

PREVALÊNCIA DE BACTÉRIAS RESISTENTES A ANTIMICROBIANOS EM ÁGUA NATURAL

DANIELA SOFIA COSTA GOMES PORTUGAL

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM ENGENHARIA QUÍMICA APRESENTADA
À FACULDADE DE ENGENHARIA DA UNIVERSIDADE DO PORTO EM
ÁREA CIENTÍFICA

Mestrado Integrado em Engenharia Química

Prevalência de bactérias resistentes a antimicrobianos em água natural

Tese de Mestrado

de

Daniela Sofia Costa Gomes Portugal

Desenvolvida no âmbito da unidade curricular de Dissertação

Orientador na FEUP: Prof.^a Olga Nunes

Orientador na empresa: Dr.^a Margarida Valente



Departamento de Engenharia Química

julho de 2015

Agradecimentos

A elaboração deste trabalho não teria sido possível sem a colaboração de pessoas a quem amavelmente quero agradecer a sua contribuição.

O escrever desta tese de mestrado é o culminar de cinco anos de estudo árduo. Após a passagem por diversas dificuldades, quero agradecer aos meus pais e ao meu irmão por todo o amor, carinho, preocupação, esforço, apoio incondicional e incentivo na busca do conhecimento. Sem eles tudo seria mais difícil, por isso este trabalho é dedicado a vocês que tanto se dedicam a mim.

Um obrigada especial à Dr.^a Margarida Valente, pela possibilidade de realizar este trabalho no seu grupo, por me ter ajudado, ensinado e motivado todos os dias, pela sua prontidão e disponibilidade.

A todos os colegas de trabalho do laboratório que de uma forma ou outra colaboraram neste projeto. Não posso deixar de agradecer ao Manuel Carneiro, à Carolina Tavares e à Joana Leal por toda a paciência, ajuda e colaboração diária nas tarefas. Obrigada por proporcionarem dias de trabalho sempre animados e divertidos, tornaram-se sem dúvida amigos. Foi um prazer conhecer-vos e trabalhar convosco!

Aproveito também para agradecer à Eng.^a Rita Reis por todo o apoio e auxílio no processo necessário para a realização deste trabalho.

À minha orientadora Prof.^a Doutora Olga Nunes, agradeço-lhe por todo o seu apoio, disponibilidade e orientações que foram fundamentais para a conclusão deste trabalho.

Este trabalho enquadrou-se no âmbito dos projeto Projeto UID/EQU/00511/2013-LEPABE, pela FCT/MEC através de fundos nacionais e quando aplicável cofinanciado pelo FEDER, no âmbito do Acordo de Parceria P2020 e do Projeto NORTE-07-0124-FEDER-000025 - RL2_Environment&Health, por Fundos FEDER através do Programa Operacional Factores de Competitividade - COMPETE, através do Programa Operacional do Norte (ON2) e por Fundos Nacionais através da FCT - Fundação para a Ciência e a Tecnologia.

Agradeço também à Professora Célia Manaia por me ter recebido no seu laboratório e a todos os colegas do Laboratório da Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica do Porto, Cristina Castro, Ivone Moreira, Ana Rita Varela, Carlos Narciso da Rocha, Gonçalo Almeida e Rui Magalhães por toda a ajuda, indicações e conselhos, companheirismo e boa disposição.

Aos amigos e colegas de faculdade, que me acompanharam durante estes cinco anos e foram cruciais para a conclusão do mesmo. Em especial à Ana Pinto o meu muito obrigada por me acompanhares neste sonho desde o início e partilhares comigo as conquistas, por me incentivares a não desistir nas dificuldades e momentos mais difíceis deste percurso.

Aos meus amigos de sempre, em especial, à Sílvia Navega, Luísa Novais, Ana Leal e Tiago Pereira por todas conversas, incentivos e conforto nas horas de desânimo e paciência demonstradas.

A todos que de alguma forma contribuíram para este trabalho o meu muito obrigada!

Resumo

A água é um recurso essencial à vida. É indispensável para o bem-estar da humanidade e para a sobrevivência e manutenção das funções e integridade dos ecossistemas. Como elemento da Natureza contém uma grande diversidade e quantidade de organismos, podendo constituir uma via de transmissão de organismos potencialmente perigosos. Entre estes, encontram-se os patogénicos e as bactérