriquecimentos, seleccionaram-se também oito colónias, com morfologia colonial distinta, das várias culturas, de água residual afluyente e lamas activadas, em meio PCA com antibiótico, posteriormente isoladas em meio PCA. Após a sua purificação, os isolados foram caracterizados através da sua morfologia colonial, coloração de Gram e presença de catalase e de citocromo c oxidase (tabela 6), foram submetidos a testes de sensibilidade a 12 antibióticos, através do método de antibiograma (tabelas 7 e 8) e fez-se a sequenciação do gene 16S rRNA para se proceder à sua identificação (tabela 9).

Tabela 6 - Morfologia colonial, técnica de Gram, Catalase e Oxidase dos vários isolados

Colónias	Morfologia colonial	Morfologia celular	Gram	Catalase	Oxidase
1	Circular, grande, plana e de cor branca castanha	Bacilos curtos, com células muito pequenas	-	+	+
2	Circular, pequena, plana, reflexo madreperla e de cor castanha	Bacilos células pequenas			
3	Circular, pequena, plana e de cor castanha	Bacilos células pequenas com semiorganização			
4	Circular, grande, plana, convexas e de cor bege translúcido	Bacilos com filamentos			
5	Circular, muito pequena, plana e de cor branca translúcida	Cocobacilos			
6	Circular, grande, plana e de cor castanha	Bacilos curtos, com células muito pequenas			
7	Circular, muito pequena, plana e de cor amarela translúcida	Bacilos com filamentos			
8	Irregular, plana, ondulada, viscosa, arrastada e de cor amarela	Bacilos curtos			

Tabela 7 - Diâmetro dos halos de inibição das várias colónias, para o primeiro grupo de antibióticos e sua identificação como resistente, intermédia ou sensível

Colónias	Diâmetro dos halos de inibição para o primeiro grupo de antibióticos (mm)					
	Amoxicilina	Gentamicina	Ciprofloxacina	Sulfametoxazol+ Trimetropim	Tetraciclina	Cefalotina
1	R	15, S	R	40, S	40, S	20, S
2	11, R	26, S	R	32, S	40, S	40, S
3	S	26, S	R	R	26, S	S
4	R	R	R	26, S	R	R
5	26, S	15, S	12, R	16, S	13, I	26, S
6	R	S	R	19, S	20, S	S
7	-	-	-	-	-	-
8	R	R	R	30, S	R	R
<i>E. coli</i>	20, I	17, S	32, S	24, S	22, S	16, S

Tabela 8 - Diâmetro dos halos de inibição das várias colónias, para o segundo grupo de antibióticos e sua identificação como resistente, intermédia ou sensível

Colónias	Diâmetro dos halos de inibição para o segundo grupo de antibióticos (mm)					
	Meropenem	Ceftazina	Tricarilina	Colistine Sulfato	Sulfametoxazol	Estreptomicina
1	40, S	40, S	40, S	14, S	R	R
2	30, S	18, I	40, S	16, S	R	10, R
3	40, S	40, S	40, S	29, S	R	R
4	23, S	R	R	R	44, S	R
5	S	S	S	S	R	20, S
6	28, S	22, S	S	17, S	R	R
7	-	-	-	-	-	-
8	35, S	26, S	15, R	21, S	20, S	18, S
<i>E. coli</i>	28, S	24, S	23, S	15, S	R	14, I

Tabela 9 - Produtos de PCR, % de similaridade, género e /ou espécie microbiológica identificada e origem [37]

Produtos de PCR	% de Similaridade	Género e/ou Espécie Microbiológica Identificada	Origem
1	99	<i>Comamonas testosteroni</i>	Bactéria que degrada <i>taurocholate</i>
2	99	<i>Flavobacteriaceae</i> WHO 32	Bactéria isolada de comunidades microbianas de um fermentador metanogénico
3	100	<i>Chitinophaga terrae</i>	Bactéria isolada de um solo
4	98	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	Isolado de bactérias termófilas e acidófilas do mar Sea
5	99	<i>Bosea thiooxidans</i>	Bactéria cultivável do intestino de <i>Cylindrojulus</i>
6	98	<i>Comamonas testosteroni</i>	Bactéria que degrada <i>taurocholate</i>
7	99	<i>Acidovorax temperans</i>	Desconhecida

Todos os isolados eram bacilos Gram -, catalase e oxidase positivas e isto está de acordo, após consulta em alguns artigos, com as várias identificações posteriormente efectuadas através da sequenciação do gene 16S rRNA.

A resistência destes isolados à ciprofloxacina foi confirmada através do método de difusão em disco. Para além desta confirmação, avaliou-se também a sua susceptibilidade, através de 11 antibióticos para os quais há indicação de serem passíveis de conduzir à proliferação de microrganismos resistentes.

Tal como foi previsível, todos os isolados eram resistentes à ciprofloxacina e 50 % são resistentes à amoxicilina, 25 % à gentamicina, 12,5 % ao sulfametoxazol+trimetropim, 25 % à tetraciclina, 25 % à cefalotina, nenhum é resistente ao meronemo, 12,5 % à ceftazina, 25 % à tricarciclina, 12,5 % ao colistine sulfato, 75 % ao sulfametoxazol e 62,5 % à estreptomina.

Os microrganismos dos isolados 1 e 6 são da mesma espécie, *Comamonas testosteroni* e que o microrganismo da banda 23. Estes para além de presentes em amostras das culturas mistas finais dos enriquecimentos, estão também presentes nas amostras iniciais cultiváveis, em meio PCA com antibiótico.

O sétimo isolado como ao fim de 48 h, não apresentava crescimento, a sua susceptibilidade a antibióticos não pôde ser testada. O oitavo isolado, não foi identificado, dado não apresentar pureza suficiente para ser comparável através das bases de dados, disponíveis via Internet.

O emprego da técnica de DGGE, como aspecto inovador no âmbito do tratamento de águas residuais nas ETAR's pode ser considerada uma mais-valia para a ETAR estudada, na medida em que, esta permite obter informações acerca das comunidades bacterianas presentes, quais dessas são susceptíveis de apresentar resistência a antibióticos, um problema de saúde pública à escala mundial, bem como, das possíveis alterações que possam surgir na estrutura da

mesma, podendo, assim, conseqüentemente, denunciar a existência de irregularidades ao nível do funcionamento da ETAR e até mesmo, identificar a origem do problema.

Relativamente a um estudo efectuado também a uma ETAR da região Norte, pôde constatar-se que os microrganismos das bandas 1 e 6, também foram identificados nessa ETAR, o que nos indica que a população bacteriana que se desenvolve a nível das ETAR's pode ser considerada parecida, embora com algumas reservas.

Relativamente a outros estudos efectuados e publicados, os microrganismos das bandas, 15, 26 e 27, da espécie *Acinetobacter*, foram também identificados em ETAR's, em aquaculturas, etc., onde foi detectada a sua presença no efluente final, antes da descarga para o meio hídrico e directamente na aquacultura. Esta espécie foi identificada como resistente aos seguintes antibióticos: ciprofloxacina, norfloxacina e cefalexina. Pode depreender-se que a identificação dos microrganismos das bandas anteriormente enumeradas contribui para o estudo do aumento de resistências e a promoção da selecção de bactérias resistentes e a sua conseqüente libertação no ambiente, entrando nos sistemas aquáticos, provocando danos no ecossistema e potencialmente na saúde pública [14, 62].

Alguma da bibliografia pesquisada indica a presença de enterobactérias resistentes a antibióticos em esgotos hospitalares, ETAR's, etc. Este grupo de bactérias é encontrado nos produtos da excreção humana, que através da água residual doméstica chegam às ETAR's, dado que estas são locais onde se promove o tratamento deste tipo de água. Pode então concluir-se que, a identificação deste tipo de bactérias a nível das ETAR's é esperado ser uma prática comum, contudo o elevado grau de resistência, que é muitas vezes identificado nestas populações, tem vindo a assumir níveis preocupantes a nível clínico, etc. Seria esperado que neste projecto se identificassem mais bandas cujo microrganismo fosse pertencente a este grupo de bactérias, contudo, apenas o microrganismo da banda 19, *Enterobacter cloacae*, foi identificado como pertencente, sendo susceptível de ser cultivável e resistente em meio PCA com ciprofloxacina, na concentração usada [8, 9, 17].

A presença de microrganismos resistentes a fluoroquinolonas, cuja resistência foi testada através do método de antibiograma, foram identificados como *Pseudomonas aeruginosa*, tal como os das bandas 46, 47 e 53 (as duas primeiras das culturas mistas finais dos enriquecimentos e a última das amostras cultiváveis em meio PCA, da ETAR) e foram detectados em sistemas de água residual clínica, águas residuais municipais e a nível da água residual afluyente, efluente final de ETAR's e do recurso hídrico onde é descarregado o efluente, etc. Os 119 isolados, identificados fenotipicamente foram obtidos através do método de enriquecimento e a concentração maior deste tipo de microrganismos resistentes verificou-se na água residual de origem clínica [61].

Diversos testes a nível da biodegradabilidade de fluoroquinolonas, entre outros antibióticos, são efectuados, usando-se isolados, a partir de água residual e um dos microrganismos muito usado nestes estudos é a espécie *Pseudomonas*

putida, microrganismo também identificado pelas bandas 44 e 45 das culturas finais de enriquecimento [63, 64].

Para a quantificação, por HPLC, da ciprofloxacina, das culturas mistas finais dos enriquecimentos, efectuaram-se dois controlos abióticos, sem inóculo e foi necessário avaliar, se a degradação do antibiótico era feito por organismos cultiváveis ou se por outros que estão no meio líquido, mas que não crescem nos meios sólidos e assim sendo, inoculou-se um *erllenmeyer* com células resultantes da extracção de heterotróficos das amostras de água residual afluyente e lamas activadas em meio PCA, das culturas mistas finais dos enriquecimentos (amostra A) e do mesmo modo em meio PCA com antibiótico (amostra B).

Tabela 10 - Resultados da quantificação, em HPLC, das diversas amostras, em termos de concentração, nos tempos iniciais e finais e percentagem de redução

Amostras (em duplicado)	Concentração média obtida (mg/L)		Concentração usada (mg/L)	Percentagem de Redução (%)			
	t _{inicial}	t _{final}					
Controlo abiótico	251,4	237,3	252,1	5,6			
Controlo abiótico							
Água residual afluyente	268,1	219,4		252,1	18,1		
Água residual afluyente							
Lamas activadas	246,3	235,7			252,1	4,3	
Lamas activadas							
A	229,4	213,4				252,1	7,0
B	244,6	218,5					10,7

No tempo inicial, adicionou-se uma quantidade calculada de ciprofloxacina às culturas de enriquecimento, esse valor foi de 252,1 mg/L. Para os diversos tempos iniciais, os valores de concentração média obtida pelo HPLC, situam-se entre 213,4 e 268,1 mg/L, indicando que o método usado na quantificação era reprodutível e fiável e que desvios que existam entre o valor usado e o valor médio obtido, devem-se possivelmente a desvios a nível do aparelho usado, contudo seria necessário ter-se calculado o desvio padrão associado a cada análise efectuada.

Através da análise entre os diversos tempos iniciais e finais, em todas as amostras houve redução da concentração de ciprofloxacina. A percentagem de redução obtida situa-se entre 4,3 e 18,1 %.

Para saber se a ciprofloxacina se degrada ou não, para os controlos abióticos, o valor inicial médio de concentração de ciprofloxacina foi de 251,4 mg/L e o valor final médio de 237,3 mg/L, o que nos indica que a ciprofloxacina não se degrada biologicamente, ao fim dos sete dias de incubação, uma vez que a percentagem de redução obtida é de 5,6 %, valor considerado baixo.

Em relação à percentagem de redução obtida para as duas amostras de água residual afluyente, dado que esta é superior à obtida para os controlos

abióticos, pode dizer-se que os microrganismos presentes nestas amostras podem ter capacidade para degradar a ciprofloxacina, contudo novos ensaios confirmativos teriam que ser efectuados.

Em relação à percentagem de redução obtida para as duas amostras de lamas activadas, dado que esta é inferior à obtida para os controlos abióticos, pode dizer-se que os microrganismos presentes nestas amostras não têm capacidade para degradar a ciprofloxacina.

Relativamente às amostras A e B e à pergunta, se a degradação do antibiótico era feito por organismos cultiváveis ou se por outros que estão no meio líquido, mas que não crescem nos meios sólidos, dadas as percentagens de redução obtidas para ambas as amostras, embora superiores às dos controlos abióticos, mas não significativamente, pode concluir-se que não existe degradação da ciprofloxacina por parte destes microrganismos e não é assim possível dar-se uma resposta à pergunta formulada.

6. Conclusões

- Quando se comparam os organismos presentes a nível de água residual afluyente, efluente final e lamas activadas, verificou-se que a densidade bacteriana é sempre superior nas lamas activadas, que apresentam microrganismos que fazem o tratamento da água que chega à ETAR. Por outro lado, constatou-se que a ETAR reduz a carga microbiana, desde a água residual afluyente até ao efluente final, descarregado no meio hídrico;
- São susceptíveis de serem descarregadas, através do efluente final da ETAR, para o meio hídrico, diariamente, cerca de $7,11 \times 10^{13}$ células resistentes à ciprofloxacina;
- A aplicação da técnica de DGGE permitiu caracterizar inicialmente, a população bacteriana total e cultivável, na presença e ausência de antibiótico, da água residual afluyente, efluente final e das lamas activadas e caracterizar a população bacteriana total e cultivável, na presença e ausência de antibiótico, das culturas mistas finais dos enriquecimentos, fazendo-se no total 45 identificações;
- Em termos de caracterização da população bacteriana total e cultivável da ETAR, na presença e ausência de antibiótico, através da técnica de DGGE, identificaram-se 34 géneros e/ou espécies microbiológicas;
- Constatou-se que a população bacteriana total da ETAR é diferente da cultivável, uma vez que, em ambas as caracterizações não existem géneros e/ou espécies microbiológicas iguais;
- Conseguiu avaliar-se a capacidade dos microrganismos presentes na água residual afluyente e nas lamas activadas da ETAR resistirem à ciprofloxacina, através da adição até 250 mg/L desta, à população bacteriana dessa mesma ETAR e do método de enriquecimento, pela obtenção de percentagens de resistência de 100% à concentração usada, no final da oitava semana de ensaios;
- Em termos de caracterização da população bacteriana total e cultivável, na presença e ausência de antibiótico, das culturas mistas finais dos enriquecimentos, através da técnica de DGGE, identificaram-se 11 géneros e/ou espécies microbiológicas;
- A espécie *Pseudomonas aeruginosa* e as bactérias A-22 e SVAL 2.36, identificados na população bacteriana, das culturas mistas finais dos enriquecimentos, apresentam-se também, respectivamente, na caracterização da população bacteriana da ETAR;
- Através do método de antibiograma, que funcionou como um teste confirmativo, verificou-se que todos os isolados apresentam resistência à ciprofloxacina, tal como seria esperado e também a um número diverso de outros antibióticos testados;
- A espécie *Comamonas testosteroni*, identificada nos isolados 1 e 6, apresentam-se também, na caracterização da população bacteriana cultivável da ETAR, na presença de antibiótico;
- Em última análise, constatou-se que a população bacteriana da ETAR é diferente da das culturas mistas finais dos enriquecimentos, em termos de

população bacteriana total e cultivável, uma vez que, em ambas as caracterizações apenas existem duas bactérias e duas espécies iguais;

- Inúmeros estudos publicados focam a resistência antibiótica à ciprofloxacina como um problema em larga escala, assumindo mesmo níveis preocupantes. Muitos dos microrganismos identificados como resistentes, *Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Arcobacter cryaerophilus*, encontram-se também nas 45 identificações que se efectuaram ao longo do projecto;

- Constatou-se que a ciprofloxacina não se degrada biologicamente;

- Para as amostras de água residual afluyente, pode dizer-se que os microrganismos presentes nestas amostras podem ter capacidade para degradar a ciprofloxacina, contudo novos ensaios confirmativos teriam que ser efectuados.

7. Avaliação do Trabalho Realizado

7.1. Objectivos Realizados

Caracterizou-se a população bacteriana total e cultivável, na presença e ausência de antibiótico da ETAR, por DGGE. Avaliou-se a capacidade dos microrganismos presentes na água residual afluyente e nas lamas activadas dessa ETAR, degradarem a ciprofloxacina, através do método do enriquecimento. Caracterizou-se a população bacteriana total e cultivável, na presença e ausência de antibiótico das culturas mistas finais de enriquecimento, por DGGE e destas fez-se a quantificação, por HPLC, da ciprofloxacina.

7.2. Outros Trabalhos Realizados

Para além dos objectivos realizados, referidos anteriormente, procedeu-se aos seguintes testes de caracterização fenotípica preliminar: morfologia colonial, coloração de Gram, presença de catalase, de citocromo c oxidase, testes de sensibilidade a antibióticos, através do método de antibiograma e a sequenciação do gene do 16S rRNA, dos oito isolados seleccionados das culturas mistas finais dos enriquecimentos. Este objectivo não foi delineado no início do trabalho experimental, mas esta etapa foi extremamente importante, dado que foi possível isolar, caracterizar e identificar microrganismos resistentes à ciprofloxacina,

7.3. Limitações e Trabalho Futuro

As limitações deste trabalho experimental apenas se prenderam com questões temporais, ou seja, o tempo para a realização deste projecto foi um pouco curto e no final do mesmo foi necessário muito trabalho extra e inúmera dedicação.

Em termos de desenvolvimento futuro, poderá fazer-se um trabalho semelhante, mas com o uso de antibióticos diferentes, efectuarem-se culturas de enriquecimento, mas também, de efluente final, etc.

7.4. Apreciação Final

Relativamente ao trabalho desenvolvido durante a realização deste projecto, este constituiu uma etapa importante na minha aprendizagem como aluna de Mestrado Integrado em Engenharia Química e foi um desafio constante às minhas capacidades, numa área pouco explorada ao longo de todo o curso, a área da Microbiologia.

8. Referências Bibliográficas

8.1. Artigos, Livros e Revistas

- [1].Bitton, G., *Wastewater Microbiology*, 1994, New York, Wiley-Liss, pp. 105-107, 139-147 e 209-229;
- [2].Bok, J. and Zwart, G., *Protocol DGGE*, Department of Microbial Ecology, Center for Limnology, Netherlands Institute of Ecology;
- [3].Caplin, JL., Hanlon, GW. and Taylor, HD., *Presence of vancomycin and ampicillin-resistant Enterococcus faecium of epidemic clonal complex-17 in Wastewaters from the south coast of England*, *Environmental Microbiology*, 2008, 10:4, 885-892;
- [4].Córdova-Kreylos, AL. and Scow, KM., *Effects of ciprofloxacin on salt marsh sediment microbial communities*, *The ISME Journal*, 2007, 1:7, 585-595;
- [5].Edge, TA. and Hill, S., *Occurrence of antibiotic resistance in Escherichia coli from surface waters and fecal pollution sources near Hamilton Ontario*, *Canadian Journal of Microbiology*, 2005, 51:6, 501-505;
- [6].Ercolini, D., *PCR-DGGE fingerprinting: Novel strategies for detection of microbes in food*, *Journal of microbiological methods*, 2004, 56:3, 297-314;
- [7].Espigares, E., Bueno, A., Espigares, M. and Gálvez, R., *Isolation of Salmonella serotypes in wastewater and effluent: Effect of treatment and potential risk*, *International journal of hygiene and environmental health*, 2006, 209:1, 103-107, Elsevier, Jena, ALLEMAGNE;
- [8].Ferreira da Silva, M., Tiago, I., Veríssimo, A., Boaventura, RA., Nunes, OC. e Manaia, CM., *Antibiotic resistance of enterococci and related bacteria in an urban wastewater treatment plant*, *FEMS microbiology ecology*, 2006, 55:2, 322-329, Blackwell, Oxford, ROYAUME-UNI;
- [9].Ferreira da Silva, M., Vaz-Moreira, I., Gonzalez-Pajuelo, M., Nunes, OC. e Manaia, CM., *Antimicrobial resistance patterns in Enterobacteriaceae isolated from an urban wastewater treatment plan*, *FEMS microbiology ecology*, 2007, 60:1, 166-176, Blackwell, Oxford, ROYAUME-UNI;
- [10].Fialho, A., Moreira, L., Tavares, A. e Sá-Correia, I., *Protocolos das Aulas Laboratoriais de Bioquímica e Biologia Molecular*, Instituto Superior Técnico, 2006;
- [11].GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit;
- [12]. Krol, GJ., Beck, GW. and Benham, T., *HPLC analysis of ciprofloxacin and ciprofloxacin metabolites in body fluids*, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, Congrès International symposium on pharmaceutical and biomedical analysis n°6, Saint Louis MO, ETATS-UNIS (23/04/1995), 1995, 14:1-2, 181-190, Elsevier Science, Amsterdam, PAYS-BAS;
- [13].Gray, N., *Biology of Wastewater Treatment*, Series on Environmental Science and Management, 2004, 2nd edition, Dublin, Ireland, Imperial College Press, vol. 4, Chapters 1, 2, 3, 5 and 6;
- [14].Guardabassi, L., Dalsgaard, A. and Olsen, J.E., *Phenotypic characterization and antibiotic resistance of Acinetobacter sp isolated from aquatic sources*,

- Journal of applied microbiology, 1999, 87:5, 659-667, Blackwell Science, Oxford, ROYAUME-UNI;
- [15]. Espinosa-Mansilla, A., De La Pena, AM., Gonzalez Gomez, D. and Canada-Canada, F., *HPLC determination of ciprofloxacin, cloxacillin, and ibuprofen drugs in human urine samples*, Journal of separation science, 2006, 29:13, 1969-1976, Wiley, Weinheim, Allemagne;
- [16]. Instruções de funcionamento do Termociclador;
- [17]. Jarnheimer, PA., Ottoson, J., Lindberg, R., Stenstrom, TA., Johansson, M., Tysklind, M., Winner, MM. and Olsen, B., *Fluoroquinolone antibiotics in a hospital sewage line; occurrence, distribution and impact on bacterial resistance*, Scandinavian journal of infectious diseases, 2004, 36:10, 752-755, Taylor & Francis, Basingstoke, ROYAUME-UNI;
- [18]. Tuerk, J., Reinders, M., Dreyer, D., Kiffmeyer, TK., Gerhard, K. and Kuss, HM., *Analysis of antibiotics in urine and wipe samples from environmental and biological monitoring-Comparison of HPLC with UV-single MS-and tandem MS-detection*, Journal of Chromatography B, 2006, 831, Issues 1-2, 72-80;
- [19]. Keyser, M. et. al., *PCR-based DGGE fingerprinting and identification of methanogens detected in three different types of UASB granules*, 2005;
- [20]. Sowinski, KM. and Kays, MB., *Determination of ciprofloxacin concentrations in human serum and urine by HPLC with ultraviolet and fluorescence detection*, Journal of clinical pharmacy and therapeutics, 2004, 29:4, 381-387, Blackwell, Oxford, ROYAUME-UNI;
- [21]. Laboratory of Microbial Ecology, *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)*. Department of Earth, Ecological and Environmental Sciences, University of Toledo, Journal of microbiological methods, 2004, 57:1, 17-22, Elsevier Science, Shannon, IRLANDE;
- [22]. Luciano D., *Métodos Moleculares para análise do DNA*, Centro Universitário da Fundação de Ensino Octávio Bastos, 2004;
- [23]. Barreiros, L., Fernandes, A., Ferreira, ACS., Pereira, H., Bastos, MMSM., Manaia, CM. and Nunes, OC., *New insights into a bacterial metabolic and detoxifying association responsible for the mineralization of the thiocarbamate herbicide molinate*, Microbiology-SGM, 2008, 154:4, 1038-1046;
- [24]. Luisa Barreiros, Balbina Nogales, Célia M. Manaia, António C. Silva Ferreira, Dietmar H. Pieper, Maria A. Reis, Olga C. Nunes; *A novel pathway for mineralization of the thiocarbamate herbicide molinate by a defined bacterial mixed culture*, Environ. Microbiol, 2003, 5, 944-953;
- [25]. Madigan, Martinko, Parker, *Brock Biology of Microorganisms*, 2000, 9th edition, Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey;
- [26]. Kamberi, M., Tsutsumi, K., Kotegawa, T., Nakamura, K. and Shigeyuki Nakano; *Determination of ciprofloxacin in plasma and urine by HPLC with ultraviolet detection*, *Clinical Chemistry*, 1998, 44, 1251-1255, American Association for Clinical Chemistry;
- [27]. Metcalf & Eddy, *Wastewater Engineering - Treatment, Disposal and Reuse*, 1995, 3rd edition, New York, TATA MCGRAW - HILL EDITION, p. 11, chapters 3 and 4, 167-169, 359-364, 429 e 689-741;

- [28]. Métodos de Estudo em Genética Molecular (<http://www2.ufp.pt/~jcabeda/pdf/section%206bactual1.pdf>);
- [29]. Silva, MF., Tiago, I., Veríssimo, A., Boaventura, AR., Nunes, OC. e Manaia, CM., *Antibiotic resistance of enterococci and related bacteria in an urban wastewater treatment plant*, FEMS Microbiol Ecol., 2006, 55:2, 322-9;
- [30]. Mukherjee, S., Bhadra, B., Chakraborty, R., Gurung, A., Some, S. and Chakraborty, R., *Unregulated use of antibiotics in Siliguri city vis-a-vis occurrence of MAR bacteria in community waste water and river Mahananda, and their potential for resistance gene transfer*, J Environ Biol. 2005, 26:2, 229-38;
- [31]. PowerSoil™ DNA Isolation Kit;
- [32]. Reação Polimerásica em Cadeia (PCR) <http://www.dbbm.fiocruz.br/helpdesk/mbiology/PCRcurso.pdf>;
- [33]. Rochelle, P., *Environmental Molecular Microbiology: Protocols and Applications*, England: Horizon Scientific Press., 2001, pp. 141-160;
- [34]. Silva, J., Loyola, P., Galleguillos, J., Rodríguez, Y., Colque-Navarro, P., Möllby, R. and Kühn, I., *Prevalence of antibiotic resistant Enterococcus sp in waste waters in the north of Chile*, Rev Med Chil., 2005, 133:10, 1201-10;
- [35]. Sousa, JC., Manual de antibióticos antibacterianos, 2006, 2ª edição, Porto, Edições Universidade Fernando Pessoa;
- [36]. Sungpyo, L. and Aga, AS., *Potential Ecological and Human Health Impacts of Antibiotics and Antibiotic-Resistant Bacteria from Wastewater Treatment Plants*, Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B, 2007, 10, Issue 8, 559 - 573.

8.2. Sítios (consultados em Junho de 2008)

- [37]. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>;
- [38]. http://home.uevora.pt/~ueline/quimica_para_todos/podem_os_medicamentos_que_usamos_prejudicar_o_meio_ambiente.pdf;
- [39]. <http://marcosapontamentos.blogspot.com/2007/08/os-perigos-do-uso-inadequado-de.html>;
- [40]. <http://www.ambiente.maiadigital.pt/ambiente/agua/mais-informacao-1/sobre-o-tratamento-e-drenagem-das-aguas-residuais-da-maia-1/etar-de-parada/?searchterm=contentores>;
- [41]. <http://www.aquaporservicos.pt/index.php?id=19>;
- [42]. <http://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/Plate-Count-Agar-Standard-Methods-Agar.pdf>;
- [43]. http://www.cnps.embrapa.br/solosbr/pdfs/doc_68_protocolo%20laboratorial.pdf;
- [44]. <http://www.confagri.pt/Ambiente/AreasTematicas/Agua/TextoSintese/Antecedentes/>;
- [45]. <http://www.drashirleydecampos.com.br/noticias/21297>;
- [46]. <http://www.e-escola.pt/site/topico.asp?topico=366>;
- [47]. <http://www.emedicinehealth.com/antibiotics/article-em.htm>;

- [48].http://www.fct.mctes.pt/projectos/pub/2006/Painel_Result/vglobal_projecto.asp?idProjecto=71236&idElemConcurso=856;
- [49].<http://www.fen.ufg.br/revista/v10/n1/v10n1a17.htm>;
- [50].http://www.fe.up.pt/si/PROJECTOS_GERAL.MOSTRA_PROJECTO?P_ID=1161;
- [51].<http://www.ff.up.pt/toxicologia/monografias/ano0304/CIPROFLOXACINA.html>;
- [52].http://www.guardagua.5gbfree.com/analise_agua.html;
- [53].http://www.guardagua.5gbfree.com/tecnica_membrana_filtrante.html;
- [54].<http://www.ideiasambientais.com.pt>;
- [55].<http://www.naturlink.pt/canais/Artigo.asp?iArtigo=104&iLingua=1>;
- [56].<http://www.naturlink.pt/canais/Artigo.asp?iArtigo=9539&iLingua=1>;
- [57].<http://www.seleccoes.pt/Revista/detalhe.asp?tipo=detalhe&ID=3874&pag=2&area=16>;
- [58].http://www.srsdocs.com/parcerias/revista_imprensa/jornal_madeira/2005/jm_2005_11_28_02.htm;
- [59].<http://www.textbookofbacteriology.net>;
- [60].<http://www.web-books.com/MoBio/>;
- [61].http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16819959?ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum;
- [62].<http://www.scopus.com/scopus/record/display.url?view=basic&eid=2-s2.0.00033398229&origin=resultslist&sort=plff&src=s&st1=waste+water+microbial+resistance+ciprofloxacin&st2=&sid=3WWFP8inDWlffZWuh1QIKy4%3a40&sot=b&sdt=b&sl=61&s=TITLEABSKEY%28waste+water+microbial+resistance+ciprofloxacin%29&relpos=11>;
- [63].http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10398765?ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum;
- [64].http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10705547?ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DiscoveryPanel.Pubmed_Discovery_RA.

9. Anexos

9.1. Cultura de Bactérias

A cultura de bactérias consiste no crescimento de colónias destes organismos para facilitar o seu estudo. Na maior parte das vezes, o estudo da morfologia, arranjo e a interpretação das propriedades de coloração são insuficientes para a identificação do agente bacteriano. Recorre-se então à cultura, para se conseguir um elevado número de microrganismos, para estudar as características culturais da bactéria, como a capacidade de crescer em meio selectivo, a morfologia das colónias formadas, etc. Através da cultura em meios sólidos, pode também quantificar-se a presença bacteriana no material analisado, obtendo-se colónias para a realização de testes de identificação ou obter inóculo para suspensão para a realização de antibiograma

Assim, para a realização de uma cultura bacteriana, precisa-se de um inóculo e de um meio de cultura. O meio de cultura é uma substância líquida ou gelificada, simples ou complexa, que permite a nutrição, o crescimento e a multiplicação dos microrganismos. Com efeito, o meio de cultura deve oferecer condições o mais próximas possível das condições naturais.

Os meios de cultura podem ser classificados, segundo o seu estado físico, pela sua composição e a sua utilização. No que respeita ao seu estado físico ou consistência, os meios podem ser sólidos, semi-sólidos ou líquidos; quanto à consistência e à sua turvação, o indicador de crescimento bacteriano. Os meios gelificados permitem o crescimento das células formando colónias. As geloses são obtidas a partir de um meio líquido ao qual é adicionado uma substância gelificante, como por exemplo o agár-agár, que apenas promove a gelificação do meio. O agár é um gel produzido a partir de certas algas vermelhas, muito usado em microbiologia para culturas sólidas de bactérias. É especialmente útil por manter-se sólido a temperaturas normalmente usadas na cultura de bactérias. As culturas, em meio sólido, são muito importantes pois permitem a identificação e isolamento de culturas puras.

Relativamente à composição do meio, podem ser classificados como naturais ou sintéticos e enriquecedor, selectivo, diferenciador ou de manutenção, quanto à função. Finalmente, em relação à prática laboratorial, podem considerar-se os meios de base, que contêm os nutrientes mínimos essenciais ao crescimento e multiplicação bacterianas, os meios enriquecidos, meios aos quais foram adicionados produtos biológicos e meios selectivos, quando há alteração de um ou mais factores físico-químicos ou se adicionam substâncias com uma acção antibacteriana.

O isolamento bacteriano trata-se da obtenção de culturas puras, que apresentam só uma estirpe de bactérias, a partir de culturas mistas que apresentam mais do que uma estirpe bacteriana. O isolamento pode ser efectuado por processos biológicos, usando meios de cultura selectivos, ou por processos mecânicos, sendo a técnica das diluições a mais utilizada. Nesta

técnica vai-se diluindo sucessivamente o inóculo em solução de salina estéril [25, 59].

9.2. Meio de Cultura

Os meios de cultura destinam-se ao cultivo artificial de microrganismos. Estes meios fornecem os princípios nutritivos indispensáveis ao seu crescimento. Entre os principais componentes de um meio de cultura estão as fontes de carbono e energia, como os hidratos de carbono e as fontes de azoto, fósforo e sais minerais, que são designados de macronutrientes. Outros componentes mais específicos podem ser encontrados num meio para determinados organismos, sendo estes os micronutrientes ou factores de crescimento como as vitaminas, aminoácidos, etc. [25].

9.2.1. *Plate Count Agar (PCA)*

O *Plate Count Agar (PCA)* é um meio de cultura microbiológico muito usado para a quantificação da população microbiana total de uma amostra. Existem meios de PCA com várias misturas, tonalidades e granulometria, embora este meio seja normalmente de cor amarelada e de granulometria média. Este meio de cultura permite obter uma estimativa específica do número total de bactérias contidas numa determinada amostra.

Contém um número limitado de nutrientes quando comparado com a quantidade de nutrientes existente no meio ambiente. Menos de 0,01 a 0,001 % das espécies actuais de bactérias e fungos presentes no meio ambiente são capazes de crescer em qualquer tipo de meio de cultura [42].

Para a preparação de 1 L de meio nutritivo PCA pesaram-se 23,5 g deste meio, para um frasco Schott e posteriormente adicionou-se 1 L de água destilada, colocou-se o frasco Schott a agitar e procedeu-se à esterilização do meio, em autoclave, a 121 °C e 1,2 bar, durante 15 min. Após o período de esterilização e arrefecimento do meio, este foi distribuído, asépticamente, em placas de Petri estéreis, cerca de 10mL/placa. Por fim, após solidificação, as placas foram invertidas e conservadas a 4 °C.

9.3. Preparação das Culturas de Enriquecimento

Para a preparação de 1 L de meio mínimo foi necessário um frasco Schott de 1 L, uma barra magnética, 4 pipetas graduadas, uma de 20 mL, outra de 10 mL e outras duas de 1mL, todo este material tinha que estar estéril. Ao frasco Schott de 1 L, adicionou-se 970 mL de água destilada, 0,53 g de sulfato de amónia, uma barra magnética e colocou-se este conjunto e também 500 mL de água destilada, em autoclave, a 121 °C e 1,2 bar, durante 15 min. Promoveu-se o arrefecimento do frasco Schott e adicionou-se 20 mL de tampão fosfato, 6 mL de macronutrientes, 1 mL de micronutrientes e 1 mL de CaCl₂, por esta ordem, todo este procedimento realizou-se em ambiente

asséptico à chama do bico de Bunsen. Por último, com água estéril fria, fez-se o volume até à marca de 1 L.

A solução de micronutrientes (100X) apresenta a seguinte composição: 1,3 mL de HCl a 25%, 0,07 g de $ZnCl_2$, 0,1 g de $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 0,062 g de H_3BO_3 , 0,19 g de $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 0,017 g de $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, 0,024 g de $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ e 0,036 g de $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$.

A solução de macronutrientes, para perfazer um volume de 1 L, apresenta a seguinte composição: 73,65 g de NaCl a 1,26 M, 27,35 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ a 0,135 M e 0,55 g $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ a 0,865 mM. As quantidades referidas foram dissolvidas num litro de água destilada e a solução foi esterilizada, em autoclave, a 121 °C e 1,2 bar, durante 15 min. Ambas as soluções de micro e macronutrientes, juntamente com a solução de $CaCl_2$ são mantidas a 4 °C.

O tampão fosfato (1,35 M), para perfazer um volume de 1 L, obter-se uma concentração final do meio de 27 mM e um pH de 7,2, apresenta a seguinte composição: 50 g de KH_2PO_4 e 175 g de $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$. A massa de cada sal foi dissolvida, em separado, em 500 mL de água destilada. Para uma mais fácil solubilização, a solução de $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ foi aquecida. Após arrefecimento, à temperatura ambiente, mediu-se o seu pH e adicionou-se a solução de KH_2PO_4 até acertar o pH a 7,2. Seguidamente, transferiu-se a solução tampão para um frasco Schott e esterilizou-se em autoclave, a 121 °C e 1,2 bar, durante 15 min. A solução tampão obtida foi armazenada à temperatura ambiente para evitar que os sais precipitassem [24].

Para a preparação do extracto de levedura, como este se apresenta em forma de pó amarelo, pesou-se uma quantidade calculada, num frasco de vidro; adicionou-se e dissolveu-se em água destilada e a solução preparada foi agitada, rolhada e colocada, em autoclave, a 121 °C e 1,2 bar, durante 15 min.

Para a preparação do antibiótico, ciprofloxacina, preparou-se uma solução deste a 1 g/L. Como o antibiótico é um pó branco, pesou-se uma quantidade calculada, que foi diluída em água destilada e posteriormente a solução foi filtrada e esterilizada usando um filtro de nitrato de celulose com poros de 0,2 μm .

Como as culturas de enriquecimento eram mantidas em *erllenmeyers* foi necessário, previamente, proceder à sua esterilização, em autoclave, a 121 °C e 1,2 bar, durante 15 min.

A cada um dos *erllenmeyers* estéreis, no tempo zero das culturas de enriquecimento, adicionou-se 15 mL de meio mínimo, para as culturas de água residual afluyente, 5 mL de inóculo e uma quantidade calculada de extracto de levedura e antibiótico. Para as culturas de lamas activadas, o processo foi análogo, mas adicionou-se 16 mL de meio mínimo e 4 mL de inóculo. Este procedimento foi feito em duplicado, usaram-se pipetas graduadas estéreis e micropipetas com pontas estéreis, tanto para a amostra de água residual afluyente como de lamas activadas.

Após a preparação do enriquecimento, procedeu-se à homogeneização, agitando-se moderadamente e de seguida colocaram-se os *erllenmeyers* em incubação a 30 °C e 120 rpm.

Esta primeira análise constitui o tempo zero dos enriquecimentos e posteriormente, ao longo de todas as semanas, num total de 11, fizeram-se sucessivas transferências do enriquecimento para meio fresco, onde se fez variar a concentração de antibiótico usado, que foi crescente e a concentração de extracto de levedura e quantidade de inóculo, que foram ambas decrescentes.

Quando a percentagem de células resistentes atingiu os 100 %, terminaram-se os enriquecimentos. Foi necessário preparar novo material e autoclavá-lo, nomeadamente *erllenmeyers*, pipetas graduadas, provetas e novas soluções de antibiótico e de meio mínimo. Os conteúdos finais, tanto de água residual afluyente, como de lamas activadas, foram transferidos para um volume de meio mínimo, dez vezes superior e a concentração de antibiótico seguiu a mesma proporção. O procedimento da preparação das novas culturas e posterior transferência do conteúdo dos *erllenmeyers* anteriores foi análogo àquele realizado no início dos enriquecimentos e efectuou-se em duplicado.

Procedeu-se à incubação das várias amostras, durante 7 dias, a 30 °C e 120 rpm, para posterior congelamento das amostras mistas finais dos enriquecimentos e ensaios de caracterização da população final. Todo o procedimento experimental que envolveu as culturas de enriquecimento realizou-se assepticamente à chama do bico de Bunsen.

9.4. Filtração através do uso da Técnica das Membranas Filtrantes

Em microbiologia existem vários métodos para enumerar/quantificar as células presentes numa amostra, seleccionados com base, na urgência de resultados, equipamento disponível e objectivo pretendido. A quantificação de bactérias totais viáveis presentes numa água residual, baseia-se no princípio de que cada célula, cujas necessidades nutricionais requerem fontes de carbono e/ou energia, independentemente do grupo taxonómico a que pertence, quando inoculada num meio de cultura nutritivo sólido e incubada a uma temperatura adequada, multiplicar-se-á dando origem a uma colónia com cerca de 10^7 - 10^8 células, sendo, portanto, visível. Assim, este método permite enumerar as células (UFC), presentes na amostra por unidade de volume. No entanto, nem todos os organismos referidos acima irão originar colónias numeráveis, uma vez que, os nutrientes disponíveis no meio e a temperatura de incubação usados podem não ser adequados ao bom desenvolvimento de alguns tipos de organismos, ocorrendo por vezes o favorecimento do crescimento de uns face a outros.

A filtração de um volume adequado da água a analisar, envolve a remoção de células de microrganismos de soluções líquidas ou de gases através da passagem por membranas filtrantes, onde as células ficarão retidas. Estas podem ser de vários materiais (mais vulgarmente, acetato de celulose ou de policarbonato) e têm diâmetros de poro muito pequenos (usualmente 0,2 a 0,45 µm) onde as células microbianas ficam retidas.

Esta técnica é muito utilizada em laboratórios de microbiologia para esterilizar meios de cultura com componentes que possam sofrer alteração por acção do calor, na indústria farmacêutica, etc. Contudo, a maior parte dos vírus são suficientemente pequenos para atravessarem os poros destas membranas filtrantes, pelo que esta técnica não assegura a esterilidade total das soluções ou gases filtrados [46].

9.4.1. Filtração através do uso da Técnica das Membranas Filtrantes para a Enumeração da População Microbiana Total e Resistente

Para além de ser utilizada para esterilizar soluções, a filtração, sobre vácuo, através do uso da técnica das membranas filtrantes pode também ser utilizada para concentrar células microbianas a partir de volumes grandes de amostras líquidas, como acontece na análise bacteriológica de águas.

Após a filtração de um determinado volume conhecido de amostra através da técnica de membranas filtrantes, cujos poros são suficientemente pequenos, 0,45 µm, para reterem a superfície do filtro, as bactérias indicadoras a enumerar.

Assim, com o objectivo de proceder à enumeração da população microbiana total e resistente inicial e ao longo dos vários enriquecimentos, foi realizada uma selecção do material a utilizar, funis, pipetas graduadas de 1 mL, membranas de 0,45 µm, etc., preparação do meio nutritivo, PCA com e sem o antibiótico, de soluções de salina a 0,85 % e uma posterior esterilização das mesmas e de todo o material a utilizar que precisa de ser utilizado em condições assépticas.

Previamente as caixas de Petri estéreis foram preenchidas com o meio de cultura nutritivo, PCA e PCA com antibiótico, a uma concentração de 4 mg/L e identificadas, bem como os tubos de salina a utilizar. Como a água residual afluyente, efluyente final e lamas activadas a analisar estão relativamente contaminadas, foram realizadas diluições decimais em 9 mL de solução salina estéril a 0,85 % (meio próprio, capaz de manter mais ou menos estável a população microbiana presente na amostra).

Tabela 11 - Diluições e filtrações para a enumeração da população microbiana h total e resistente directamente das amostras recolhidas da água residual afluyente, efluente final e lamas activadas em meio PCA e em meio PCA com ciprofloxacina a uma concentração de 4 mg/L

Diluições e filtrações para a enumeração da população microbiana total e resistente inicial	Água residual afluyente	Meio PCA	-2, -3, -4 e -5
	Água residual afluyente	Meio PCA com ciprofloxacina a uma concentração de 4 mg/L	-1, -2, -3, -4 e -5
	Efluente final	Meio PCA	-1, -2, -3 e -4
	Efluente final	Meio PCA com ciprofloxacina a uma concentração de 4 mg/L	Directamente do frasco, -1, -2, -3 e -4
	Lamas activadas	Meio PCA	-3, -4, -5 e -6
	Lamas activadas	Meio PCA com ciprofloxacina a uma concentração de 4 mg/L	-2, -3, -4, -5 e -6

Tabela 12 – Datas das culturas de enriquecimento de água residual afluyente e lamas activadas e respectivas diluições e filtrações em meio PCA e em meio PCA com ciprofloxacina a uma concentração de 4 mg/L

Datas das culturas de enriquecimento de água residual afluyente e lamas activadas (em duplicado)	Diluições				Filtrações			
	Água residual afluyente		Lamas activadas		Água residual afluyente		Lamas activadas	
	Meio PCA	Meio PCA com ciprofloxacina a uma concentração de 4 mg/L	Meio PCA	Meio PCA com ciprofloxacina a uma concentração de 4 mg/L	Meio PCA	Meio PCA com ciprofloxacina a uma concentração de 4 mg/L	Meio PCA	Meio PCA com ciprofloxacina a uma concentração de 4 mg/L
11/03	Até -7	Até -7	-	-	-4, -5, -6 e -7	-3, -4, -5 e -6	-	-
18/03	Até -6	Até -6	Até -9	Até -9	-1, -2, -3, -4, -5 e -6	-1, -2, -3, -4, -5 e -6	-4, -5, -6, -7, -8 e -9	-4, -5, -6, -7, -8 e -9
25/03	Até -6	Até -6	Até -7	Até -7	-3, -4, -5 e -6	-3, -4, -5 e -6	-3, -4, -5, -6 e -7	-3, -4, -5, -6 e -7
01/04	Até -6	Até -6	Até -7	Até -7	-3, -4, -5 e -6	-3, -4, -5 e -6	-3, -4, -5, -6 e -7	-3, -4, -5, -6 e -7
08/04	Até -6	Até -6	Até -7	Até -7	-3, -4, -5 e -6	-3, -4, -5 e -6	-3, -4, -5, -6 e -7	-3, -4, -5, -6 e -7
15/04	Até -5	Até -5	Até -6	Até -6	-2, -3, -4 e -5	-2, -3, -4 e -5	-2, -3, -4, -5 e -6	-2, -3, -4, -5 e -6
22/04	Até -7	Até -7	Até -7	Até -7	-3, -4, -5, -6 e -7	-3, -4, -5, -6 e -7	-3, -4, -5, -6 e -7	-3, -4, -5, -6 e -7
29/04	Até -6	Até -6	Até -6	Até -6	-4, -5 e -6	-4, -5 e -6	-4, -5 e -6	-4, -5 e -6
06/05	Até -6	Até -6	Até -6	Até -6	-4, -5 e -6	-4, -5 e -6	-4, -5 e -6	-4, -5 e -6
13/05	Até -4	Até -4	Até -4	Até -4	-2, -3 e -4	-2, -3 e -4	-2, -3 e -4	-2, -3 e -4

Na preparação das soluções de salina estéreis a 0,85 %, pesou-se para um frasco Schott de 1 L, 0,85 g de cloreto de cálcio, posteriormente adicionou-se ao frasco 1 L de água destilada, agitou-se o conteúdo e com a ajuda de uma pipeta graduada de 10 mL, transferiram-se 9 mL da solução preparada, para diversos tubos de ensaio, consoante o número de diluições necessárias para o ensaio. Os tubos eram rolhados e colocados, em autoclave, a 121 °C e 1,2 bar, durante 15 min. Após o tempo da esterilização, deixava arrefecerem-se os tubos e estes eram posteriormente colocados a 4 °C até se efectuar o ensaio.

O número de diluições realizadas, relativamente às amostras de água residual afluyente, efluente final e lamas activadas da estação de tratamento de águas residuais, foi previamente estimado, de modo a obter placas contendo 20-80 UFC.

Para se proceder à amostragem e posterior enumeração da população microbiana total e resistente, inicial e ao longo dos vários enriquecimentos, foi necessário, tal como referido anteriormente, proceder-se à recolha destas e para isso, os frascos Schott, de colheita da água residual afluyente, efluente final e lamas activadas foram previamente esterilizados, em autoclave, a 121 °C e 1,2 bar, durante 15 min.

De seguida, preparou-se, sobre a bancada de análise, todo o material necessário à amostragem. Com uma pinça de extremidades planas, previamente flamejada em álcool, passada pela chama do bico de Bunsen e arrefecida, colocou-se a membrana esterilizada (com 0,45 µm de poro, onde ficarão retidas células de possíveis bactérias contaminantes), com a grelha voltada para cima, sobre o disco poroso do funil, previamente esterilizado, fixo à base da rampa de filtração.

Posteriormente, colocou-se, assepticamente, no funil, uma pequena quantidade de solução salina estéril a 0,85 %, com vista a diluir a amostra, uma vez que esta apresenta uma osmolaridade equivalente à das células, prevenindo a sua lise ou plasmólise. De seguida, a este conjunto adicionou-se, no caso da enumeração da população microbiana total e resistente inicial, o volume de 1 mL, não diluído, retirado directamente dos frascos das várias amostras recolhidas. No caso da enumeração da população microbiana total e resistente ao longo dos vários enriquecimentos, usou-se 1 mL de cada uma das amostras diluídas, em solução salina estéril a 0,85 %, com a ajuda de pipetas graduadas de 1 mL, estéreis, dando-se início à filtração sobre vácuo, este volume de 1 mL, diluído, foi retirado directamente dos *erlenmeyers* das várias culturas de enriquecimento. Para filtrar diferentes quantidades de uma mesma amostra, o funil utilizado na filtração pode ser usado sucessivamente, da amostra mais diluída para a mais concentrada, sem ser esterilizado. No entanto, para filtrar amostras diferentes, o equipamento de filtração deve ser substituído por outro também devidamente esterilizado.

Após a filtração, sobre vácuo, através da membrana filtrante, desligou-se a válvula de vácuo da rampa de filtração, impedindo a entrada de ar contaminado e retirada asséptica a membrana, transportando-a com o auxílio

da pinça esterilizada, já utilizada anteriormente. Colocou-se a membrana sobre o meio de cultura selectivo gelificado, com a parte superior voltada para cima, evitando a formação de bolhas de ar entre a membrana e o meio, para a detecção do grupo específico de microrganismos. Posteriormente, colocou-se o meio de cultura, que se encontra numa caixa de Petri, a incubar invertidamente, a temperatura adequada ao desenvolvimento dos microrganismos que se pretendiam estudar. No caso em estudo, as caixas de Petri foram colocadas a incubar a 30 °C, para que as bactérias presentes se desenvolvessem (formando colónias à superfície do meio). Todo o procedimento descrito foi realizado em ambiente asséptico, à chama directa do bico de Bunsen. Por último, após 24 e 48 horas observam-se e contam-se, a olho nu, as UFC formadas sobre a membrana entre 20 e 80, provenientes da fracção de amostra filtrada, determinando assim, o número de microrganismos totais e resistentes por mL de amostra. O cálculo da percentagem de células resistentes fez-se através da equação:

$$\frac{\text{Número de células cultiváveis totais resistentes à ciprofloxacina}}{\text{Número de células cultiváveis totais}} \times 100\%$$

O sistema de filtração e o restante material de plástico e vidro, frascos de recolha Schott, pipetas graduadas de 1mL, tubos de solução salina, solução salina, tal como referido anteriormente, foram esterilizados, por acção do calor húmido (agente esterilizante) e por meio de agentes físicos, em autoclave, a 121 °C e 1,2 bar, durante 15 min. A acção esterilizadora do vapor saturado sobre pressão provocará assim a desnaturação das proteínas bacterianas e a destabilização da membrana citoplasmática das mesmas, originando posteriormente, a sua morte.

Por outro lado, tal como referido anteriormente, procedeu-se à esterilização de pipetas graduadas de 1 mL, devidamente colocadas em caixas metálicas furadas e fechadas, recorrendo a acção de calor seco, em estufa a 180 °C, durante cerca de duas horas, sendo o tempo de esterilização contabilizado, a partir do instante em que o termómetro atingia a temperatura escolhida. Deste modo, foi possível destruir a população bacteriana presente, originando a sua oxidação celular, perante a acção do agente esterilizante (calor seco). As membranas filtrantes vêm esterilizadas de origem. Todo o procedimento foi realizado em duplicado para cada uma das amostras, de água residual afluyente, efluente final e de lamas activadas.

O meio nutritivo PCA, um dos meios sólidos gerais mais comuns de cultivo de microrganismos, recomendado para a contagem dos mesmos em placas, foi preparado de acordo com o método, descrito no verso da embalagem do mesmo, tal como referido anteriormente. Como se prepararam dois tipos de meios nutritivos PCA, um com e outro sem antibiótico, ao primeiro foi necessário adicionar uma quantidade calculada de antibiótico, a 4 mg/L que foi previamente preparado, tal como referido anteriormente, a uma concentração de 1 g/L. A adição do antibiótico realizou-se em ambiente

asséptico e apenas foi feita quando o meio nutritivo PCA se encontrava ainda líquido, mas a baixa temperatura. Tal como foi referido anteriormente, preparou-se previamente uma solução do antibiótico usado a 1 g/L. Como o antibiótico é um pó branco, pesou-se uma quantidade calculada deste, que foi diluída em água destilada e posteriormente a solução foi filtrada e esterilizada usando um filtro de nitrato de celulose com poros de 0,2 μm [13, 25, 46, 52, 53].



Figura 7 - Material corrente de laboratório usado para a aplicação da técnica de membranas filtrantes



Figura 8 - Modo de incorporação da membrana filtrante na caixa de Petri que contém o meio sólido



Figura 9 – Imagens de caixas de Petri que contém o meio sólido, com a membrana incorporada. À esquerda após 24 horas de incubação a $T= 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ e à direita após 48 horas de incubação a $T= 30\text{ }^{\circ}\text{C}$

9.5. Extracção de Heterotróficos para a Caracterização Inicial e Final da População Bacteriana Cultivável na Presença e Ausência de Antibiótico

Para se proceder à caracterização inicial e final da população bacteriana cultivável, na presença e ausência de antibiótico foi necessário, previamente, fazer-se a enumeração da população microbiana total e resistente inicial e final.

Após se terem efectuado para o tempo inicial e final a enumeração da população microbiana total e resistente, ao fim de 48 horas, as diversas placas de Petri contáveis obtidas foram guardadas a 4 °C. Após algum, tempo, ao conteúdo de cada uma das placas de Petri, adicionou-se 1 mL de solução salina estéril a 0,85 %, ressuspenderam-se as células com um espalhador e com a ajuda de uma micropipeta e uma ponta estéril transferiu-se todo o líquido, para uma segunda placa, uma vez que a enumeração foi sempre efectuada em duplicado. A esta segunda placa, adicionou-se cerca de 500 µL de solução salina estéril a 0,85 %, ressuspenderam-se novamente as células e com um espalhador e uma micropipeta e uma ponta estéril, transferiu-se todo o líquido para um tubo *Eppendorf* estéril. Centrifugou-se a 14.000 rpm (rotações por minuto), o conteúdo do tubo *Eppendorf* durante 5 min, rejeitou-se o sobrenadante e adicionou-se 1 mL de solução salina estéril a 0,85 % e repetiu-se este procedimento mais duas vezes. O conteúdo que permaneceu no tubo *Eppendorf*, o *pellet*, foi armazenado a -20 °C. Este procedimento efectuou-se para as várias amostras, ou seja, no caso da caracterização inicial, da população bacteriana cultivável, as diversas amostras cultiváveis, nas placas de Petri foram de água residual afluyente, efluente final e lamas activadas. No caso da caracterização final da população bacteriana cultivável no fim dos enriquecimentos, as diversas amostras cultiváveis nas placas de Petri foram de água residual afluyente e lamas activadas, uma vez que as culturas de enriquecimento apenas de efectuaram para estas amostras.

9.6. Congelamento das Culturas Mistas Finais dos Enriquecimentos

Para o congelamento das culturas mistas finais dos enriquecimentos de água residual afluyente e lamas activadas preparou-se um meio de congelamento. Este meio a 15 % (v/v) era constituído por meio mínimo a 2X e glicerol a 30 % (v/v). Para a sua preparação, a um frasco Schott, adicionou-se 10 mL de água destilada e a um eurotubo adicionou-se 3 mL de glicerol que se diluíram em 7 mL de água destilada, tanto o eurotubo, como a frasco Schott foram colocados, em autoclave, a 121 °C e 1,2 bar, durante 15 min. Após o arrefecimento, ao frasco Schott, adicionou-se 400 µL de tampão fosfato, 120 µL de macronutrientes, 20 µL de micronutrientes e 20 µL de CaCl₂, obtendo-se o meio mínimo a 2X. De seguida, adicionou-se a solução de glicerol a 30 % à de

meio mínimo, obtendo-se uma solução final de congelamento a 15 %. Todo este procedimento efectuou-se em ambiente asséptico à chama do bico de Bunsen.

Quando a percentagem de células resistentes atingiu os 100 %, haviam-se terminado os enriquecimentos. Os conteúdos finais, tanto de água residual afluyente, como de lamas activadas, em duplicado, foram transferidos para um volume de meio mínimo dez vezes superior e a concentração de antibiótico seguiu a mesma proporção. Procedeu-se à incubação das várias amostras, durante 7 dias, a 30 °C e 120 rpm.

Ao fim dos sete dias de incubação, filtraram-se as várias amostras dos enriquecimentos e o conteúdo retido nos filtros foi devidamente acondicionado e colocado num tubo *Eppendorf* estéril. A cada um dos tubos *Eppendorf*, que continham os filtros adicionou-se 1 mL de solução de congelamento de glicerol a 15 %, previamente preparada. As amostras foram identificadas e colocadas a -80 °C. Todo este procedimento efectuou-se em ambiente asséptico à chama do bico de Bunsen.

9.7. Biologia Molecular

A biologia molecular é o estudo da biologia a nível molecular, com especial atenção no estudo da estrutura e função do material genético e seus produtos, as proteínas. Mais concretamente, a biologia molecular investiga as interacções entre os diversos sistemas celulares, incluindo a relação entre DNA, RNA e síntese proteica. Abrange um campo de estudo alargado também a outras áreas da biologia e da química, em especial genética e bioquímica. A biologia molecular ocupa então um espaço próprio, mas relacionando conhecimentos dos dois campos, tanto genético como bioquímico, ao investigar os mecanismos de replicação, transcrição e tradução do material genético. Muita da investigação em biologia molecular é quantitativa [25].

9.7.1. Técnicas em Biologia Molecular

Muito do trabalho feito no âmbito da biologia molecular relaciona-se com a obtenção, identificação e caracterização de genes. A evolução desta, nas últimas décadas, propiciou avanços nos estudos da microbiologia ambiental e da ecologia do solo. A ecologia microbiana molecular é baseada na compreensão das relações entre microrganismos e suas interacções com o ambiente, através da análise de moléculas representativas de organismos ou de processos por eles desencadeados. Estas podem ser proteínas, enzimas ou ácidos nucleicos, como RNA e DNA. A extracção de DNA de amostras ambientais, com posterior amplificação e análise do material genético, tem sido uma alternativa ou complemento ao clássico método de cultivo e análises fisiológicas de microrganismos.

Técnicas de análise do DNA podem gerar perfis moleculares, *molecular fingerprinting*, como a electroforese em gel com gradiente desnaturante ou DGGE, que possibilita a análise de várias amostras ambientais simultaneamente, sendo bastante úteis na monitorização e compreensão de variações temporais e espaciais de comunidades microbianas, esta técnica visa determinar as espécies microbiológicas presentes nas amostras em estudo e é uma técnica que envolve vários procedimentos prévios, tais como a filtração das amostras, a extracção do DNA, amplificação do fragmento de DNA obtido pela técnica da reacção em cadeia de polimerase e depois da aplicação da técnica de DGGE, a purificação das bandas obtidas que irão ser sequenciadas. Assim sendo, diversas técnicas têm sido desenvolvidas [25, 60].

9.7.2. Filtração das Amostras para a Caracterização Inicial e Final da População Bacteriana Total

Para a caracterização inicial, da população bacteriana total, procedeu-se à filtração, sobre vácuo, das amostras de água residual afluyente (30 mL), efluente final (100 mL), em triplicado, cuja colheita foi feita a 11 de Março de 2008, para as amostras cuja colheita foi feita a 21 de Abril, filtraram-se os mesmos volumes, por membranas de policarbonato com poros de 0,2 µm, que são capazes de reter a totalidade de microrganismos existentes, impedindo, assim, a sua passagem e perda. Terminada a etapa de filtração e antes de se proceder à etapa de extracção do DNA total das várias amostras, as membranas foram colocadas em caixas de Petri estéreis devidamente identificadas, seladas com parafilme e armazenadas a -20 °C.

Relativamente às amostras de lamas activadas, transferiu-se, directamente do frasco de colheita, para tubos *Eppendorf* estéreis, em triplicado, 1 mL de amostra, que se centrifugou a 14.000 rpm, durante 10 min, de seguida, lavou-se o *pellet*, que é a camada que se forma com os sólidos, com solução salina estéril a 0,85 %, por duas vezes, ressuspendeu-se o conteúdo e fez-se o aproveitamento do *pellet*, rejeitando-se o sobrenadante. Os diversos tubos *Eppendorf* foram devidamente identificados, selados com parafilme e armazenados a -20 °C. Todo o material corrente de laboratório que se usou teve que estar estéril e todo o procedimento foi efectuado à chama do bico de Bunsen [6, 19].

Para a caracterização final, da população bacteriana total, quando a percentagem de células resistentes atingiu os 100 %, haviam-se terminado os enriquecimentos. Os conteúdos finais, tanto de água residual afluyente, como de lamas activadas, em duplicado, foram transferidos para um volume de meio mínimo dez vezes superior e a concentração de antibiótico seguiu a mesma proporção. Procedeu-se à incubação das várias amostras finais dos enriquecimentos, durante 7 dias, a 30 °C e 120 rpm. Ao fim dos sete dias de incubação, a filtração e armazenamento das amostras foi análogo ao anteriormente referido, mas todo o conteúdo, cerca de 200 mL, correspondente

às várias amostras de água residual afluyente e lamas activadas, em duplicado, foi filtrado.

9.7.3. Extração do DNA

O ácido desoxirribonucléico (ADN ou mais, por convenção, DNA) é um composto orgânico cujas moléculas contêm as instruções genéticas que coordenam o desenvolvimento e funcionamento de todos os seres vivos e alguns vírus. A sua principal função é armazenar as informações necessárias para a construção das proteínas e ARNs ou RNAs. Os segmentos de DNA que são responsáveis por transportar a informação genética são denominados genes. A restante sequência tem importância estrutural ou está envolvida na regulação do uso da informação genética.

Do ponto de vista químico, o DNA é um longo polímero de unidades simples (monómeros) de nucleótidos, cujo cerne é formado por açúcares e fosfato intercalados, unidos por ligações fosfodiéster. Ligadas à molécula de açúcar está uma de quatro bases nitrogenadas e é a sequência dessas bases ao longo da molécula de DNA que transporta a informação genética. A leitura destas sequências é feita através do código genético, o qual especifica a sequência linear dos aminoácidos das proteínas. A tradução é feita por um RNA mensageiro, que copia parte da cadeia de DNA, por um processo chamado transcrição e posteriormente a informação contida neste é "traduzida" em proteínas pela tradução. Embora a maioria do RNA produzido seja usado na síntese de proteínas, algum deste tem função estrutural, como por exemplo o RNA ribossómico, que faz parte da constituição dos ribossomas.

Dentro da célula, o DNA é organizado numa estrutura chamada cromossoma e o conjunto destes, forma o cariótipo. Antes da divisão celular, os cromossomas são duplicados através de um processo chamado replicação. Eucariontes, como animais, plantas e fungos têm o seu DNA dentro do núcleo enquanto, procariontes, como as bactérias têm-no disperso no citoplasma. O DNA é responsável pela transmissão das características hereditárias de cada espécie de ser vivo.

Ligadas à molécula de açúcar, tal como referido anteriormente, estão as quatro bases nitrogenadas, estas são classificadas em dois tipos; a adenina e guanina, que são compostos heterocíclicos chamados purinas, enquanto a citosina e timina são pirimidinas. Uma quinta base (uma pirimidina) chamada uracilo (U) aparece no RNA e substitui a timina. Cada tipo de base, numa fita, forma uma ligação com apenas um tipo de base na outra fita. Este comportamento é designado de complementaridade de bases. Assim, as purinas formam pontes de hidrogénio com pirimidinas. A liga-se a T e C a G.

O procedimento de extração do DNA total das amostras filtradas e do DNA da população heterotrófica é imprescindível à análise genética de populações microbianas e visa atingir a fragmentação dos tecidos celulares, removendo o DNA do interior das células, com o maior índice de pureza

possível, isto é, com o menor número possível de quaisquer resíduos provenientes da lise celular. A extracção do DNA pode ser feita de forma directa ou indirecta e existem no mercado diferentes kits de extracção do DNA, mas esta pode ser adaptada às condições do laboratório, usando o mesmo princípio dos kits.

A extracção do DNA, de todas as amostras que foram necessárias, para as posteriores caracterizações, foram conseguidas através da utilização de um método inovador e específico, o *PowerSoil™ DNA Isolation Kit*, capaz de promover o isolamento/purificação do DNA genómico, proveniente dos microrganismos presentes nas amostras de água em análise, com um elevado grau de pureza. Recorrendo a este novo procedimento, eficaz na remoção de inibidores de PCR, será possível realizar, com êxito, posteriores amplificações do DNA microbiológico, em PCR. A metodologia associada à sua realização encontra-se detalhadamente descrita no respectivo kit.

Inicialmente, procedeu-se à colocação de cada uma das membranas, armazenadas anteriormente, a -20 °C, num tubo específico, fornecido no kit.

Após a extracção de heterotróficos, para a caracterização da população bacteriana cultivável, na presença e ausência de antibiótico, o *pellet*, das várias amostras foi armazenado a -20 °C. A cada um dos diferentes *pellets*, adicionou-se 300 µL de solução salina estéril a 0,85 %, homogeneizou-se e retirou-se 150 µL da suspensão, que se adicionou ao tubo específico, fornecido no kit.

Todo o procedimento exigiu o uso de luvas de protecção e o primeiro passo foi realizado, em ambiente asséptico, à chama de um bico de Bunsen e foi necessário ter em conta, a correcta introdução das membranas no interior dos tubos fornecidos no kit, assim como a correcta homogeneização das várias suspensões de *pellets*, no líquido do interior dos tubos fornecidos no kit. Assim sendo, cada membrana foi inserida, não de uma forma aleatória, mas sim invertida, permitindo, deste modo, uma mais fácil dissolução da amostra retida na membrana no seio do conteúdo de cada tubo do kit.

O DNA obtido, 100 µL, para cada uma das amostras, foi armazenado, por um curto período de tempo, a -20 °C, com o intuito de o proteger de enzimas degradadoras do mesmo, existentes no citoplasma celular. Este é normalmente, protegido da acção destas enzimas específicas, pela membrana nuclear, mas que nesta fase já se encontra destruída, não podendo assim, desempenhar a sua função. Assim sendo, o armazenamento a baixas temperaturas, permitirá abrandar a sua acção, impedindo a realização de reacções enzimáticas, destruidoras do DNA, assim sendo o DNA não sofre desnaturação e poderá ser utilizado em aplicações posteriores [25, 31, 43].

9.7.4. Reacção em Cadeia de Polimerase (PCR)

A reacção em cadeia de polimerase, ou *PCR*, em inglês *Polymerase Chain Reaction* é uma técnica de amplificação, de grande versatilidade que

permite obter múltiplas cópias de um segmento de DNA, sem o uso de um organismo vivo. Resumidamente, o PCR permite, que uma sequência de DNA seja copiada milhões de vezes, com ou sem introduzir especificamente alterações pretendidas nessa sequência.

Esta técnica foi inventada em 1983, por Kary Mullis, sendo uma das técnicas mais comuns utilizadas em laboratórios de pesquisas médicas e biológicas para diversas tarefas. O processo de PCR foi descrito por Kary Mullis, no final da década de 1980, tendo-lhe sido posteriormente, em 1993, atribuído o Prémio Nobel da Química pelo seu trabalho. Em 1989, a Hoffman La Roche & Perkin-Elmer Corporation patenteou este processo. O método PCR é usado habitualmente nos laboratórios de investigação médica e biológica, para uma variedade de tarefas, como a introdução de locais de restrição, para induzir mutações pontuais ou para identificar um fragmento particular de DNA numa biblioteca de DNA, na detecção de doenças hereditárias, na construção de árvores filogenéticas, na clonagem de genes, testes de paternidade, exames para detecção de agentes patogénicos, etc.

O PCR encontra a sua principal aplicação em situações onde a quantidade de DNA disponível é reduzida. Em teoria, é possível amplificar qualquer DNA. O PCR é rotineiramente utilizado em procedimentos científicos de biologia molecular, como amplificação para gerar mutagénese, detecção de mutações ou preparação de fragmentos de DNA para clonagem (inserção em plasmídeo), como também pode ser utilizado para identificação de patogénicos presentes em amostras, etc.

Este método é muito sensível, em termos de análise e por isso é realizado com extremo cuidado, muitas vezes em câmaras de fluxo laminar, para evitar contaminações que possam inviabilizar o resultado. Em primeiro lugar, deve extrair-se o material genético da célula ou outro material a ser estudado, sem danificá-lo. Normalmente, o material extraído é o DNA e depois de realizada a extracção, adiciona-se uma mistura de vários componentes, nomeadamente, os dNTPs (desoxirribonucleotídeos trifosfatos), que são as bases nitrogenadas ligadas com três fosfatos, os *primers* também chamados de oligonucleotídeos (ou iniciadores) e a enzima DNA polimerase numa solução tampão. Toda esta mistura é colocada num equipamento termociclador, que faz ciclos de temperatura pré-estabelecidos com tempos exactos específicos para cada reacção (fragmento a ser amplificado).

Para a amplificação das várias amostras, por PCR, na primeira etapa do ciclo, a temperatura foi elevada até 94 °C durante 5 min, para que houvesse a separação da dupla cadeia de DNA (desnaturação inicial), posteriormente, deu-se a desnaturação propriamente dita a 92 °C, durante 30 s. Na segunda etapa, a temperatura foi reduzida para 55 °C, dependendo da quantidade das bases C e G dos *primers*, para que estes se ligassem ao molde de DNA (anelamento ou *annealing*), esta etapa teve a duração de 30 s, com o objectivo de se obterem o maior número de cópias. Na última etapa do ciclo, a temperatura foi elevada a 72 °C, durante 30 s para que houvesse ligação das bases e para que a enzima

pudesse funcionar, sintetizando a nova molécula de DNA, esta etapa é designada de extensão e em seguida um novo ciclo foi iniciado, num total de 30.

O número de ciclos de PCR deverá ser ponderado, com o objectivo de, no fim, se obter a amplificação de sequências, mas apenas as de interesse - sequências alvo, sendo, normalmente, realizados de 25 a 40 ciclos para cada reacção, na qual a taxa de replicação é exponencial 2^{ciclos} . Assim sendo, foi determinado um número de 30 ciclos de PCR, necessários à duplicação do segmento desejado, uma vez que apenas 2 segmentos pretendidos serão produzidos, sendo os restantes 60 relativos a outras cadeias longas. Após a realização de 30 ciclos de PCR, uma etapa de extensão final a 72 °C, teve início, durante 7 minutos, garantindo, assim, uma perfeita amplificação e por fim, a temperatura foi reduzida para 4 °C, para arrefecimento e refrigeração dos produtos de PCR, para que estes não sofressem perturbações perante a diferença de temperatura gerada com o exterior, uma vez que esta é mais baixa, comparativamente com as temperaturas que se praticam no interior do equipamento termociclador. Posteriormente, este foi desligado e retiraram-se as amostras.

O resultado em estudo apresenta 200 pares de bases e foi, posteriormente analisado, através da electroforese em gel de agarose. Qualquer outra banda que aparecesse além destas significa que houve amplificação de outra(s) sequência(s) além da esperada. A presença de “rastros” também não é desejável, pois poderá prejudicar a qualidade do resultado do DGGE.

A técnica de PCR, utilizada para sínteses *in vitro* de milhões de cópias de segmentos de DNA na presença da enzima DNA polimerase, é considerada uma metodologia muito sensível de análise e por isso foi realizada com o máximo cuidado para evitar contaminações que pudessem inviabilizar os resultados, tal como referido anteriormente.

Após a extracção primária do material genético (DNA), dos microrganismos existentes, para as diversas amostras foi promovida a reacção de PCR, que, tal como referido anteriormente, esta oferecerá todas as condições necessárias para a duplicação (amplificação), específica do segmento de DNA requerido, 16S rRNA. Deste modo, todas as amostras a amplificar foram previamente identificadas. Para todos os ensaios, adicionou-se uma amostra, que era designada de branco ou padrão de controlo, com o intuito de apreciar a exactidão e precisão, da técnica em questão, à qual não se adicionou DNA, mas sim água ultra pura estéril (filtrada e autoclavada duas vezes).

Para um volume de reacção de 50 µL, foi adicionado 1 µL de uma mistura composta pelos quatro dNTPs (desoxirribonucleotídeos trifosfatos), que constituem a cadeia de DNA (dCTP, dATP, dGTP e dTTP), a 10 mM, 2,5 µL de DMSO (dimetilsulfóxido), puro, útil para a futura estabilização e acção da enzima Taq polimerase e dinamizador do fenómeno de desnaturação das

cadeias de DNA, 30,5 µL de água ultra pura estéril (filtrada e autoclavada duas vezes), 6 µL de solução de cloreto de magnésio (MgCl₂), a 25 mM, útil para o aumento da expressão genética, ou seja, favorece a reacção enzimática, 2,5 µL de 10×PCR *Buffer* + KCl e 2,5 µL de 10×PCR *Buffer* + (NH₄)₂SO₄, ambas soluções tampão, adicionadas com o intuito de fornecer óptimas condições de pH e salinidade, para que a síntese se processe, conferindo, assim, um meio propício à actuação da enzima Taq Polimerase.

Foram igualmente adicionados, posteriormente, os oligonucleotídeos/iniciadores que servirão de *primers* ao longo da reacção e sendo assim, adicionaram-se 1,5 µL de *primer 338 forward-GC (clamp de GC)* (5' CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAC TCC TAC GGG AGG CAGCAG 3'), a 10 µM, que determinará o início do segmento de DNA a copiar e 1,5 µL de *primer 518 reverse* (5' ATT ACC GCG GCT GCT GG '3), a 10µM, que determinará o fim do segmento de DNA a copiar.

Por fim, adicionou-se 1 µL de enzima DNA Polimerase ou Taq Polimerase, a 1 unidade/µL, que foi adicionada à restante mistura reaccional, em último, devido à sua extrema sensibilidade perante variações de temperatura. Assim sendo, aquando da adição da enzima à mistura, esta foi retirada a -20 °C e adicionada de imediato, dando-se início, de seguida, à reacção PCR, após a adição de 1 µL de DNA, extraído de cada amostra. Deve observar-se que, com excepção do dimetilsulfóxido puro, todos os reagentes devem permanecer a -20 °C. Todo este procedimento foi efectuado em gelo, para que a reacção PCR apenas tivesse início, no momento em que as amostras eram colocadas no equipamento termociclador. Após de terem adicionado todos os componentes, as amostras foram colocadas na máquina de PCR, equipamento termociclador, capaz de promover a ocorrência dos ciclos de temperatura pré-estabelecidos, dando-se início ao programa seleccionado.

Em alguns casos e dependendo da finalidade do produto da reacção, não se justificou a utilização de amostras com um volume de reacção de 50 µL e nesse caso, o volume de reacção usado foi de 25 µL e por essa razão, o volume dos vários componentes usados na obtenção de produtos de PCR foi reduzido para metade, poupando-se assim, reagentes. É importante salientar, que todo o material utilizado deverá ser previamente esterilizado, em autoclave, a 121 °C e 1,2 bar, durante 15 min e devem utilizar-se luvas limpas durante todo o trabalho experimental [6, 10, 16, 19, 23, 32, 33, 43].

Desnaturação inicial a 94°C/5 min				
1X	Desnaturação a 92°C/30 s			
			Extensão a 72 °C/30s	Extensão final a 72 °C/7min
		Annealing a 55 °C/30s		1X
		30 X		Refrigeração a 4 °C/∞

Figura 10 - Representação gráfica da evolução da temperatura e identificação das várias fases no decorrer dos diversos ciclos de PCR



Figura 11 - Equipamento termociclador, responsável pela ocorrência dos vários ciclos e produtos de PCR

9.7.5. Electroforese em Gel de Agarose

A electroforese em gel é uma das principais ferramentas de trabalho em biologia molecular, sendo uma técnica de separação de moléculas, que envolve a migração de partículas. Em geral, DNA, RNA e proteínas podem ser separados, segundo o seu tamanho numa matriz usando um campo eléctrico aplicado ou uma diferença de potencial. Na electroforese em gel de agarose, o DNA ou o RNA é separado fazendo a amostra migrar através de um gel. As moléculas são separadas, de acordo com o seu tamanho, pois as de menor massa irão migrar mais rapidamente que as de maior massa. Em alguns casos,

o formato das moléculas também é determinante, pois algumas terão maior facilidade para migrar pelo gel.

A agarose é um polissacarídeo e forma uma rede, que prende as moléculas durante a sua migração. Dependendo da concentração de agarose, tem-se uma diferença no gradiente de separação.

Como a electroforese em gel é frequentemente utilizada para separar e estimar o tamanho (peso molecular), de fragmentos de ácidos nucléicos de uma amostra a analisar, por comparação da distância percorrida pelos mesmos, com a percorrida por fragmentos de peso molecular conhecido (padrões de peso molecular) e como permite a separação dos ácidos nucléicos, numa matriz porosa, sobre a acção de um campo eléctrico (permanecendo a temperatura do gel constante ao longo da corrida do mesmo), esta técnica foi utilizada com o intuito de avaliar a qualidade de extracção do DNA total das várias amostras filtradas e do DNA da população heterotrófica e também a existência de produtos de PCR, realizados anteriormente, de todas as amostras obtidas. A matriz na qual os ácidos nucléicos devem ser separados depende, essencialmente, do tamanho dos fragmentos a separar, mas também do destino final a dar a esses mesmos fragmentos, uma vez separados.

Assim sendo, neste procedimento experimental foi utilizada como matriz porosa, o gel de agarose, uma vez que, relativamente a outros géis possui a vantagem de constituir uma matriz não tóxica, permitindo uma boa resolução para fragmentos relativamente grandes (quando utilizada a baixas concentrações entre 0,2 e 8 %) e é também de fácil preparação.

Tal como referido anteriormente, quando sujeitos a um campo eléctrico, os ácidos nucléicos migram em direcção ao pólo positivo, uma vez que apresentam carga negativa (devido ao grupo fosfato), a pH neutro. A agarose funcionará, assim, como uma rede, cujos poros deixam passar, mais facilmente, as moléculas mais pequenas, que vão portanto migrar mais do que as de maiores dimensões.

Inicialmente, procedeu-se à preparação do gel de agarose a 1 %. Para tal, foi solubilizado, por aquecimento a 275 °C e agitado, 1,45 g de agarose em pó, em 145 mL de solução tampão TAE (Tris-Acetic-Acid EDTA Buffer (1X)), uma vez que se pretendia utilizar um *tray* (molde), rectangular, de 15 por 20 cm. Após um ligeiro arrefecimento da solução, esta foi vertida, lentamente, no *tray*, evitando a formação de bolhas de ar e este por sua vez foi acondicionado num suporte apropriado - Gel *Caster*, onde previamente foram colocados os pentes necessários (20 dentes que formarão 20 poços), deixando-se, por fim, a solução a arrefecer durante cerca de uma hora, até à sua completa solidificação e polimerização, adquirindo a forma de um gel. Posteriormente os pentes são retirados cuidadosamente, para não danificar nenhum dos poços e estando as amostras preparadas procede-se então à corrida electroforética. Posteriormente, o *tray* é colocado na tina horizontal de electroforese, ficando

totalmente submerso em solução tampão TAE (1X), que estabelece a condução eléctrica com a fonte de alimentação.

Assim, usaram-se 10 μL das várias amostras resultantes da extracção do DNA total das várias amostras filtradas e da população heterotrófica, ao longo de todo o trabalho e usaram-se 5 μL das várias amostras resultantes da reacção em cadeia de polimerase, a ambas as amostras foram adicionados 3 μL de corante de elevada densidade, azul de bromofenol (2X), utilizado como marcador e como “suporte”, conferindo peso à amostra. O marcador e as amostras foram aplicados individualmente, em cada poço, originado pelos pentes, dando-se início à separação por aplicação de um campo eléctrico de 90 V, através de 2 eléctrodos situados paralelamente à fileira de poços, durante 30 a 35 min.

No caso das várias amostras resultantes da reacção em cadeia de polimerase, foi importante adicionar um marcador ou padrão de peso molecular que nos indicou, consoante a banda formada, quantos pares de bases possuía a amostra em estudo. O marcador de peso molecular usado permitia a identificação de 100 a 5000 pares de bases.

Assim, após o fim da corrida e a migração dos ácidos nucleicos, o *tray* foi retirado da tina de electroforese e o gel cortado foi imerso numa solução de brometo de etídeo preparada em água destilada, durante um período de 15 minutos. Deste modo, foi possível, posteriormente, visualizar e fotografar, por exposição a radiação ultravioleta, num transiluminador, as bandas desenvolvidas no gel.

No caso das amostras de 10 μL , resultantes da extracção do DNA total e da população heterotrófica, a existência de banda indica que a amostra apresenta DNA. No caso das amostras de 5 μL , resultantes da reacção em cadeia de polimerase, a existência de banda indica que a amostra apresenta produtos de PCR. Após todo este procedimento experimental de electroforese em gel de agarose, todas as amostras foram armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ [6, 10, 19, 23, 25, 28, 33].



Figura 12 - Imagem representativa da aplicação das amostras em gel de agarose

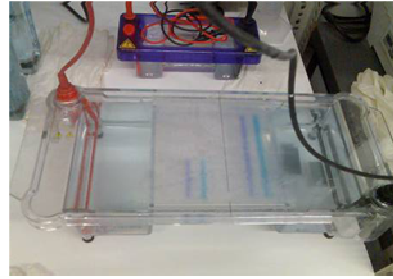


Figura 13 - Imagens da electroforese em gel de agarose. À esquerda a tina horizontal e à direita uma imagem representativa do aspecto do gel no final da electroforese em gel de agarose



Figura 14 - Imagem do transiluminador usado na visualização das bandas desenvolvidas no gel

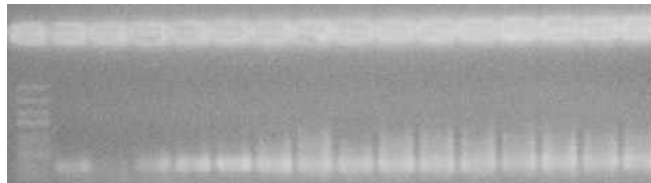


Figura 15 - Exemplo de uma imagem obtida através do transiluminador, com a visualização das bandas desenvolvidas no gel, no primeiro poço colocou-se o marcador de peso molecular, no terceiro a amostra branco e nos restantes as várias amostras a analisar

9.7.6. Electroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE)

A técnica de electroforese em gel com gradiente desnaturante ou DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) é uma ferramenta genética, fornecedora de informação taxionómica pormenorizada, sobre a composição de mistas comunidades microbianas, sendo considerada, bastante relevante, para a maioria daqueles que estudam a biotecnologia ambiental e ecologistas

microbiólogos, no que diz respeito à investigação, relativa à biodiversidade e às reacções/respostas microbiológicas, perante alterações ambientais.

É considerada como uma metodologia capaz de determinar a chave fulcral (sequência do gene 16S rRNA – *fingerprint* molecular de microrganismos), identificativa de uma específica espécie bacteriana, consegue promover uma simples separação cromatográfica dos produtos da reacção de PCR (desnaturação de diferentes sequências de DNA, representativas de muitos dos dominantes organismos microbianos), no seio de um gel (portador de um gradiente de concentrações de agentes desnaturantes), com base nas diferenças existentes, entre as suas sequências. Logo a técnica de electroforese em gel com gradiente desnaturante possibilita a separação dos produtos de PCR, de acordo com as suas sequências de pares de bases e não de acordo com os tamanhos dos fragmentos de DNA, como a maioria das técnicas de *fingerprint* genético.

Assim sendo, diferentes sequências de DNA (gene 16S rRNA), provenientes de diferentes microrganismos, desnaturarão, a diferentes concentrações do agente desnaturante (fragmentos apresentam diferentes mobilidades), originando, assim, um padrão/modelo de bandas. Assim, cada banda, teoricamente representará, uma população microbiológica ou uma espécie bacteriana distinta, presente numa comunidade e a imagem final do gel corresponderá a um padrão de “códigos de barra” referente à comunidade bacteriana das diferentes amostras estudadas. Os géis da electroforese são confeccionados com poliacrilamida (acrilamida e bis-acrilamida) e o gradiente desnaturante pode ser químico (agentes desnaturantes como ureia e formamida no DGGE), ou físico (temperatura no TGGE).

Em primeiro lugar, todo o material, vidros, espaçadores, pentes, suportes, etc. foram rigorosamente limpos com detergente e água destilada, com o intuito de remover qualquer tipo de resíduo de gel, anteriormente aplicado à técnica de DGGE. A câmara de gel foi, de seguida, montada, colocando a placa de vidro mais pequena por cima da placa de vidro maior, assegurando a existência entre elas, de dois espaçadores, de 1 mm, de plástico. Posteriormente, os adaptadores foram colocados lateralmente, de forma a manter firmemente unidos, os vidros e os espaçadores e seguidamente este conjunto foi disposto num suporte próprio.

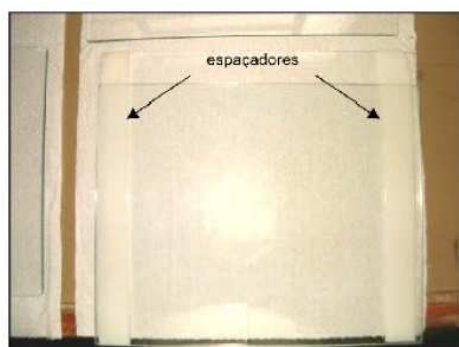


Figura 16 - Visualização das placas com os espaçadores



Figura 17 - Componentes da técnica de DGGE, dois adaptadores e dois espaçadores entre as duas placas de vidro

Após todo este procedimento, os adaptadores foram ligeiramente desapertados e o cartão de alinhamento, utilizado com o intuito de assegurar o perfeito alinhamento dos espaçadores, com a base da placa de vidro, prevenindo fugas de gel, durante a polimerização - *leakage*, foi colocado entre os dois vidros e os adaptadores foram bem apertados, de seguida, removeu-se o cartão de alinhamento. A pressão correcta do conjunto foi atingida quando foi possível puxar o cartão de alinhamento, entre as duas placas, mas com uma certa resistência.

A existência de fugas, fará com que as bandas de DNA no gel adquirão uma forma oblíqua, em vez de horizontal e por isso o passo da determinação de fugas é deveras importante. Para a verificação da presença destas, preencheu-se da câmara de gel, com água destilada e uma vez confirmada a inexistência destas, a câmara de gel foi esvaziada e as placas de vidro secas com papel de filtro.



Figura 18 - Visualização da câmara de gel com as placas de vidro. À esquerda, montagem das placas e espaçadores e encaixe no suporte e à direita, ajuste da pressão com o cartão de alinhamento

Previamente, procedeu-se à preparação de dois géis com diferentes percentagens de desnaturação, sendo a mais baixa denominada de solução *Low*, uma vez que apresenta somente 28 %, para o primeiro ensaio e 29,5 %, para os ensaios seguintes, de poder desnaturante e a segunda de solução *High*, detentora de 57 %, para o primeiro ensaio e 50 %, para os ensaios seguintes, de poder desnaturante, com o intuito de por fim, constituir o gel de DGGE.

Tabela 13 - Massas e volumes para os diferentes componentes utilizados na preparação dos géis com diferentes percentagens de desnaturação

Componente	Gel 28 % desnaturante (Low – L)	Gel 57 % desnaturante (High – H)
Ureia	1,882 g	3,830 g
TAE 50X	320 µL	320 µL
Formamida	1,792 mL	3,648 mL
40 % Acrilamida/Bis 37:5:1	3,2 mL	3,2 mL
Água destilada estéril	até 16 mL	até 16 mL
Volume total	16 mL	16 mL
Componente	Gel 29,5 % desnaturante (Low – L)	Gel 50 % desnaturante (High – H)
Ureia	1,983 g	3,360 g
TAE 50X	320 µL	320 µL
Formamida	1,888 mL	3,200 mL
40 % Acrilamida/Bis 37:5:1	3,2 mL	3,2 mL
Água destilada estéril	até 16 mL	até 16 mL
Volume total	16 mL	16 mL

A composição destas soluções foi estimada tendo por base, o facto de uma solução detentora de 100 % de poder desnaturante, possuir uma fracção de 40 % (v/v) de formamida e 7 M de ureia.

De seguida, a cada uma das soluções foram adicionados os agentes de polimerização dos géis e assim sendo, adicionaram-se 14 μL de TEMED e 140 μL de persulfato de amónia (PSA) a 10 % (m/v), que previamente era pesado e de seguida adicionava-se a quantidade de água destilada até à marca de 16 mL. Estes agentes de polimerização são capazes de iniciar, de imediato, a polimerização da acrilamida, após a sua adição. Numa fase posterior, foi possível combinar/misturar as duas soluções, mediante o uso de um gerador do gradiente do gel desnaturante, capaz de criar/gerar o gradiente (28 % - 57 %, usado no primeiro ensaio e 29,5 % - 50 % usado nos restantes ensaios), no interior da matriz de gel. Para tal, foi colocado um fino tubo de plástico, entre os dois vidros e no centro dos mesmos e depois foi adicionada, pela impulsão de uma bomba, a mistura proveniente do gerador do gradiente do gel. Após o preenchimento do espaço existente entre as duas placas de vidro (câmara de gel), o pente foi colocado cuidadosamente entre as mesmas e o gel foi deixado de um dia para o outro, a polimerizar, ou em alguns casos mais urgentes, foi deixado a polimerizar durante 60 a 90 minutos.

Após a adição dos agentes de polimerização dos géis, a preparação do gradiente de desnaturação deve ser feita rapidamente. O passo correspondente, à adição do gel de gradiente desnaturante é provavelmente um dos aspectos mais importantes e condicionantes do resultado final desta técnica, isto é, da geração de bandas bem evidenciadas. Assim, se este não for realizado de forma correcta, vários problemas poderão surgir, tais como: fugas de gel durante a polimerização do mesmo, má formação dos poços, desnaturação dos produtos de PCR amplificados no interior dos poços, originando a posterior mistura de amostras durante a corrida, imperfeita formação do gradiente, bolhas no gel, que são passíveis de serem eliminadas, etc. O gerador do gradiente desnaturante do gel consegue gerar gradientes altamente reprodutivos, em géis de acrilamida.

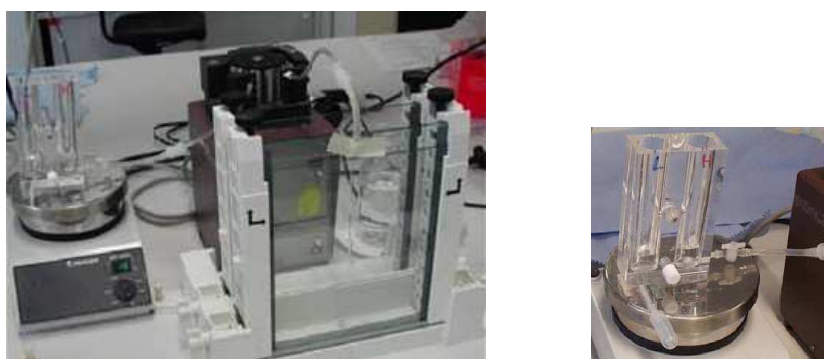


Figura 19 - Preenchimento da câmara de gel, através da utilização do gerador de gel de gradiente desnaturante



Figura 20 - Câmara de gel com o pente inserido

Posteriormente foi necessário proceder-se à preparação do tampão de corrida TAE (1X). Para o efeito, foram diluídos 140 mL de TAE (50X), já preparado, em 7 L de água destilada. Esta solução foi, posteriormente, colocada no interior da tina de solução tampão de DGGE e pré-aquecida, com o objectivo de se estabelecer o equilíbrio térmico (60 °C - temperatura constante ao longo da corrida do gel). Paralelamente a este passo, a câmara portadora do gel já polimerizado foi retirada do suporte, onde o gel polimerizou e foi anexa a outro suporte denominado de *core assembly*, mas foi essencial humedecer as borrachas brancas em U do suporte, para que os vidros ficassem bem encaixados e o sistema ficasse bem vedado e sem fugas. Este suporte foi, posteriormente, correcta e cuidadosamente colocado no interior da tina de solução tampão de DGGE, já pré-aquecida e a câmara superior foi preenchida com tampão de corrida através do botão *pump*. Porém, antes da realização deste passo, o pente foi retirado e cada poço do gel foi previamente lavado com água destilada com o auxílio de um esguicho, para remover quaisquer resíduos de acrilamida, não polimerizada e em alguns casos, como o gel polimerizado continha pedaços em excesso, foi necessário cortar alguns desses pedaços. Por vezes, era também importante ajeitar, da melhor forma possível, os diferentes poços formados, para a posterior correcta aplicação das amostras. A omissão destes passos poderia resultar na formação de desiguais patamares e bandas com má resolução.



Figura 21 - Encaixe do gel no core assembly e colocação do sistema no interior da tina de solução tampão de DGGE



Figura 22 - Câmara de gel anexada ao *core assembly*



Figura 23 - Equipamento de DGGE, composto por uma tina de solução tampão de DGGE e o suporte *core assembly*

Iniciou-se, assim, a preparação das várias amostras (produtos PCR, sujeitos a electroforese em gel de agarose), procedendo-se à sua selecção, ao seu descongelamento e posterior adição de 5 μ L de tampão de carga, (*loading buffer*), corante azul de bromofenol (2X). A cada poço do gel, originados pelos pentes, adicionava-se todo o volume do produto de PCR, das várias amostras, após se ter homogeneizado cada uma destas com os 5 μ L de tampão de carga.

No primeiro poço do gel era sempre adicionada uma amostra padrão, que permite determinar a posição de bandas e estabelecer comparação entre estas. A colocação das diversas amostras nos poços deve ser extremamente cuidadosa, para que não ocorra contaminação de amostras de um poço para outro.

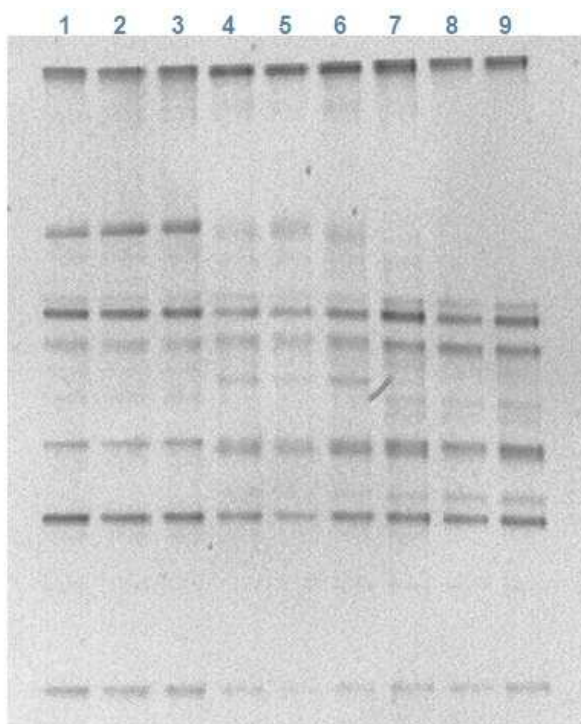
A corrida era iniciada com a separação por aplicação de um campo eléctrico de 20 V, por 15 min, seguindo-se 5 h e 30 min, segundo a aplicação de um campo eléctrico de 200 V, à temperatura constante de 60 °C. Quando a corrida termina, todos os acessórios usados foram cuidadosamente retirados e lavados com detergente e água destilada, o início do gel foi marcado, com o intuito, de se saber, à priori, o início do mesmo.

Nesta etapa final, o gel foi colocado numa tina, para a coloração do mesmo em solução de brometo de etídeo, durante 15 minutos, transferindo-se de seguida o gel para uma tina com água destilada para uma lavagem (em agitação permanente), durante 20 min. Por fim, o gel foi colocado no transiluminador, com o intuito de ser visualizado, perante luz ultravioleta e com o auxílio de uma máquina fotográfica digital, procedeu-se à aquisição da imagem.

O gradiente dos agentes desnaturantes para o primeiro gel de DGGE efectuado foi fixado em 28 e 57 %, mas como se pretendeu determinar as espécies bacterianas maioritárias, presentes em cada amostra, isso fez com que fosse induzida a redução do gradiente dos agentes desnaturantes para 29,5 e 50%, de forma a obter uma maior separação das bandas.

Para algumas amostras foram cortadas bandas, esta operação realizou-se com o intuito de se obter informação posterior, da sequência de genes, provenientes das bandas mais predominantes e teve por base o grau de individualização e intensidade de cada banda, face a outras presentes. Esta tarefa foi efectuada com alguma perícia e delicadeza, uma vez que a qualidade da sequência recolhida é extremamente variável e é largamente dependente do modo como o gel é cortado. Antes de se proceder ao corte das bandas foi necessário fazer a sua escolha, mediante um critério mais ou menos rigoroso.

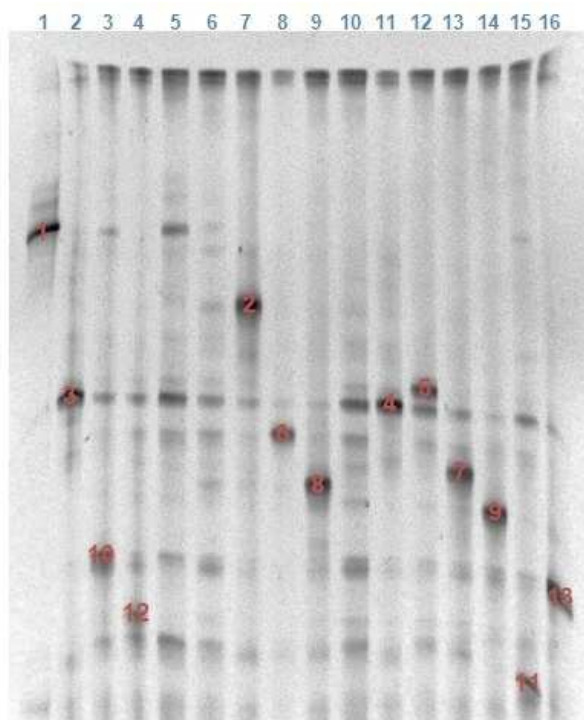
No corte das mesmas, foi somente removido, o quadrado central de cada banda, com uma lâmina estéril. Posteriormente, as bandas cortadas foram armazenadas a 4 °C, o fragmento de DNA foi eluído em 20 µL de água ultra pura estéril, antes de se proceder a nova amplificação de cada uma das bandas cortadas, através, novamente, da técnica de PCR, confirmando-se a pureza de cada produto PCR, em sucessivos géis de DGGE [2, 6, 10, 19, 21, 22, 23, 33, 43].



Legenda:

- 1 – Amostra de afluente colhida a 11 de Março
- 2 – Duplicado da amostra de afluente colhida a 11 de Março
- 3 – Triplicado da amostra de afluente colhida a 11 de Março
- 4 – Amostra de efluente colhida a 11 de Março
- 5 – Duplicado da amostra de efluente colhida a 11 de Março
- 6 – Triplicado da amostra de efluente colhida a 11 de Março
- 7 – Amostra de lamas activadas colhida a 11 de Março
- 8 – Duplicado da amostra de lamas activadas colhida a 11 de Março
- 9 – Triplicado da amostra de lamas activadas colhida a 11 de Março

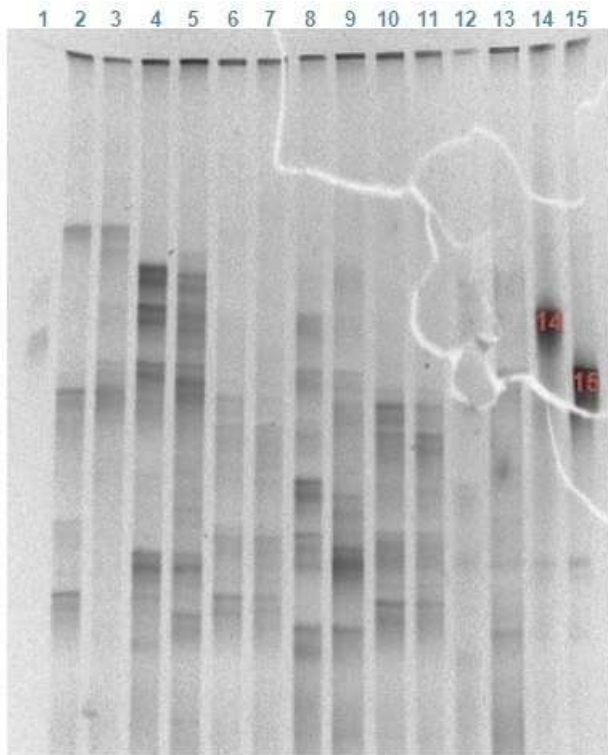
Figura 24 - Imagem do gel de DGGE com o gradiente 28 e 57 % a 8 de Abril



Legenda:

- 1 – Banda 1
- 2 – Banda 3
- 3 – Banda 10
- 4 – Banda 12
- 5 – Amostra de afluente colhida a 11 de Março
- 6 – Amostra de efluente colhida a 11 de Março
- 7 – Banda 2
- 8 – Banda 6
- 9 – Banda 8
- 10 – Amostra de lamas activadas colhida a 11 de Março
- 11 – Banda 4
- 12 – Banda 5
- 13 – Banda 7
- 14 – Banda 9
- 15 – Banda 11
- 16 – Banda 13
- 1 a 13 – Diversas bandas cortadas novamente, dado que ainda não estavam puras

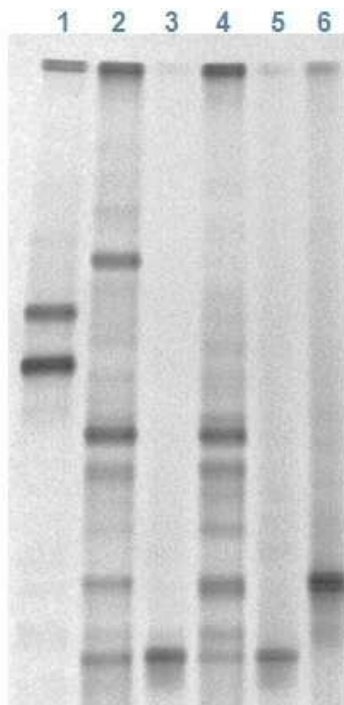
Figura 25 - Imagem do gel de DGGE com o gradiente 29,5 e 50 % a 17 de Abril



Legenda:

- 1 – Banda 1, amostra pura
- 2 – Banda 3, amostra pura
- 3 – Banda 10, amostra pura
- 4 – Banda 12
- 5 – Amostra de afluente colhida a 11 de Março
- 6 – Banda 2, amostra pura
- 7 – Banda 8, amostra pura
- 8 – Banda 6, amostra pura
- 9 – Amostra de efluente colhida a 11 de Março
- 10 – Amostra de lamas activadas colhida a 11 de Março
- 11 – Banda 4, amostra pura
- 12 – Banda 5, amostra pura
- 13 – Banda 7, amostra pura
- 14 – Banda 9, amostra pura
- 15 – Banda 11
- 16 – Banda 13
- 11 a 13 – Diversas bandas cortadas novamente, dado que ainda não estavam puras

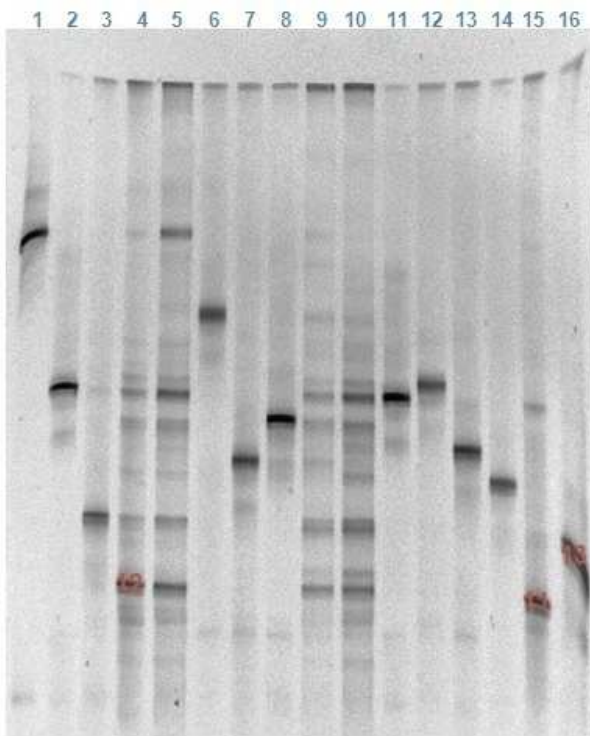
Figura 26 - Imagem do gel de DGGE com o gradiente 29,5 e 50 % a 22 de Abril



Legenda:

- 1 – Amostra padrão
- 2 – Amostra de afluente colhida a 11 de Março
- 3 – Banda 12, amostra pura
- 4 – Amostra de lamas activadas colhida a 11 de Março
- 5 – Banda 11, amostra pura
- 6 – Banda 13, amostra pura

Figura 27 - Imagem do gel de DGGE com o gradiente 29,5 e 50 % a 6 de Maio

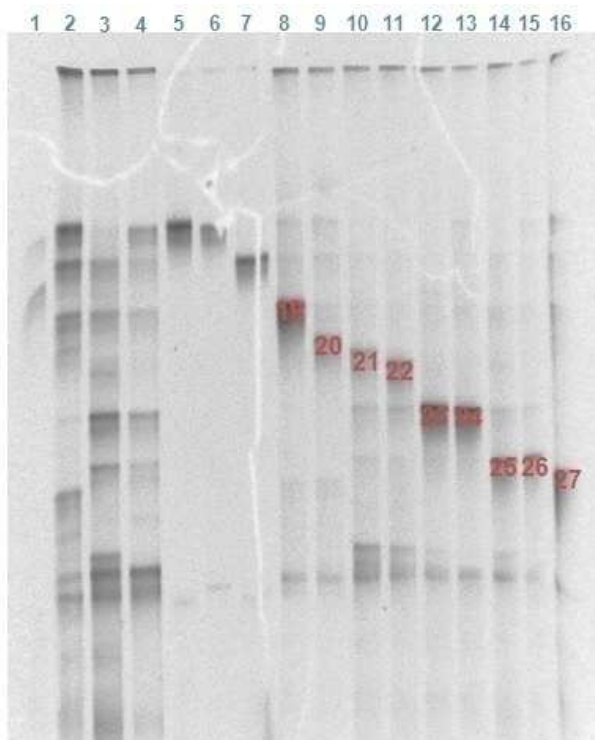


ainda não estavam puras

Legenda:

- 1 – Amostra padrão
- 2 – Amostra de afluente colhida a 11 de Março
- 3 – Amostra de afluente colhida a 21 de Abril
- 4 – Amostra de afluente cultivável em meio PCA com ciprofloxacina
- 5 – Amostra de afluente cultivável em meio PCA
- 6 – Amostra de efluente colhida a 11 de Março
- 7 – Amostra de efluente colhida a 21 de Abril
- 8 – Amostra de efluente cultivável em meio PCA com ciprofloxacina
- 9 – Amostra de efluente cultivável em meio PCA
- 10 – Amostra de lamas activadas colhida a 11 de Março
- 11 – Amostra de lamas activadas colhida a 21 de Abril
- 12 – Amostra de lamas activadas cultiváveis em meio PCA com ciprofloxacina
- 13 – Amostra de lamas activadas cultiváveis em meio PCA
- 14 – Banda 14
- 15 – Banda 15
- 14 e 15 – Bandas cortadas novamente, dado que

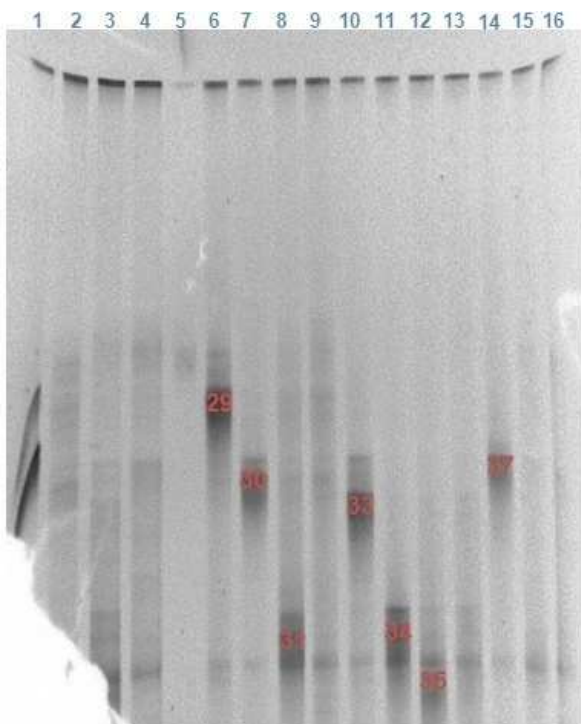
Figura 28 - Imagem do gel de DGGE com o gradiente 29,5 e 50 % a 28 de Maio



Legenda:

- 1 – Amostra padrão
- 2 – Amostra de afluente cultivável em meio PCA com ciprofloxacina
- 3 – Amostra de efluente cultivável em meio PCA com ciprofloxacina
- 4 – Amostra de lamas activadas cultiváveis em meio PCA com ciprofloxacina
- 5 – Banda 16, amostra pura
- 6 – Banda 17, amostra pura
- 7 – Banda 18, amostra pura
- 8 – Banda 19
- 9 – Banda 20
- 10 – Banda 21
- 11 – Banda 22
- 12 – Banda 23
- 13 – Banda 24
- 14 – Banda 25
- 15 – Banda 26
- 16 – Banda 27
- 19 a 27 – Diversas bandas cortadas novamente, dado que ainda não estavam puras

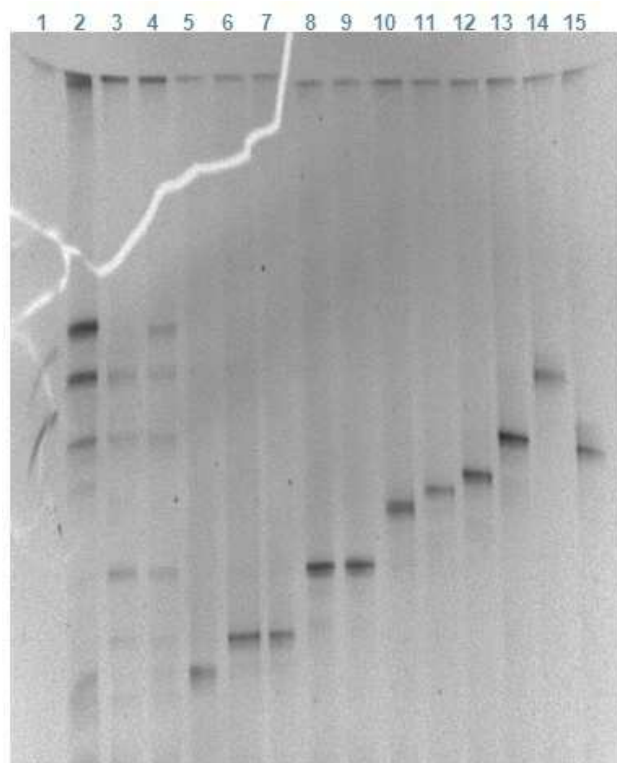
Figura 29 - Imagem do gel de DGGE com o gradiente 29,5 e 50 % a 28 de Maio



Legenda:

- 1 – Amostra padrão
- 2 – Amostra de afluente cultivável em meio PCA
- 3 – Amostra de efluente cultivável em meio PCA
- 4 – Amostra de lamas activadas cultiváveis em meio PCA
- 5 – Banda 28
- 6 – Banda 29
- 7 – Banda 30
- 8 – Banda 31
- 9 – Banda 32
- 10 – Banda 33
- 11 – Banda 34
- 12 – Banda 35
- 13 – Banda 36
- 14 – Banda 37
- 15 – Banda 38
- 16 – Banda 39
- 29, 30, 31, 33, 34, 35 e 37 – Diversas bandas cortadas novamente, dado que ainda não estavam puras

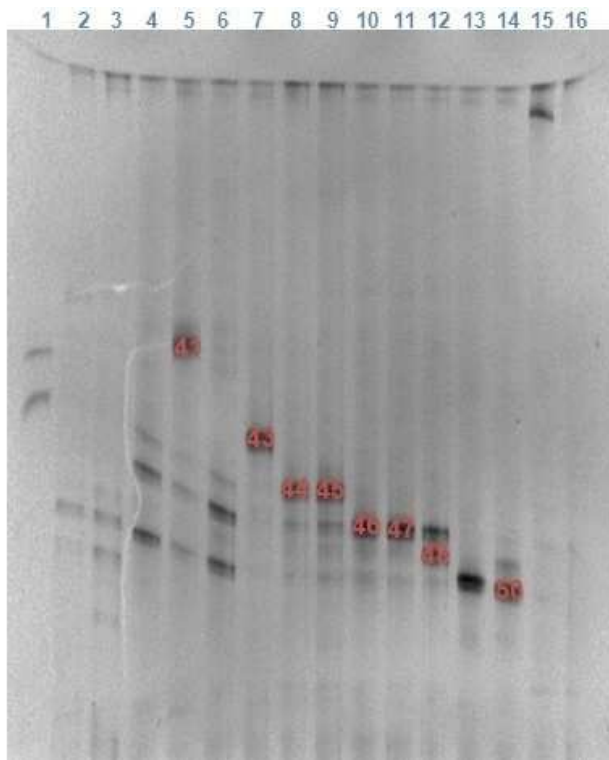
Figura 30 - Imagem do gel de DGGE com o gradiente 29,5 e 50 % a 3 de Junho



Legenda:

- 1 – Amostra padrão
- 2 – Amostra de afluente cultivável em meio PCA com ciprofloxacina
- 3 – Amostra de efluente cultivável em meio PCA com ciprofloxacina
- 4 – Amostra de lamas activadas cultiváveis em meio PCA com ciprofloxacina
- 5 – Banda 27, amostra pura
- 6 – Banda 26, amostra pura
- 7 – Banda 25, amostra pura
- 8 – Banda 24, amostra pura
- 9 – Banda 23, amostra pura
- 10 – Banda 22, amostra pura
- 11 – Banda 21, amostra pura
- 12 – Banda 20, amostra pura
- 13 – Banda 19, amostra pura
- 14 – Banda 14, amostra pura
- 15 – Banda 15, amostra pura

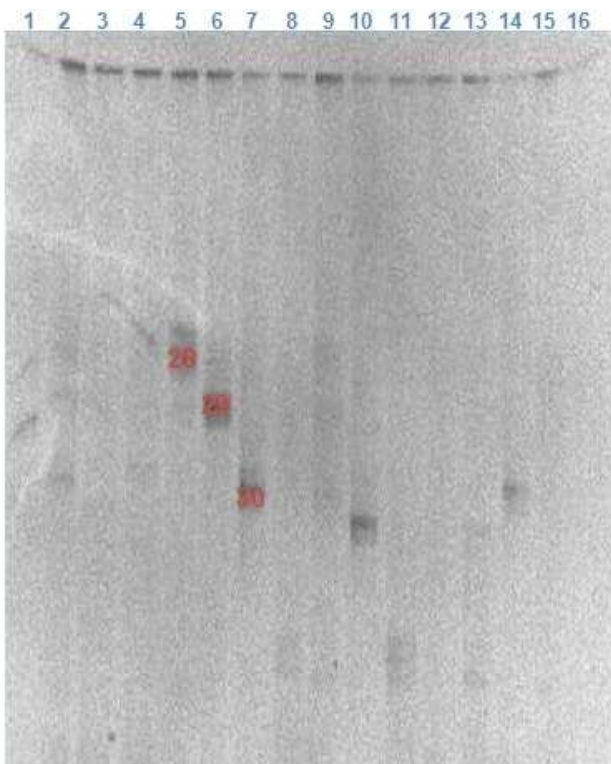
Figura 31 - Imagem do gel de DGGE com o gradiente 29,5 e 50 % a 18 de Junho



Legenda:

- 1 – Amostra padrão
- 2 – Amostra de afluente da primeira recolha feita a 11 de Março de 2008
- 3 – Amostra de lamas activadas da primeira recolha feita a 11 de Março de 2008
- 4 – Banda 40
- 5 – Banda 41
- 6 – Banda 42
- 7 – Banda 43
- 8 – Banda 44
- 9 – Banda 45
- 10 – Banda 46
- 11 – Banda 47
- 12 – Banda 48
- 13 – Banda 49, amostra pura
- 14 – Banda 50
- 15 – Banda 51
- 16 – Banda 52
- 41, 43 a 48 e 50 – Diversas bandas cortadas novamente, dado que ainda não estavam puras

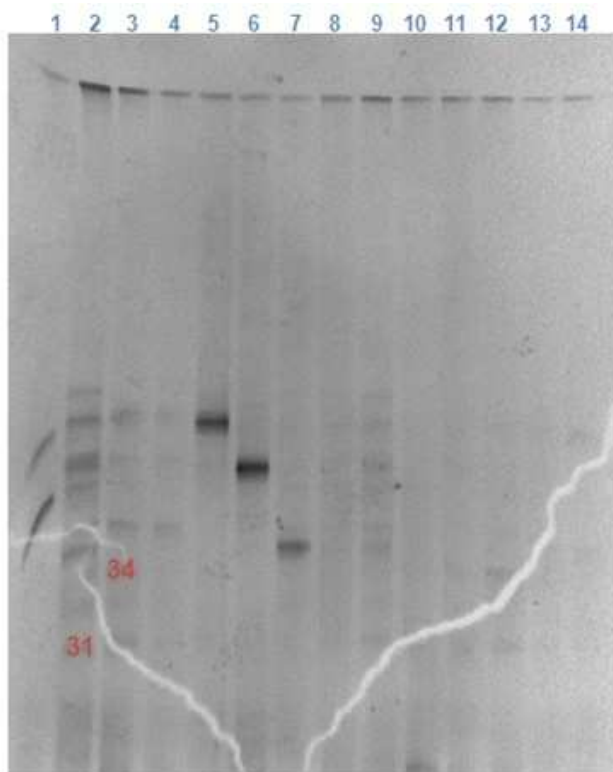
Figura 32 - Imagem do gel de DGGE com o gradiente 29,5 e 50 % a 20 de Junho



Legenda:

- 1 – Amostra padrão
- 2 – Amostra de afluente cultivável em meio PCA
- 3 – Amostra de efluente cultivável em meio PCA
- 4 – Amostra de lamas activadas cultiváveis em meio PCA
- 5 – Banda 28
- 6 – Banda 29
- 7 – Banda 30
- 8 – Banda 31
- 9 – Banda 32
- 10 – Banda 33, amostra pura
- 11 – Banda 34
- 12 – Banda 35
- 13 – Banda 36
- 14 – Banda 37, amostra pura
- 15 – Banda 38
- 16 – Banda 39
- 28 a 30 – Diversas bandas cortadas novamente, dado que ainda não estavam puras

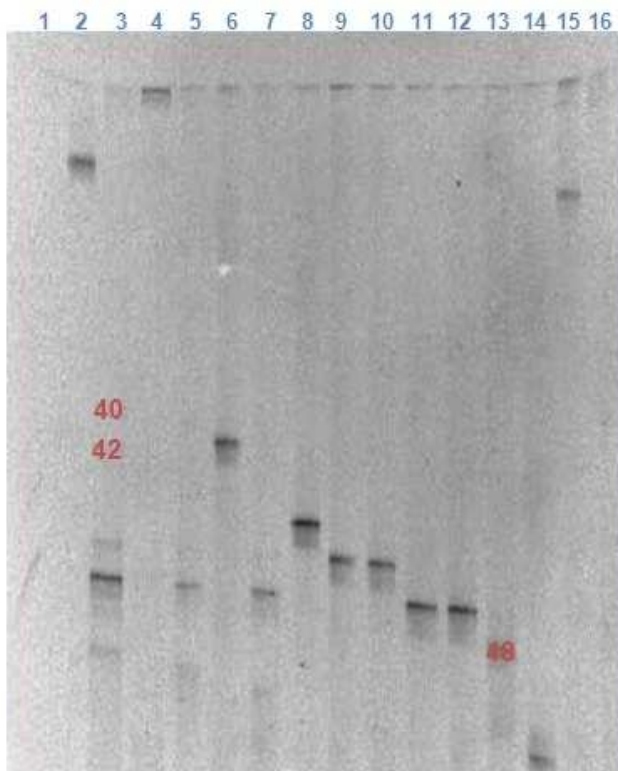
Figura 33 - Imagem do gel de DGGE com o gradiente 29,5 e 50 % a 20 de Junho



Legenda:

- 1 – Amostra padrão
- 2 – Amostra de afluente cultivável em meio PCA
- 3 – Amostra de efluente cultivável em meio PCA
- 4 – Amostra de lamas activadas cultiváveis em meio PCA
- 5 – Banda 28, amostra pura
- 6 – Banda 29, amostra pura
- 7 – Banda 30, amostra pura
- 8 – Banda 31
- 9 – Banda 32
- 10 – Banda 34
- 11 – Banda 35
- 12 – Banda 36
- 13 – Banda 37
- 14 – Banda 39
- 31 e 34 – Bandas cortadas novamente da amostra original

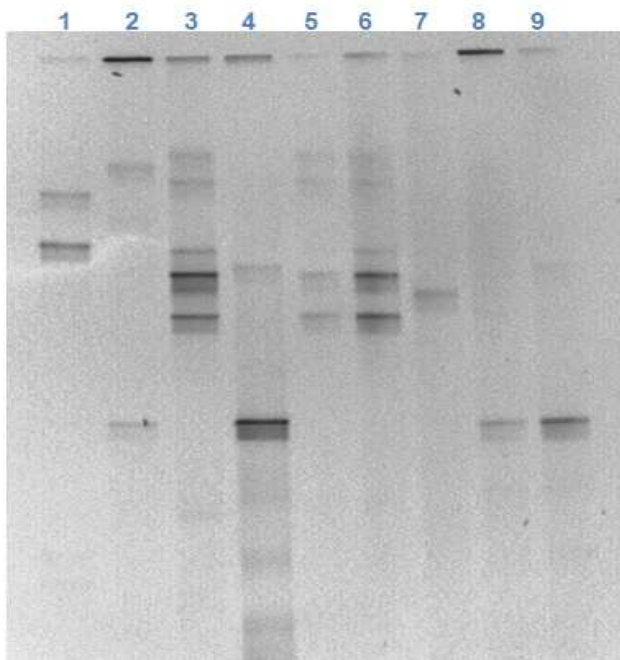
Figura 34 - Imagem do gel de DGGE com o gradiente 29,5 e 50 % a 23 de Junho



Legenda:

- 1 – Amostra padrão
- 2 – Amostra de enriquecimento final de lamas activadas da primeira colhida a 11 de Março
- 3 – Duplicado da amostra de enriquecimento final de afluente cultivável em meio PCA com ciprofloxacina
- 4 – Amostra de enriquecimento final de lamas activadas cultiváveis em meio PCA
- 5 – Banda 40
- 6 – Banda 41, amostra pura
- 7 – Banda 42
- 8 – Banda 43, amostra pura
- 9 – Banda 44, amostra pura
- 10 – Banda 45, amostra pura
- 11 – Banda 46, amostra pura
- 12 – Banda 47, amostra pura
- 13 – Banda 48
- 14 – Banda 50, amostra pura
- 15 – Banda 51
- 16 – Banda 52
- 40, 42 e 48 – As duas primeiras bandas foram cortadas novamente da amostra original e a última banda foi cortada novamente, dado que ainda não estava pura

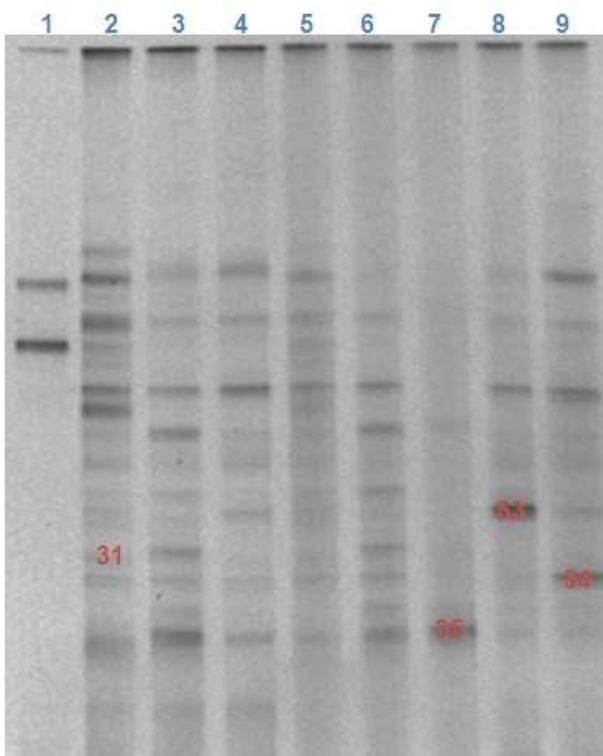
Figura 35 - Imagem do gel de DGGE com o gradiente 29,5 e 50 % a 23 de Junho



Legenda:

- 1 – Amostra padrão
- 2 – Amostra de enriquecimento final de lamas activadas colhida a 21 de Abril
- 3 – Duplicado da amostra de enriquecimento final de afluente cultivável em meio PCA com ciprofloxacina
- 4 – Amostra de enriquecimento final de lamas activadas cultiváveis em meio PCA
- 5 – Banda 40, esta banda foi desprezada, dado que não se conseguia purificar
- 6 – Banda 42, esta banda foi desprezada, dado que não se conseguia purificar
- 7 – Banda 48, amostra pura
- 8 – Banda 51, amostra pura
- 9 – Banda 52, amostra pura

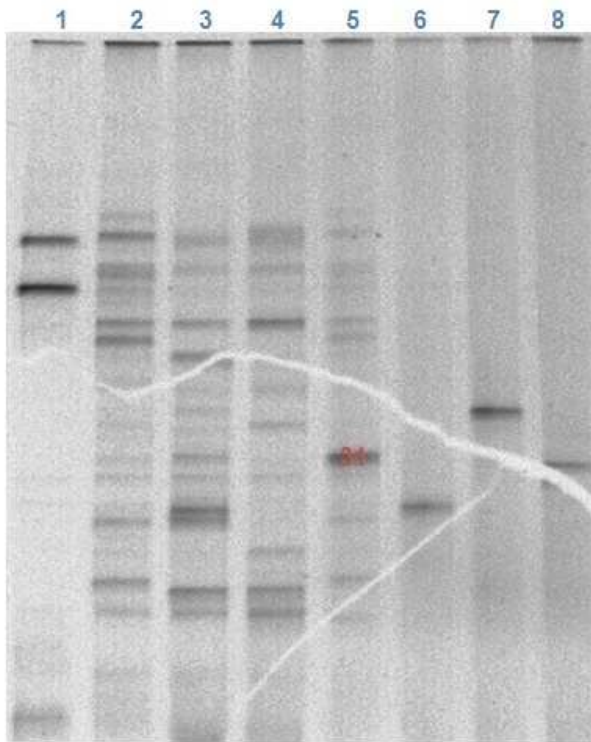
Figura 36 - Imagem do gel de DGGE com o gradiente 29,5 e 50 % a 26 de Junho



Legenda:

- 1 – Amostra padrão
- 2 – Amostra de afluente cultivável em meio PCA
- 3 – Amostra de efluente cultivável em meio PCA
- 4 – Amostra de lamas activadas cultiváveis em meio PCA
- 5 – Banda 31
- 6 – Banda 34, esta banda foi desprezada, dado que não se conseguia purificar
- 7 – Banda 35
- 8 – Banda 53
- 9 – Banda 54
- 31, 35, 53 e 54 – A primeira banda foi cortada novamente da amostra original, as três últimas bandas foram cortadas novamente, dado que ainda não estavam puras

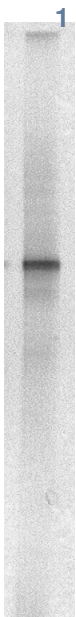
Figura 37 - Imagem do gel de DGGE com o gradiente 29,5 e 50 % a 1 de Julho



Legenda:

- 1 – Amostra padrão
- 2 – Amostra de afluente cultivável em meio PCA
- 3 – Amostra de efluente cultivável em meio PCA
- 4 – Amostra de lamas activadas cultiváveis em meio PCA
- 5 – Banda 31
- 6 – Banda 35, amostra pura
- 7 – Banda 53, amostra pura
- 8 – Banda 54, amostra pura
- 31 – Banda cortada novamente, dado que ainda não estava pura

Figura 38 - Imagem do gel de DGGE com o gradiente 29,5 e 50 % a 3 de Julho



Legenda:

- 1 – Banda 31, amostra pura

Figura 39 - Imagem do gel de DGGE com o gradiente 29,5 e 50 % a 18 de Julho

9.7.7. Purificação/Sequenciação

A purificação/sequenciação do DNA é considerada uma etapa crucial, relativamente a este tipo de análises, pois é um processo que permite determinar a ordem exacta dos nucleótidos (pares de bases químicas que constituem o DNA), existentes em diferentes posições, numa sequência a analisar.

A sequenciação/purificação das diversas bandas cortadas foi feita recorrendo ao *GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit*, que usa um agente caotrópico, capaz de promover a desnaturação proteica e a ligação da cadeia dupla de DNA a uma matriz de fibra de vidro. Uma vez capturado o DNA, as proteínas, sais contaminantes e outros resíduos foram removidos, por acção de uma solução etanólica e o DNA purificado foi eluído, no seio de uma solução de fraca força iónica. As amostras de DNA foram posteriormente recuperadas, da coluna GFX, numa forma concentrada, através da eluição das mesmas, com 50 µL de água ou solução tampão. Após todo este procedimento as amostras foram guardadas a -20 °C, para posteriormente serem enviadas para sequenciação. A metodologia associada à sua realização encontra-se detalhadamente descrita no respectivo kit [11].

A etapa de sequenciação de cada uma das bandas, *single primer extension*, foi concretizada pela entidade STAB VIDA, Investigação e Serviços em Ciências Biológicas, Lda., responsável por executar a determinação da ordem exacta dos nucleótidos, existentes em diferentes posições, numa sequência do gene 16S rRNA a analisar, recorrendo para isso, a sequenciadores automáticos, onde a etapa de leitura do gel e a de processamento sequencial, são realizadas, através de *software* informático. A sequenciação foi, assim, concretizada, mediante o fornecimento do *primer* 518 *reverse* e deste modo, foi possível, após recepção dos resultados, identificar o género e/ou espécie microbiológica em causa, presente nas várias amostras obtidas ao longo de todo o trabalho experimental, por comparação com bases de dados mundiais, disponíveis na Internet [37].

Tabela 14 – Bandas, *primer* fornecido, sequência usada na comparação, % de similaridade, género e /ou espécie microbiológica identificada e origem [37]

Bandas	<i>Primer</i> fornecido	Sequência usada na comparação	% de Similaridade*	Género e/ou Espécie Microbiológica Identificada	Origem
1	518R	²⁶ TATAATACCGTCATTATCTTCTCATAT AAAAGGAGTTTACGCACCGAAATGTGT CATCCTCCACGCGGCGTTGCTGCATC AGACTTTCGTCCATTGTGCAATATTCC CCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCCC CCCGTGCCCCCGC ¹⁷³	100	<i>Arcobacter cryaerophilus</i>	Isolado clínico humano resistente à ciprofloxacina
2	518R	¹⁴⁰ CTCGCGCCATTGACCAATATTCCCT CACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCCCC CCGTGCCCCCGC ²⁰⁴	95	Bactéria A-22	Bactéria isolada de um solo
3	518R	⁶ ATTAGCCGAGCTTATGCTTCAGTACCT TCACCTTGTTGCAAACAAGGGTTTAT TCCCTGATAAAAGCAGTTTACAACCCA TAAGGCCGTCTTCCTGCACGCGGCAT GGCTGGGTCAGACTTGCCTCCATTGC CCAATATTCCTTACTGCTGCCTCCCGT AGGAGTCCCCCGTGCCCCCGC ¹⁸⁹	90	<i>Candidatus comitans</i>	Bactéria que vive em culturas com <i>Chondromyces crocatus</i>
4	518R	⁶ ATTAGCCCGCAGCTTCATGCTCTCAC GTACCTTCACCCTTGTTGCAAACAAG GGTTTATTCCCTGATAAAAGCAGTTTA CAACCCATAAGGCCGTCTTCCTGCACG CGGCATGGCTGGGTCAGACTTGCCTC CATTGCCCAATATTCCTTACTGCTGCC TCCCGTAGGAGTCCCCCGTGCCCC GC ¹⁹⁵	97	Bactéria SVAL 2.36	Heterotróficos encontrados num lago de uma praia em Great Basin

5	518R	¹¹⁰ AGTCTTACAACGCNGAAGGCCTTCN TCCTGCACGCGGC ¹⁴⁷	91	<i>Adhaeribacter</i> sp.	Isolado de bactérias de amostras de solo florestal
6	518R	¹⁰⁹ ATGCATATCTTCCTGCACGCGGGCA TGGCTGGATCAGGGCTTGCGCCCATT G ¹⁶²	97	<i>Acidovorax</i> sp.	Isolado usado na biodegradação de moléculas policíclicas, de elevado peso molecular e de hidrocarbonetos aromáticos
7	518R	⁷⁷ TTCTTCCCGTACAAAAGCAGTTTACA CACCATAGATGCTTCTTCCTGCACGCG GCATGGCTGGTTCAGACTTTTCGACCAT TGACCAAGTATTCCTCACTGCTGCCTC CCGTAGGAGTCCCCCGTGCCCCCGC 211	97	<i>Flavobacterium columnare</i>	Bactéria isolada de lamas activadas
8	518R	⁹³ CCATAGGACCGTCTTCCTGCACGCG GCATGGCTGGTTCAGGCTCTCGCCCA TTGACCA ¹⁵²	96	<i>Flavobacterium cheniae</i>	Bactéria isolada de sedimentos de um reservatório eutotrófico
9	518R	¹¹⁵ CGGCATTGCTGGATCAGGCTTTCCG CCCATTGTCCAATATTCC ¹⁵⁹	97	<i>Sphingomonas</i> sp.	Desconhecida
10	518R	⁹² TTCTACAACCCGAAGGCCTTCNTCCT CGCACGCGGCATTGCTGGATCAGGCT TGCTGC ¹⁵¹	96	<i>Rhodoferax</i> sp.	Bactéria aeróbia cultivável de uma região montanhosa presente num curso de água

11	518R	⁶³ AGAAGCCGTGTTGCTCCGTACAAA GCAGTTTACAACCCGAAGGCCTTCGTC CTGCACGCGGCATTGCTGGATCAGGC TTGCGCCATTGTCCAAAATTCCCCAC TGCTGCCTCCCGTAGGAGTCCCCCG TGCCCCGC ²⁰⁵	99	<i>Hydrogenophaga</i> sp. Pd 1	Bactéria isolada de comunidades microbianas mistas de aeróbios e anaeróbios em águas contaminadas com benzeno
12	518R	²⁶ TTCTTCACGGTACCGTCATTAGCCCC CTGTATTAGAGAGAGCCGTTTCGCTCC GTACAAAAGCAGTTTACAACCCGAAGG CCTTCGTCCTGCACGCGGCATTGCTG GATCAGGCTTGCGCCATTGTCCAAA TTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT CCCCCGTGCCCCGC ²⁰³	97	<i>Hydrogenophaga</i> sp. EMB 85	Bactéria isolada de comunidades microbianas de culturas dependentes e independentes de um reactor SBR aeróbio e anaeróbio
14	518R	⁰ CCACCCGTTTTACCCGCGGCTGCTGG TCTCCCGTAATACCGCGTGCTGCT ⁵¹	100	<i>Clostridiaceae</i>	Desconhecida
15	518R	⁹¹ GCTTTACAACCAAAGGCCTTCTTCA CACACGCGGGCTATGGCTGGATCAGG CTTGCGCCATTGTCCAATATTCCCCA CTGCTGCCTCCCGTAGGAG ¹⁹⁰	97	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	Bactéria isolada de comunidade microbiana de leite materno em mulheres com mastite
16	518R	²⁵ TTGCTTCTGGTACCTTCACCTACTTA CACGTAAGTAGGTTTATCCCCAGTATA AAAGTAGTTTACAACCCATAAGGCCGT CATCCTACACGCGGGATGGCTGGATC	98	<i>Empedobacter brevis</i>	Bactéria isolada de um solo contaminado com óleo

		AGGCTTCCACCCATTGTCCAATATTCC TCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCCC CCCGTGCCCCGC ¹⁹⁸			
17	518R	⁴² TTGCAGGAGTATTAATGCTACAACCC TTCCTCCCAACTTAAAGTGCTTTACAAT CCGAAGACCTTCTTCACACACGCGGC ATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCCATTG TCCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCG TAGGAGTCCCCCGTGCCCCGC ²⁰⁰	98	<i>Pseudomonas argentinensis</i>	Bactéria aeróbia cultivável de uma região montanhosa presente num curso de água
18	518R	⁴³ CAGACTACTTCACACGTAAGTAGGTT TATTGCCCGAATAAAAGCAGTATTACG ACCCANAGGGCTGTGCGTTCCTGCAC GCAGGCATGGCTGGTTCAGAGTTCCC TCCATTGACCAATATTCCTTACTGCTG CCTCCCGTAGGAGTCCCCCGTGCCC ²⁰²	94	<i>Pedobacter heparinus</i>	Bactéria isolada de comunidades microbianas dinâmicas
19	518R	⁸⁰ CCCCGCTGAAAGTACTTTACAACCTC GAAGGCTCNTATCTTCATACACGCGGC ATGGNTGCATCAGGCTCTGCNGCCCA TTGNGCAATATTCCCCAGTGCTGCCTG CCG ¹⁹⁰	90	<i>Enterobacter cloacae</i>	Desconhecida
20	518R	¹⁴⁵ TGGATCAGGGTTTCCCCNNTGNCC AAAATTCCCCANTGCTGCCTCCCGTAA AA ²⁰⁰	94	<i>Alcaligenes sp.</i>	Bactéria isolada de comunidade microbiana da bacia rio Gundar em Thirumangalam, sul da Índia
21	518R	¹³¹ CTGCTACGCGNCATTGNTGGATCAG GGTTTCCCCATTGNCCAAAATTCCCC	92	<i>Comamonas denitrificans</i>	Bactéria desnitrificante

		A ¹⁸⁵			isolada de lam ativas
22	518R	³⁴ ACCGTCGGCTGCTGGGCTATTAACA CCACGCACTTTTTCGTTGCCTGTA AAANCAGTTTACAATCCCTGAAGGCC TTCATCCTGCTACGCGGCATTGNATGG ATCAGGGTTTCCCCCATTGGCCAAAAT TCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGA ¹⁹²	91	<i>Comamonas denitrificans</i>	Bactéria desnitrificante isolada de lam ativas
23	518R	⁵² CATGGGCTATCTAACACCACGCACTG TTTTCGTTGCCGTAACAAAAGCAGTTT ACAACCCGAAGGCCATTCATCCTGCTA CGCGGCATTGCTGGATCAGGGTTTCC CCCATTGNCCAAAATTCCCCACTGCTG CCTCCCGTAGGA ¹⁹⁸	95	<i>Comamonas testosteroni</i>	Bactéria que degrada <i>taurocholate</i>
24	518R	¹⁵⁶ GGCTTTCCCCCATTGGCCAAAATTC CCAATG ¹⁸⁹	96	<i>Sporobacter termitidis</i>	Bactéria do tracto digestivo da térmita da madeira <i>Nasutitermeslujae</i>
25	518R	¹⁰⁵ CCAGAAAGGCCTATCTTCACACACG NCGGGCATGGCTTGG ¹⁴⁶	100	<i>Psychrobacter maritimus</i>	Bactéria isolada de comunidades microbianas para produção de antibióticos de águas residuais e efluente final usando técnicas de culturas dependentes e independentes

26	518R	⁵⁷ TTCTAGCAGCTGCCTCCTCCTNGCTT AAAGTAGCTTTACANACCAGA ¹⁰⁵	93	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Isolado de bactérias Gram negativas de cinco hospitais da Índia
27	518R	⁷⁰ AGTCCTCCTACACTCGCTTAAAGTGC TTTACAACCAAAGGCTCTATCTTCACA CACNGCGGGCTATGGCTGGATCA ¹⁴⁸	90	<i>Acinetobacter Iwoffii</i>	Desconhecida
28	518R	¹⁰⁹ GAAGTACNTTCTTCACACACGGCTGG GCATGG ¹⁴¹	95	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Bactéria isolada do camarão tigre
29		¹⁰⁹ CGTCGTCCTTCACGCGGGTATGGCT GGATCAGGCTCATCACCCATTGTCCAA TATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGA GTCCC ¹⁹⁴	97	<i>Chryseobacterium soldanellicola</i>	Bactéria isolada de um solo da ilha de Dokdo
30	518R	¹³³ CCTTGTATCACGCTCTCTGCATCTCT ACCTGCGGCACAGATTCGCTGGAA ¹⁸⁴	100	Bactéria não cultivável	Bactéria isolada de comunidade microbiana de sedimentos hidrotermais de Yonaguni Knoll IV, no sul de Okinawa Trough
31	518R	¹⁴⁸ AAGCTTGCCGCCATTGTGCAATAT TCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGA ¹⁹⁸	100	<i>Gordopia sp.</i>	Desconhecida
33	518R	⁶⁹ AACGACCTCTCGCTCGCCAACTGAAA GTACTTTACAACCCTAAGGCCTTCNTC ATACACGCGGCATGG ¹³⁸	92	<i>Providencia alcalifaciens</i>	Desconhecida
35	518R	³⁶ TTAACCGCGGCTGCTGGCTACCCGT CATTAC ⁶⁸	100	<i>Bifidobacterium scardovii</i>	Bactéria isolada de um laboratório clínico

37	518R	¹³⁶ ATGGCTTGGATCAGNCTTGCGCCCA TTGNCCAATATTCCC ¹⁷⁷	94	<i>Ehrlichia</i> sp.	Desconhecida
41	518R	¹³⁹ GTCATTGACGCAGATATTCCTTACT GCTGCCTCCCGTAGGAGTCCCCCGT GCCCCCGC ²⁰⁰	91	Bactéria A-22	Desconhecida
43	518R	¹⁰ TACCGCGGCCTGCTGGCTCCGCGTT NTACCGCGGACTGCATCGCCT ⁵⁷	100	<i>Paenibacillus</i> sp.	Bactéria isolada de campos de trigo do Brasil
44	518R	¹²² ACTACACGCGGCATAGAGTATGGAT CAGGCTTTCGCCATTGTCCAATATTC CCCACTGCTGCCT ¹⁸⁸	95	<i>Pseudomonas putida</i>	Bactéria isolada da pele
45	518R	¹⁵² ATGGATCAGGCATTTCCGCCATTGT CCAATATTCGCCACTGCTGCCT ²⁰⁰	97	<i>Pseudomonas putida</i>	Bactéria isolada da pele
46	518R	¹¹⁷ TTCACACACGCGGCATGGATGGATC AGGCTTTCGCCATTGTCCAATATTC CCCACTGCTGCCT ¹⁸²	98	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bactéria isolada do sistema larval de <i>Macrobrachium rosenbergii</i>
47	518R	¹⁴⁷ ACACACGCGGCATAGAGCATGGATC AGGCATTTCCGCCATTGTCCAATATTC CCCACTGCTGCCTGCCGTAGGAG ²²¹	94	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bactéria tolerante a cobre
48	518R	¹²⁰ ACGCCGCATGGCTGGTTACAGACTT GCGCTCCATTGACCAATATTCCTTA ¹⁶⁹	94	<i>Bacteroidetes</i>	Bactéria isolada de um solo
49	518R	⁴⁶ CCCTCTGTTCCGAAACAAGGTGTTTA TTGCCCTGCATAAAAGCAGTTTACAAC TTCATAAGGCGCGTCTTCCTGCACGC GGCATGGCTGGGTCAGACTTGCGTCC ATTGCCANTATTCCTTACTGCTGCCT CCCGTAGGAGTCCCCCGTGCCCCCG C ²⁰⁵	92	Bactéria SVAL 2.36	Heterotróficos encontrados num lago de uma praia em Great Basin

50	518R	¹¹³ TCACACACCGACTGGCATGGCATGG ATCAGGCTTTTCGCTCCATTGTCCAATA TNCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAG ¹ ₉₂	93	<i>Stappia</i> sp.	Bactéria isolada do fundo do Oceano Índico
51	518R	⁸² CAAAAGAGCGTTTACAACCCGAAGG CCTTCTTCACTTGCACGCGGCATGGCT GGATCAGGCTTTTCGCCATTGTCCAAA ATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGA GTCCCCCGTGCCCCCGC ²⁰⁶	97	<i>Chitinimonas taiwanensis</i>	Bactéria isolada de um viveiro de camarões
52	518R	⁶⁴ AGGCTTTTCGTTCCGTACAAAAGCAG TTTACAACCCGANGGCCTTCATCCTGC ACGCGGCATGGCTGGATCAGGCTTTC GCCATTGTCCAAAATTCCCCANTGCT GCCTCCCGTAGGAGTCCCCCGTGCC CCCGC ²⁰²	98	<i>Diaphorobacter nitroreducens</i>	Eubactéria isolada de um efluente comum de tratamento de plantas
53	518R	¹⁴⁰ AAGCTTTTCGCCATTGTCCAANATTA CCCCTGCTGCC ¹⁷⁹	94	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bactéria isolada de um solo contaminado com óleo

*-% de Similaridade é estimada entre a sequência seleccionada e a sequência identificativa de uma espécie microbiológica específica, existente na base de dados mundiais.

9.8. Isolamento, Caracterização e Identificação de Microrganismos Resistentes à Ciprofloxacina

Ao mesmo tempo que foi efectuada a caracterização final, da população bacteriana total e cultivável, na presença e ausência de antibiótico, após sucessivas transferências do enriquecimento semanal de meio fresco e após filtração através do uso da técnica das membranas filtrantes das amostras de água residual afluyente e lamas activadas, das culturas mistas finais dos enriquecimentos e após o período de incubação de 48 horas, seleccionaram-se diversas colónias, com morfologia colonial diferente, das várias culturas de água residual afluyente e lamas activadas, estas foram repicadas para meio PCA e após crescimento e isolamento, procedeu-se aos seguintes testes de caracterização fenotípica preliminar: morfologia colonial, coloração de Gram, presença de catalase, de citocromo c oxidase, testes de sensibilidade a antibióticos, através do método de antibiograma e sequenciação do gene 16S rRNA.

De seguida, dos vários isolados obtidos, com morfologia colonial diferente, que totalizam um valor de 8, fez-se a extracção do DNA da população heterotrófica, a amplificação deste, através da reacção em cadeia de polimerase, efectuou-se a electroforese em gel de agarose, para a certificação da existência de produtos de PCR e por último, fez-se a purificação/sequenciação dos diversos produtos de PCR, que foram novamente submetidos a electroforese em gel de agarose.

A repicagem e isolamento das colónias seleccionadas foi feita em ambiente asséptico, à chama do bico de Bunsen e este passo foi extremamente importante, uma vez que, todos os testes que se realizaram em seguida, necessitavam de culturas de colónias frescas e isoladas. A repicagem para meio PCA, das diversas colónias, consiste em fazer um riscado, com ansa estéril, em 4 quadrantes da placa de Petri que contém o meio de cultivo, de modo a obterem-se colónias frescas, idênticas à original, mas isoladas.

9.8.1. Morfologia Colonial

As diferentes colónias seleccionadas foram identificadas segundo a sua morfologia colonial. Em termos de forma, as colónias, podem ser: punctiformes, circulares, filamentosas, irregulares, rizóides ou fusiformes. Em termos de elevação, podem ser: planas, elevadas, convexas, pulvinadas ou umblunadas. Em termos de margem, podem ser: inteiras, onduladas, lobadas, erodidas, filamentosas ou encrespadas. Outras características que podem ser mencionadas são: cor, brilho, opacidade, consistência, tamanho, etc.

9.8.2. Coloração de Gram

A coloração de Gram é uma técnica de coloração de preparações histológicas, para observação ao microscópio óptico, utilizada para corar, diferencialmente, microrganismos com base na composição química e integridade da parede celular. Consoante a cor que adquirem, são classificados em Gram positivas ou Gram negativas. Esta técnica foi inventada pelo cientista e médico dinamarquês Hans Christian Joachim Gram (1853-1938).

Geralmente as bactérias Gram negativas são mais patogénicas, possuindo, ainda, lipopolissacarídeos na sua membrana exterior, que agravam a infecção. Muitos antibióticos atacam especificamente a parede celular das bactérias Gram positivas, inibindo as enzimas transpeptidase e carboxipeptidase, responsáveis pela síntese dos peptidoglicanos. As características estruturais da parede bacteriana estão na base da técnica de Gram que funciona da seguinte forma:

- Numa lâmina colocou-se algumas gotas de água destilada consoante o número de amostras a analisar, 8 no total;
- Preparou-se o esfregaço das várias amostras;
- Secou-se a lâmina que contém o esfregaço ao ar e fixou-se em chama;
- Cobriu-se a lâmina com o corante cristal violeta durante 1 minuto;
- Lavou-se a lâmina com água;
- Cobriu-se a lâmina com uma solução de lugol durante 1 minuto;
- Lavou-se a lâmina com água;
- Descorou-se com álcool-acetona por 5 a 10 segundos;
- Lavou-se novamente a lâmina com água e cobriu-se a lâmina com o corante safranina durante 1 minuto;
- Lavou-se, secou-se suavemente com papel filtro e observou-se ao microscópio.

O primeiro corante, o cristal de violeta incorpora a bactéria, assim como a solução de lugol. Intracelularmente, forma-se um complexo corante-iodo, insolúvel em água, que vai corar o protoplasma e a parede celular. A lavagem com álcool-acetona dissolve o complexo corante-iodo e se a parede celular for permeável a este, arrasta-o para fora da célula. As bactérias capazes de preservar a coloração roxa do primeiro corante, o cristal de violeta, designam-se de Gram positivas. As bactérias que, após a diferenciação com álcool-acetona, são incapazes de reter o cristal de violeta, designam-se de Gram negativas, corando pela safranina diluída, que se fixa apenas nas bactérias Gram-negativas. Resumindo, as bactérias Gram positivas coram de roxo e as Gram negativas coram de vermelho. Esta técnica de coloração permite então a distinção entre bactérias com parede celular mais ou menos rica em peptidoglicanos. De referir que embora uma bactéria Gram negativa nunca

possa corar positivamente, pelo Gram, uma bactéria estruturalmente Gram positiva pode corar negativamente, se a sua parede de peptidoglicano for destruída ou danificada.

Na observação microscópica após coloração, o material a observar foi previamente fixado, o que facilitou a observação de bactérias, uma vez que têm reduzidas dimensões, fraco contraste e alguma mobilidade. A fixação é a coagulação do protoplasma bacteriano, com o mínimo de deformação e a sua fixação à lâmina. Como exemplos de agentes fixadores tem-se o calor, o éter, etc. [25].

9.8.3. Testes de Metabolismo

Os testes mais importantes são aqueles que dizem respeito ao metabolismo da bactéria e que na grande maioria das vezes estão relacionados com a presença de enzimas específicas. Assim sendo, fazem-se estudos sobre:

Presença de catalase, que é indispensável na identificação de cocos Gram positivos. Os estafilococos são catalase positivos, enquanto os estreptococos são catalase negativos.

Para a realização deste teste, numa lâmina de microscópio limpa, colocou-se algumas gotas de peróxido de hidrogénio (3 %, p/p), protegida da luz, num total de 8, dado que o número de isolados correspondia a este valor. De seguida, colocou-se uma ansa de cada um desses isolados. A observação imediata de um efervescimento de bolhas de oxigénio indicou uma reacção positiva.

A presença de citocromo c oxidase é utilizada para diferenciar o género *Neisseria* (oxidase positiva), de outros cocos Gram negativos e para distinguir a família *Enterobacteriaceae* (oxidase negativa), de outros bacilos Gram negativos (oxidase positiva).

Para a realização deste teste, preparou-se, previamente, uma solução, onde se dissolveu 0,005 g do reagente tetrametil-p-fenilenediamina dihidroclorato TMDP a 1 %, em 500 µL de água destilada. De seguida, sobre uma lâmina de microscópio limpa, colocou-se uma tira de papel Whatman, que se impregnou com a solução preparada anteriormente e com a ajuda de um palito estéril, retirou-se cada um dos isolados e esfregou-se no papel com solução. Uma reacção positiva corresponde ao aparecimento de cor azul e negativa quando não há aparecimento de cor. Esta coloração resulta da oxidação do reagente pelo citocromo c oxidase; o reagente oxidado é azul e a forma reduzida é incolor [25].

9.8.4. Teste de Sensibilidade a Antibióticos (TSA)

O Teste de Sensibilidade aos Antibióticos (TSA) é um teste feito em microbiologia clínica, que avalia a capacidade de um antibiótico inibir o crescimento de bactérias em meio de cultura. Os antibióticos são um grupo de substâncias elaboradas por fungos, bactérias ou outros seres vivos, ou sintetizadas quimicamente, que têm como denominador comum a acção sobre microrganismos, causando-lhes a morte ou paragem do seu desenvolvimento e multiplicação.

O agente antimicrobiano "ideal" será aquele que, entre outras características, tenha uma elevada actividade contra o microrganismo que se pretende eliminar e, simultaneamente, não tenha qualquer acção prejudicial nas células do hospedeiro, que o microrganismo referido infecta. Aplica-se ao conceito de toxicidade selectiva, inicialmente proposto por Paul Ehrlich e que pode ser alcançado quando se utilizam substâncias antimicrobianas que actuam em alvos estruturais ou metabólicos da célula procariótica, que não existem na célula hospedeira eucariótica.

Estes testes são uma medida da sensibilidade de uma bactéria a um antibiótico, permitindo assim a escolha do antibiótico mais eficaz a ser usado contra essa mesma bactéria. Tal como os testes de identificação bioquímica, só são passíveis de serem realizados quando se está perante uma cultura bacteriana isolada.

Se uma bactéria sofre a acção de um antibiótico, esta diz-se sensível; se pelo contrário, o antibiótico não exerce qualquer efeito sobre a bactéria esta diz-se resistente. A resistência pode ser natural ou adquirida. Portanto, para cada bactéria há um conjunto de antibióticos que são eficazes e outros que não o são [25].

9.8.5. Teste de Sensibilidade a Antibióticos (TSA) através do Método de Antibiograma

Este método baseia-se no facto dum antibiótico depositado sobre uma gelose nutritiva se difundir segundo um gradiente de concentração. O teste mede a capacidade dos antibióticos inibirem o crescimento das bactérias. E por essa razão haverá o aparecimento de uma zona de inibição à volta do antibiótico, maior ou menor consoante a sensibilidade da estirpe. O diâmetro das zonas de inibição varia com as características moleculares dos diferentes antibióticos. Assim, o diâmetro de um antibiótico não pode ser comparado com outro que actue no mesmo organismo. Porém, para qualquer antibiótico, o diâmetro pode ser comparado com um padrão, o padrão usado neste teste foi a *E. coli*. Isto torna possível determinar para cada antibiótico um diâmetro mínimo, para a zona de inibição que denota susceptibilidade.

Segundo este teste as bactérias podem ser classificadas em sensíveis (a estirpe pode ser atingida pela dose habitual), intermédias (estirpes atingidas

por doses altas) e resistentes (a concentração que a estirpe é capaz de suportar é superior à concentração possível de obter “in vivo”). [25]

A resistência a antibióticos foi testada pelo método de Kirby-Bauer, com base nas recomendações do CLSI, 2006. A susceptibilidade bacteriana a agentes microbianos pode ser medida *in vitro* usando o método de difusão em agár. Usando esta metodologia, os agentes antimicrobianos são aplicados sobre a forma de discos de papel de filtro. Simultaneamente, os discos absorvem a água do meio, de acordo com as leis da difusão da física. O resultado é a formação de um gradiente de concentração de antibiótico, que decresce com a distância ao disco, este processo é mais rápido do que a multiplicação celular, quando esta ocorre, será condicionada pela concentração de antibiótico nos diferentes pontos da placa, permitindo determinar a zona de inibição.

Para a preparação de 1 L de meio utilizado para realizar os antibiogramas pelo método de difusão em agár: Mueller-Hinton pesaram-se 38 g deste meio, para um frasco Schott e posteriormente adicionou-se 1 L de água destilada, colocou-se o frasco Schott a agitar e procedeu-se à esterilização do meio, em autoclave, a 121 °C e 1,2 bar, durante 15 min. Após o período de esterilização e arrefecimento do meio, este foi distribuído, assepticamente, em placas de Petri estéreis, cerca de 10mL/placa. Por fim, após solidificação, as placas foram invertidas e conservadas a 4°C.

Para a realização deste teste, em ambiente asséptico, com um palito estéril, retirou-se uma porção de amostra, de um dos isolados que se pretende testar e adicionou-se a um tubo com 2 mL de solução salina estéril 0,85 %, previamente preparado e leu-se a densidade óptica da solução obtida, depois de homogeneizada. A densidade óptica da suspensão, DO, foi medida num espectrofotómetro e deve compreender valores entre 0,220 e 0,240 a 610 nm, que corresponde a 0,5 unidades McFarland ($\sim 10^8$ UFC/mL). Esta solução serviu como suspensão padrão de referência, usado como controlo.

Em ambiente estéril, numa câmara de fluxo laminar, para cada um dos isolados, com um palito estéril, retirou-se uma porção de cada um destes e ressuspendeu-se num tubo de 2 mL de salina estéril a 0,85 % e após homogeneização, comparou-se a turvação da solução obtida com o padrão de referência usado como controlo. De seguida, com a ajuda de uma zaragatoa estéril, mergulhou-se esta na solução obtida do isolado a analisar e incorporou-se em meio Mueller-Hinton, previamente preparado, fazendo-se um riscado num quadrante, rodando-se a placa e a zaragatoa e fazendo-se o riscado noutro quadrante, até um total de 3 quadrantes diferentes. Como o teste se fez para 12 diferentes antibióticos e como em cada placa de meio Mueller-Hinton, apenas de testam 6, todo o procedimento de incorporação e riscado neste meio fez-se em duplicado.

Para a aplicação dos discos dos diferentes antibióticos, os discos impregnados de antibiótico, foram retirados do frigorífico e deixados a atingir a temperatura ambiente, de forma a minimizar a condensação do ar. Os discos

foram aplicados sobre o meio Mueller-Hinton, com a ajuda de um dispensador, que permite o preciso posicionamento dos discos com igual espaçamento de 54 mm de circunferência. Os discos foram colocados firmemente sobre a superfície do meio, permitindo uma perfeita difusão. De seguida, incubaram-se as diferentes placas, dos vários isolados, juntamente com o controlo *E. coli*, durante 24 e em alguns casos, 48 h e mediu-se para cada placa e para cada isolado, o halo de inibição formado, com a ajuda de uma régua. As diferentes placas foram observadas sobre um fundo preto.

Todos os antibióticos têm uma gama de resistência/sensibilidade com base nas recomendações do CLSI, 2006.

Tabela 15 - Diferentes grupos de antibióticos usados

Diferentes Grupos de Antibióticos	Gama de Resistência/Sensibilidade
Amoxicilina AML	14/21
Gentamicina CN	14/15
Ciprofloxacina CIP	19/22
Sulfametoxazol + Trimetropim SXT	10/16
Tetraciclina TE	12/19
Cefalotina KF	14
Meronemo MEM	17/22
Ceftazina CAZ	15/21
Tricarilina TIC	18/22
Colistine Sulfato CT	15
Sulfametoxazol RL	12/16
Estreptomina S	13/15

Veremos o exemplo para a amoxicilina.

A sua gama de resistência/sensibilidade é de 14/21. Se o diâmetro do halo for inferior a 14, a colónia é resistente, se for igual ou superior a 21, a colónia é sensível e se for igual ou superior a 14 e inferior a 21, a colónia é intermédia

No caso da cefalotina e do colistine sulfato a gama de resistência/sensibilidade é para o primeiro 14 e para o segundo 15, logo nestes casos não existe colónia intermédia. Para a cefalotina, se o diâmetro do halo for inferior a 14, a colónia é resistente, se este for igual ou superior a 14 é sensível. Para o colistine sulfato se o diâmetro do halo for inferior a 15, a colónia é resistente, se este for igual ou superior a 15 é sensível.

9.8.6. RNA

Na biologia, o ácido ribonucléico (sigla em português: ARN e em inglês, RNA, *ribonucleic acid*), é o responsável pela síntese de proteínas da célula. O RNA localiza-se no citoplasma (maior quantidade) e no núcleo

A composição do RNA é muito semelhante à do DNA, contudo, apresenta algumas diferenças. O RNA é um polímero de nucleótidos, geralmente em cadeia simples, formado por moléculas de dimensões muito inferiores às do DNA. O RNA é constituído por uma pentose (Ribose), por um grupo fosfato e uma base azotada (nitrogenada), que pode ser adenina (A), guanina (G), citosina (C) e uracilo (U). O RNA forma-se no núcleo e migra para o citoplasma, este apresenta um tipo de cadeia diferente da do DNA e tem geralmente uma só cadeia simples. A quantidade de RNA é variável de célula para célula e varia também com a actividade celular.

As moléculas de RNA transcritas a partir do DNA podem ser de três tipos principais: RNA mensageiro (mRNA), RNA ribossómico (rRNA) e RNA transportador (tRNA). Nas células eucarióticas, os três tipos de RNA são transcritos a partir do DNA cromossómico, no interior do núcleo celular. Nos organismos procarióticos, que não apresentam núcleo, a síntese desses tipos de RNA ocorre no nucleóide. Os três tipos de RNA participam da síntese de proteínas.

Os segmentos de DNA, que servem de molde para a formação das moléculas de RNA ribossómico, ficam em locais específicos. Esses locais, que contêm os genes para o RNA ribossómico, são chamados de regiões organizadoras do nucléolo. As moléculas de RNA ribossómico recém-sintetizadas acumulam-se, durante certo tempo, em redor dessas regiões formando corpos densos chamados nucléolos. As moléculas de RNA ribossómico, presentes no nucléolo, unem-se a proteínas especiais vindas do citoplasma, para formar os ribossomas, as estruturas citoplasmáticas que produzem as proteínas de todas as células vivas.

As moléculas de RNA transportador (tRNA) também são sintetizadas a partir de segmentos de DNA, presentes em certas regiões específicas. Esse

tipo de RNA é chamado de transportador, por ser o responsável pelo transporte das moléculas de aminoácidos, para formar as proteínas. Um tRNA é uma molécula relativamente pequena. Numa das extremidades liga-se a um aminoácido específico. Por meio de um anticodão, o tRNA emparelha-se temporariamente a bases complementares do RNA mensageiro (mRNA), o codão.

O RNA mensageiro define o tipo de proteína que será produzida [25, 29].

9.8.7. Sequenciação do Gene 16S rRNA

Tanto os procariontes, como os eucariontes, podem ser divididos em duas subunidades.

Tabela 16 - Diferenças em tamanho e na grande e pequena subunidade entre procariontes e eucariontes

Tipo	Tamanho	Grande subunidade	Pequena subunidade
Procariontes	70S	50S (5S, 23S)	30S (16S)
Eucariontes	80S	60S (5S, 5.8S, 28S)	40S (18S)

Nota: o S em 16S representa Svedberg unidades. No ribossoma dos procariontes, uma pequena subunidade contém o 16S rRNA.

As características do rRNA são importantes em medicina e em termos de evolução, dado que o rRNA é o alvo de muitos antibióticos clinicamente testados e é o gene mais conservativo, em todas as células, dado que é aquele que sofre menos variações.

O gene 16S rRNA é um componente de uma pequena subunidade do ribossoma dos procariontes, (30S) e tem um papel estrutural importante [25, 29].

9.8.8. Primers Universais

O 16S rRNA é usado em estudos filogenéticos, dado que é altamente conservativo e assim sendo, os *primers* de PCR são designados de universais.

O 16S rRNA que é o iniciador do segmento é: AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG.

O 16S rRNA que determina o fim do segmento é: ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT.

O gene que codifica o 16S rRNA tem 1550 pares de bases e contém regiões extremamente conservativas que contrastam com regiões muito variáveis. O comprimento do gene permite análises muito minimalistas com variações na sequenciação do gene. Assim sendo, regiões conservativas do gene podem ser usadas no desenho de *primers* universais para a amplificação de uma grande variedade de microrganismos ou regiões do gene muito variáveis podem ser usadas, para se fazer a distinção entre espécies de microrganismos.

Concluindo, para além de extremamente conservativo, a sequenciação do gene 16S rRNA contém regiões muito variáveis que conferem uma identificação específica de uma espécie, muito útil na identificação de bactérias e de outros microrganismos. Como resultado, a sequenciação do gene do 16S rRNA tornou-se um método fenotípico de identificação de bactérias [25, 29].

9.8.9. Extracção do DNA

Após a caracterização fenotípica preliminar e os testes de sensibilidade a antibióticos através do método de antibiograma, seguiu-se a extracção do DNA dos vários isolados obtidos. A tubos *Eppendorf* estéreis, adicionaram-se 50 µL de água ultra pura e tocou-se, com uma ansa estéril, cada um dos isolados em estudo. O conteúdo agarrado à ansa foi introduzido em cada um dos tubos *Eppendorf*, que eram posteriormente colocados num banho a 95 °C, durante 10 min, depois em gelo, durante 5 min e por último centrifugaram-se, a 14.000 rpm, os diversos tubos *Eppendorf*, durante mais 5 min. De ambos os tubos *Eppendorf*, retirou-se o sobrenadante, com a ajuda de um micropipeta e uma ponta estéril e armazenou-se a -20 °C [25, 31, 43].

9.8.10. Reacção em Cadeia de Polimerase (PCR)

Após a extracção do DNA dos diversos isolados obtidos, foi necessário fazer a sua amplificação, por PCR. Na primeira etapa do ciclo desta reacção, a temperatura foi elevada até 95 °C durante 5 min, para que houvesse a separação da dupla cadeia de DNA (desnaturação inicial), posteriormente deu-se a desnaturação propriamente dita a 94 °C, durante um min. Na segunda etapa, a temperatura foi reduzida a 55 °C, dependendo da quantidade das bases C e G dos *primers*, para que estes se ligassem ao molde de DNA (anelamento ou *annealing*), e esta etapa teve a duração de um min. Na última etapa do ciclo, a temperatura foi elevada a 72 °C, durante um min e meio para que houvesse ligação das bases e para que a enzima pudesse funcionar, sintetizando a nova molécula de DNA, esta etapa é designada de extensão. Em seguida, um novo ciclo foi iniciado, um total de 29 ciclos foi fixado. O número de ciclos de PCR deverá ser ponderado, com o objectivo de no fim se obter a

amplificação de sequências, mas apenas as de interesse - sequências alvo e normalmente, são realizados de 25 a 40 ciclos, para cada reacção, na qual a taxa de replicação é exponencial 2^{ciclos} . Assim sendo, foi determinado um número de 29 ciclos de PCR, necessários à duplicação do segmento desejado. Após a realização destes ciclos de PCR, uma etapa de extensão final a 72 °C, teve início, durante 10 min, garantindo, assim, uma perfeita amplificação e por fim, a temperatura foi reduzida para 4 °C, para arrefecimento e refrigeração dos produtos de PCR, para que estes não sofressem perturbações perante a diferença de temperatura gerada com o exterior. Posteriormente, o equipamento termociclador foi desligado e retiraram-se as amostras. O resultado foi posteriormente analisado através da electroforese em gel de agarose. Qualquer outra banda que aparecesse além destas, significa que houve amplificação de outra(s) sequência(s) além da esperada. A presença de “rastros” também não é desejável, pois poderá prejudicar a qualidade do resultado.

Para todos os ensaios adicionou-se uma amostra, que era designada de branco ou padrão de controlo, com o intuito de apreciar a exactidão e precisão, da técnica em questão, à qual não se adicionou DNA, mas sim água ultra pura estéril (filtrada e autoclavada duas vezes).

Para um volume de reacção de 50 µL, foi adicionado 10 µL de uma mistura composta pelos quatro dNTPs (desoxirribonucleotídeos trifosfatos), que constituem a cadeia de DNA (dCTP, dATP, dGTP e dTTP), a 1 mM, 26,5 µL de água ultra pura estéril (filtrada e autoclavada duas vezes), 5 µL de solução de cloreto de magnésio (MgCl₂), a 25 mM, útil para o aumento da expressão genética, ou seja, favorece a reacção enzimática, 5 µL de 10×PCR Buffer + (NH₄)₂SO₄, solução tampão, adicionada com o intuito de fornecer óptimas condições de pH e salinidade para que a síntese se processe, conferindo, assim, um meio propício à actuação da enzima Taq Polimerase. Foram igualmente adicionados posteriormente, os oligonucleotídeos/iniciadores que servirão de *primers*, ao longo da reacção e sendo assim, adicionaram-se 0,5 µL de *primer 27 forward*, que determinará o início do segmento de DNA a copiar e 0,5 µL de *primer 1492 reverse*, que determinará o fim do segmento de DNA a copiar.

Por fim, adicionou-se 0,5 µL de enzima DNA Polimerase ou Taq Polimerase, a 5 unidades/µL, que foi adicionada à restante mistura reaccional, em último, devido à sua extrema sensibilidade perante variações de temperatura. Assim sendo, aquando da sua adição, a enzima encontrava-se a -20 °C e era adicionada de imediato, dando-se início, de seguida, à reacção PCR, após a adição de 2 µL de DNA extraído, de cada isolado. Deve observar-se que, todos os reagentes devem permanecer a -20 °C.

Todo este procedimento foi efectuado em gelo, para que a reacção PCR apenas tivesse início no momento em que as amostras eram colocadas no equipamento termociclador. Após de terem adicionado todos os componentes, as amostras foram colocadas na máquina de PCR, equipamento termociclador,

capaz de promover a ocorrência de ciclos de temperatura pré-estabelecidos, dando-se início ao programa seleccionado [6, 10, 16, 19, 23, 32, 33, 43].

Desnaturaçãoinicial a 95°C/5 min				
1X				
	Desnaturaçãoa 94°C/1 min			
			Extensãoa 72 °C/1,5 min	Extensão final a 72 °C/10 min
		Annealing a 55 °C/1 min		1X
				Refrigeraçãoa 4 °C/∞
		29 X		

Figura 40 - Representação gráfica da evolução da temperatura e identificação das várias fases no decorrer dos diversos ciclos de PCR

9.8.11. Electroforese em Gel de Agarose

Para se saber se as amostras sujeitas à extracção/purificação de DNA, tinham sido bem sucedidas, na electroforese em gel de agarose, usaram-se 10 µL das várias amostras resultantes e usaram-se 5 µL das várias amostras resultantes da reacção em cadeia de polimerase, a ambas as amostras foram adicionados 3 µL de corante de elevada densidade, azul de bromofenol (2X), utilizado como marcador e como “suporte”, conferindo peso a amostra. O marcador e as amostras foram aplicados individualmente, em cada poço, originado pelos pentes, dando-se início à separação por aplicação de um campo eléctrico de 90 V, através de 2 eléctrodos situados paralelamente à fileira de poços, durante 30 a 35 min. No caso das várias amostras resultantes da reacção em cadeia de polimerase, foi importante adicionar um marcador ou padrão de peso molecular que nos indicou consoante a banda formada, quantos pares de bases possuía a amostra em estudo. O marcador de peso molecular usado permitia a identificação de 100 a 5000 pares de bases.

No caso das amostras de 10 µL resultantes da extracção do DNA, a existência de banda indica que a amostra apresenta DNA. No caso das amostras de 5 µL resultantes da reacção em cadeia de polimerase, a existência de banda indica que a amostra apresenta produtos de PCR. Após este procedimento de electroforese em gel de agarose, todas as amostras foram armazenadas a -20 °C [6, 10, 19, 23, 25, 28, 33].

9.8.12. Purificação/Sequenciação

A purificação/sequenciação do DNA é considerada uma etapa crucial, relativamente a este tipo de análises, pois é um processo que permite determinar a ordem exacta dos nucleótidos (pares de bases químicas que constituem o DNA), existentes em diferentes posições, numa sequência a analisar.

A sequenciação/purificação dos diversos produtos de PCR foi feita recorrendo ao *GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit*, que usa um agente caotrópico capaz de promover a desnaturação proteica e a ligação da cadeia dupla de DNA, a uma matriz de fibra de vidro. Uma vez capturado o DNA, as proteínas, sais contaminantes e outros resíduos foram removidos, por acção de uma solução etanólica e o DNA purificado foi eluído, no seio de uma solução de fraca força iónica. As amostras de DNA foram posteriormente recuperadas, da coluna GFX, numa forma concentrada, através da eluição das mesmas, com 50 µL de água ou solução tampão. Após todo este procedimento as amostras foram guardadas a -20 °C, para posteriormente serem enviadas para sequenciação. A metodologia associada à sua realização encontra-se detalhadamente descrita no respectivo kit [11].

A etapa de sequenciação de cada uma das bandas, *single primer extension*, foi concretizada pela entidade STAB VIDA, Investigação e Serviços em Ciências Biológicas, Lda., responsável por executar a determinação da ordem exacta dos nucleótidos, existentes em diferentes posições, numa sequência do gene 16S rRNA a analisar, recorrendo para isso, a sequenciadores automáticos, onde a etapa de leitura do gel e a de processamento sequencial, são realizadas, através de *software* informático. A sequenciação foi, assim, concretizada, mediante o fornecimento do *primer 518 reverse*, contudo, o *primer* fornecido para a sequenciação deveria ter sido o *27 forward*, mas, por lapso, foi enviado o 518R, mas esta troca, não acarretou problemas na sequenciação. Após recepção dos resultados, identificou-se o género e/ou espécie microbiológica em causa, dos vários produtos de PCR obtidos, por comparação com bases de dados mundiais, disponíveis na Internet [37].

Tabela 17 - Produtos de PCR, *primer* fornecido, sequência usada na comparação, % de similaridade, gênero e /ou espécie microbiológica identificada e origem [37]

Produtos de PCR	<i>Primer</i> fornecido	Sequência usada na comparação	% de Similaridade*	Gênero e/ou Espécie Microbiológica Identificada	Origem
1	518R	²¹ TCTTAGGTACCGTCATGACCCGGGGATATTAGCC CCAGGCTTTTCGTTCCGTACAAAAGCAGTTTACAAC CCGAGGGCCTTCATCCTGCACGCGGCATTGCTGG ATCAGGCTTTGCCCATTGTCCAAAATTCCCCCTG CTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTC CCAGTGTGGCTGGTCGTCTCAGACCAGCTACA GATCGCAGGCTTGGTAAGCCTTTACCCCACTAACT ACCTAATCTGCCATCAGCCGCTCTAGTAGCACAAG GCCCGAAGGTCCCCTGCTTTTCATCCGTAGATCTCA TGCGGTATTAGCTACTCTTTTCGAGTAGTTATCCCC ACTACTAGGCACGTTCCGATGTATTACTCACCCGTT CGCCACTCGTCAGCATCCGAAGACCTGTTACCGTT CGACTTGATGTGTAAAGCATGCCGCCAGCGTTCA ATCTGACGG ⁴⁸⁸	99	<i>Comamonas testosteroni</i>	Bactéria que degrada <i>taurocholate</i>
2	518R	²⁶ TAGTACCTTCAGCTACCCTCACGAGGGTAGGTTT ATCCCTATACAAAAGAAGTTTACAACCCATAGGGCA GTCGTCTTCACGCGGGATGGCTGGTTCAGGCTTG CACCCATTGACCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCC GTAGGAGTCTGGTCCGTGTCTCAGTACCAGTGTGG GGGATCACCCCTCTCAGGCCCCCTAAAGATCATCGC CTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATCTT GCGCGTGCCCATCTCTATCCGCCGGAGCTTTCAAT ATTAATTGATGCCAATCAATATGTTATGGAGTATTAA	99	<i>Flavobacteriaceae</i> WHO 32	Bactéria isolada de comunidades microbianas de um fermentador metanogénico

		TCTTCCTTTTCGAAAGGCTATCCCCCAGATAAAGGCA GGTTGCACACGTGTTCCGCACCCGTACGCCGCTCT CTCATTTCGAAGAAACAATACCGCTCGGCTTGCAT GTGTTAGGCCTCCCGCTAGCGTTCATCCTGGCGG ⁴⁸ 6			
3	518R	²⁶ CTGGTACCGTCAAGCTCCTTAGATAAGAAGTGTTT CGTCCCAGATAAAAGAAGTTTACAACCCAGAGGGC ATTCATCCTCCACGCGGCATGGCTGGTTCAGACTT GCGTCCATTGACCAATATTCCTTACTGCTGCCTCCC GTAGGAGTCGGGCCCGTGTCTCAGTGCCCGTGTG ACTGGTCGCGCTCTCACGCCAGTTACTGATCGTCG GCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTACCTAATC AGACGCACGCCCATCTTCAAGTGATAAATCTTTAAA TGCTGTCTCATGCGAGACTACATTCCTATGGGGTAT TAATCCAAATTTCTCTGGGCTATTCGCCGCTTGAAG GAAGGTTGCGTACGTGTTCCGCACCCGTTTGCCGG TCGCCACCCAGTATTGCTACCTGTGCTGCCCTCG ACTTGCATGTATTAGGCCTGCCGCTAGCGTTCATC CTGGCGG ⁴⁹²	100	<i>Chitinophaga terrae</i>	Bactéria isolada de um solo
4	518R	^{5A} TTTAGCCGGTGCTTTACTCTGCAGTTACCGTCAG TTTCCGCGGGGTATTAACCCGCGACGTTTTCTTTCC TGCCAAAAGTGCTTTACAACCCGAAGGCCTTCATC GCACACGCGGGATGGCTGGATCAGGGTTTCCCCC ATTTGTCCAAAATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAG GAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCTG GTCGTCTCTCAAACCAGCTACGGATCGTCGCCTT GGTGAGCCGTTACCCACCAACTAGCTAATCCGAT ATCGGCCGCTCCAATAGTGCAAGGTCTTGCGATCC CCTGCTTTCCCCCGTAGGGCGTATGCGGTATTAGC TACGCTTTCGCGTAGTTATCCCCCGCTACTGGGCA	98	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	Isolado de bactérias termófilas e acidófilas do mar Sea

		CGTTCCGATACACTACTCACCCGTTGCGCACTCGC CACCAGACCGAAGTCCGTGCTGCCGTTGACTTGC ATGTGTAAGGCATCCCGCTAGCGTTCAATCTGAGC GG ⁴⁹⁷			
5	518R	²¹ TCTTCCGGTACAGTCATTATCTTCCCGGACAAAAG AGCTTTACAACCCTAAGGCCTTCATCACTCACGCG GCATGGCTGGATCAGGCTTGCGCCCATTGTCCAAT ATTCCCCTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCC GTGTCTCAGTCCCAATGTGGCNTGATCATCCTCTC AGACCAGCTACTGATCGTCGCCTTGGTGAGCCTTT ACCTCACCAACTAGCTAATCAGACGCGGGCCGATC TATCGGCGATAAATCTTTCCCCAAAGGGCGTATC CGGTATTAGTCCAAGTTTCCCTGAATTATTCCGAAC CGAAAGGTACGTTCCACGTGTTACTCACCCGTCT GCCACTAGCACCGAAGTGCCCGTTGACTTGCATG TGTTAAGCCTGCCGCCAGCGTTGCTCTGAGCGA ⁴⁴ 2	99	<i>Bosea thiooxidans</i>	Bactéria cultivável do intestino de <i>Cylindrojulus</i>
6	518R	⁷⁰ TTTCGTTTCCGTACAAAAGCAGTTTTACAACCCGA GGGCCTTCATCCTGCACGCCGGCATCTGCTGGATC AGGCTTTCGCCATTTGTCCAAAATCTCCCCACTGC TTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTC CCAGTGTGGCTGGTCGTCCTCTCAGACCAGCTACA GATCGCAGGCTTGGTAAGCCTTTACCCCACTA ACCTAATCTGCCATCAGCCGCTCTAGTAGCACAAG GCCCGAAGGTCCCCTGCTTTCATCCGTAGATCTCA TGCGGTATTAGCTACTCTTTCGAGTAGTTATCCCC ACTACTAGGCACGTTCCGATGTATTACTCACCCGTT CGCCACTCGTCAGCATCCGAAGACCTGTTACCGTT CGACTTGCATGTGTAAAGCATGCCGCCAGCGTTCA ATCTGGAG ⁵⁰²	98	<i>Comamonas testosteroni</i>	Bactéria que degrada taurocholate

7	518R	²¹ TCTTAGGTACCGTCATGGACCCCAGGTATTAACC AGAGTCTTTTCGTTCCGTACAAAAGCAGTTTACAAC CCGAAGGCCTTCATCCTGCACGCGGCATGGCTGG ATCAGGCTTTTCGCCATTGTCCAAAATTCCCCCTG CTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTC CCAGTGTGGCTGGTCGTCCTCTCAGACCAGCTACA GATCGTCGGCTTGGTAAGCTTTTATCCCACCAACTA CCTAATCTGCCATCGGCCGCTCCGTTTCGCGCAAGG CCTTGCGGTCCCCTGCTTTCATCCGTAGATCGTAT GCGGTATTAGCAAAGCTTTCGCTTCGTTATCCCCCA CGATCGGGCACGTTCCGATGTATTACTACCCGTT CGCCACTCGTCAGCATCCGAAGACCTGTTACCGTT CGACTTGCATGTGTAAGGCATGCCGCCAGCGTTCA ATCTGGCGG ⁴⁸⁸	99	<i>Acidovorax temperans</i>	Desconhecida
---	------	--	----	---------------------------------	--------------

* -% de Similaridade é estimada entre a sequência seleccionada e a sequência identificativa de uma espécie microbiológica específica, existente na base de dados mundiais

9.8.13. Congelamento dos vários Isolados

Para o congelamento dos vários isolados de bactérias, preparou-se um meio de congelamento. Este meio a 15 % (v/v) era constituído por meio LB a 30 % (v/v) e glicerol também a 30 % (v/v). Na sua preparação, para um volume final de 50 ml, num frasco Schott, pesaram-se 1 g de triptona, 0,5 g de extracto de levedura e 1 g de NaCl, que se diluíram em 50 mL de água destilada. A outro frasco Schott, para um volume final de 50 mL, adicionou-se 17,24 mL de glicerol que se diluíram em 32,76 mL de água destilada, ambos os frascos Schott foram colocados em autoclave, a 121 °C e 1,2 bar, durante 15 min. Após o arrefecimento, ao primeiro frasco Schott preparado, adicionou-se a solução de glicerol a 30%, obtendo-se um meio final de congelamento a 15 %. Todo este procedimento efectuou-se em ambiente asséptico à chama do bico de Bunsen.

Em seguida, para tubos *Eppendorf* estéreis e com a ajuda de uma micropipeta e uma ponta estéril, adicionaram-se 700 µL de meio de congelamento a cada um deles. Para cada uma das placas de PCA, que continham os diversos isolados frescos, seleccionados, crescidos e puros, com a ajuda de uma ansa estéril, recolheu-se toda a biomassa para os tubos *Eppendorf* que continham o meio de congelamento. As amostras foram congeladas em duplicado, a -80 °C. Todo este procedimento efectuou-se em ambiente asséptico, à chama do bico de Bunsen.

9.9. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

A cromatografia envolve uma série de processos de separação de misturas e identificação dos seus componentes. A cromatografia dá-se pela passagem de uma mistura através de duas fases: uma estacionária ou fixa e outra móvel. A grande variabilidade de combinações entre a fase móvel e estacionária faz com que a cromatografia tenha uma série de técnicas diferenciadas. A separação observada depende da diferença entre o comportamento dos analitos e das substâncias que são separadas durante a cromatografia, entre a fase móvel e a fase estacionária. A interação dos componentes da mistura com estas duas fases é influenciada por diferentes forças intermoleculares, incluindo iónica, bipolar, apolar e específicos efeitos de afinidade e solubilidade.

De acordo com o sistema cromatográfico, a cromatografia divide-se em coluna e planar. Na cromatografia em coluna tem-se a cromatografia líquida, gasosa e supercrítica e na planar tem-se a cromatografia centrífuga, em camada fina e em papel. De acordo com a fase móvel, pode utilizar-se gás, líquido ou líquido pressurizado e de acordo com a fase estacionária, esta pode ser líquida, sólida ou estar quimicamente ligada. O modo de separação na cromatografia dá-se por adsorção, partição ou permuta iónica.

A cromatografia em coluna é a técnica de separação, mais vulgarmente utilizada e nesta, a fase estacionária dá-se dentro de um tubo. Utiliza-se uma coluna de vidro aberta na parte superior e nesta encontra-se uma torneira na extremidade inferior, por onde sai o líquido eluído. Dentro da coluna encontra-se a fase estacionária constituída por um enchimento sólido, no caso da cromatografia de absorção, ou por uma fase líquida, no caso da cromatografia de partição, sendo a fase móvel líquida, em ambos os casos e a ordem das substâncias dependerá da sua polaridade.

A cromatografia líquida de alta eficiência ou pressão, HPLC é um tipo de cromatografia em coluna, utilizada frequentemente em bioquímica e química analítica, etc. No HPLC, usado com um método isocrático, o composto passa pela coluna cromatográfica, através da fase estacionária, mediante a aspiração de líquido (fase móvel) a alta pressão, através da coluna. A amostra a analisar é introduzida, em pequenas quantidades e os seus componentes separam-se, diferencialmente, dependendo das interações químicas e físicas com a fase estacionária, à medida que percorrem a coluna.

O tempo de retenção dos componentes da amostra depende da natureza do composto e da composição da fase estacionária e móvel. Este tempo de retenção define-se como o tempo, que demora um composto a ser eluído, da coluna. É considerado, como uma propriedade característica identificativa de um composto, numa determinada fase móvel e estacionária. A utilização de pressão, neste tipo de cromatografia, aumenta a velocidade linear dos compostos dentro da coluna e reduz, assim, a difusão dentro da mesma,

melhorando a eficiência da técnica. Os solventes mais vulgarmente utilizados são água, metanol e acetonitrilo.

O diâmetro interno de uma coluna de HPLC é um aspecto crítico que determina a quantidade de amostra que se pode injectar na coluna e também influencia a sua sensibilidade, outros parâmetros como a medida das partículas, o tamanho de poros da fase estacionária, assim como a pressão das bombas usadas, que variam segundo o modelo e o fabricante, medindo-se o seu rendimento, através da existência de um fluxo constante e reprodutível, são também aspectos críticos, que influenciam a quantidade de amostra a injectar [12, 15, 18, 20, 26].

9.9.1. Quantificação da Ciprofloxacina

A quantificação da ciprofloxacina realizou-se através do uso da cromatografia líquida de alta eficiência, HPLC. Utilizou-se um aparelho de HPLC Beckman, automatizado e equipado com um módulo detector UV-Visível. O *software* usado foi o System Gold (V6.0 Beckman, USA). A coluna usada foi uma Chromolith^R Performance RP-18 e 100-3 nm. A fase móvel era constituída por um solvente A com 0,1 % de ácido fórmico e um solvente B com 0,1 % de ácido fórmico em acetonitrilo. Ambas as soluções foram filtradas e degaseificadas antes de se proceder à análise. O comprimento de onda usado foi de 280 nm e o método de análise foi isocrático e consistiu na utilização de 30 e 70 % de eluente A e B, respectivamente. O tempo de corrida foi de 10 min a um caudal de 1,2 mL/min e a uma pressão aproximadamente constante de 1,6 Kpsi.

Para a quantificação da ciprofloxacina, das diversas amostras em HPLC, foi necessário, fazer uma curva de calibração, com concentrações crescentes do antibiótico e sendo assim, preparam-se padrões de concentração entre 1 e 10 mg/L. Estes padrões foram filtrados e analisados, antes de se proceder à análise das diversas amostras.

Tabela 18 - Diferentes padrões usados para a curva de calibração da ciprofloxacina e respectivas áreas de pico

Concentração dos padrões (mg/L)	Área do pico
1,0136	121145
2,0272	211111
5,068	443187
10,136	1129997

De seguida construiu-se o gráfico representativo da recta de calibração da ciprofloxacina, representando-se, no eixo das abcissas, a concentração dos vários padrões, em mg/L e no, eixo das ordenadas, as áreas de pico correspondentes.

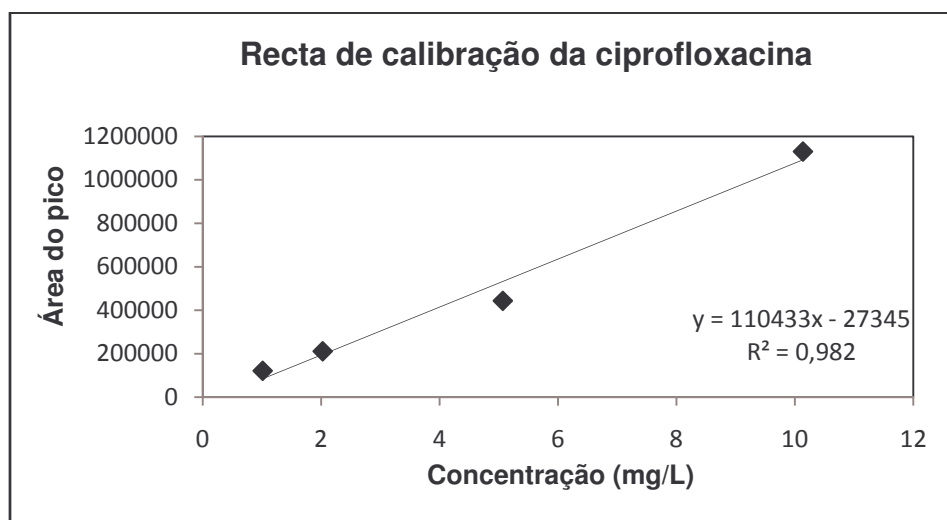


Figura 41 - Recta de calibração da ciprofloxacina

As diversas amostras foram recolhidas, ao longo dos vários enriquecimentos, efectuados semanalmente durante todo o trabalho experimental e para tal, nos diversos tempos zero, identificados no momento em que se fazia a transferência do enriquecimento para meio fresco e nos diversos tempos finais, após sete dias de incubação, a 30 °C e 120 rpm, retiravam-se amostras dos diversos enriquecimentos, nos dois tempos, para posterior análise em HPLC. As amostras eram retiradas com uma ponta estéril e após agitação do conteúdo dos diversos *erlenmeyers* dos enriquecimentos e com a ajuda de uma micropipeta, retirava-se 1 mL de amostra, que se colocava num tubo *Eppendorf* estéril, centrifugava-se, a 14.000 rpm, durante 10 minutos e posteriormente, novamente com uma ponta, neste caso, lavada e a ajuda de uma micropipeta, retirava-se todo o sobrenadante para um novo tubo *Eppendorf* e rejeitava-se o *pellet*. As diversas amostras foram sendo guardadas a -20 °C.

As amostras analisadas no HPLC foram as últimas amostras de enriquecimento efectuado, tanto para as amostras de água residual afluyente como de lammas activadas. Posteriormente, surgiu a dúvida se a degradação do antibiótico era feito por organismos cultiváveis ou se por outros que estão no meio líquido, mas que não crescem nos meios sólidos e para isso, quando a percentagem de células resistentes atingiu os 100 %, terminaram-se os enriquecimentos, mas fez-se pela última vez a filtração, através do uso da técnica das membranas filtrantes, das amostras de água residual afluyente e lammas activadas e após o período de incubação de 48 h, procedeu-se à

enumeração da população microbiana total e resistente e à extracção de heterotróficos e posteriormente, depois da obtenção de um *pellet* num tubo *Eppendorf* estéril, este procedimento da obtenção do *pellet* foi referido anteriormente, adicionaram-se assim, 200 µL de solução salina a 0,85 % estéril, ressuspendeu-se o conteúdo do tubo *Eppendorf* e retiraram-se 50 µL de cada uma das várias amostras da extracção de DNA da população heterotrófica, obtida, em meio PCA e meio PCA com ciprofloxacina. Ou seja, no total, inoculou-se um *erllenmeyer* estéril que continha 20 mL de meio mínimo e uma quantidade calculada de ciprofloxacina, de modo a perfazer uma concentração de 250 mg/L e adicionaram-se 200 µL de inóculo (4×50 µL), das várias amostras da extracção de heterotróficos obtida em meio PCA (no final dos enriquecimentos efectuados ao longo do trabalho obteve-se uma amostra, em duplicado, de água residual afluyente e uma amostra, em duplicado de lamas activadas, 4 amostras no total).

Todo o procedimento foi análogo para as várias amostras de extracção de heterotróficos, obtida, em meio PCA com ciprofloxacina e todo este procedimento, foi também realizado em ambiente estéril à chama do bico de Bunsen. Ambos os *erllenmeyers* foram colocados em incubação a 30 °C e 120 rpm, durante 7 dias. Ao fim de uma semana, a cada um dos *erllenmeyers*, com uma ponta estéril e após agitação do conteúdo e com a ajuda de uma micropipeta, retirou-se 1 mL de amostra, que se colocou num tubo *Eppendorf* estéril, centrifugou-se, a 14.000 rpm, durante 10 min e posteriormente, novamente com uma ponta, neste caso, lavada e a ajuda de uma micropipeta, retirou-se todo o sobrenadante para um novo tubo *Eppendorf* e rejeitou-se o *pellet*. As diversas amostras foram guardadas a -20 °C. As amostras da extracção de heterotróficos, obtidas em meio PCA foram designadas de A e as restantes de B.

Para termos a certeza que o antibiótico não se degradava após os sete dias de incubação, foi efectuado um controlo abiótico. Este controlo foi efectuado da seguinte forma: num *erllenmeyer* estéril, adicionou-se um inóculo de 2 mL de água estéril, a 18 mL de meio mínimo e uma quantidade calculada de ciprofloxacina, de modo a perfazer uma concentração de 250 mg/L. Este *erllenmeyer* foi colocado a incubar a 30 °C e 120 rpm, durante 7 dias. Após sete dias, com uma ponta estéril e após agitação do conteúdo do *erllenmeyer* e com a ajuda de uma micropipeta, retirou-se 1 mL de amostra, que se colocou num tubo *Eppendorf* estéril, centrifugou-se, a 14.000 rpm, durante 10 min e posteriormente, novamente com uma ponta, neste caso, lavada e a ajuda de uma micropipeta, retirou-se todo o sobrenadante, para um novo tubo *Eppendorf* e rejeitou-se o *pellet*. As duas amostras de controlo abiótico, tempo inicial e tempo final foram guardadas a -20 °C.

Na análise das diversas amostras foi necessário diluí-las 100 vezes, dado que se conhecia a concentração de antibiótico adicionado às várias amostras, que era de, aproximadamente, 250 mg/L e o aparelho de HPLC detectava amostras na gama de 1 a 10 mg/L. Assim sendo, para cada uma das amostras,

retirou-se 10 μL desta, que se diluíram em 990 μL de água ultra pura. As amostras obtidas ficaram assim, com concentrações de antibiótico, na ordem dos 2,5 mg/L. Após se efectuarem as diluições necessárias, todas as amostras foram filtradas e começou por se injectar no aparelho de HPLC as amostras por ordem crescente de concentração, ou seja, injectaram-se em primeiro lugar as amostras correspondentes aos tempos finais pela ordem de: controlo abiótico, seguindo-se as amostras de água residual afluyente, lamas activadas e por último as amostras A e B. Entre cada injeção de amostra era necessário lavar a coluna, com água ultra pura e no final do ensaio, lavou-se mais uma vez a coluna, com água ultra pura durante aproximadamente 30 min, para que nenhum vestígio permanecesse no seio da mesma.

Tabela 19 - Resultados da quantificação, em HPLC, das diversas amostras, em termos de área do pico e concentração, nos tempos iniciais e finais e percentagem de redução

Amostras	Área do pico		Concentração obtida (mg/L)		Concentração média obtida (mg/L)		Concentração usada (mg/L)	Percentagem de Redução (%)
	t _{inicial}	t _{final}	t _{inicial}	t _{final}	t _{inicial}	t _{final}		
Controlo abiótico 1	249700	235670	2,51	2,38	251,37	237,31	252,13	5,59
Controlo abiótico 2	250801	233779	2,52	2,36				
Água residual afluyente 1	249781	193070	2,51	2,00	268,08	219,44		18,14
Água residual afluyente 2	287631	236914	2,85	2,39				
Lamas activadas 1	243622	235764	2,45	2,38	246,29	235,65		4,32
Lamas activadas 2	245667	230008	2,47	2,33				
A	225971	207723	2,29	2,13	229,43	213,42		6,98
B	241919	213883	2,44	2,18	244,56	218,49		218,49

Nota: A concentração média obtida calculou-se multiplicando a concentração obtida pelo factor de diluição de 100 vezes e fazendo a média aritmética entre as duas amostras, a percentagem de redução calculou-se fazendo a subtração entre 100 % e o quociente entre a concentração média obtida, no tempo final, pela concentração média obtida, no tempo inicial. O resultado do quociente multiplicou-se por 100 % para ser apresentado em percentagem.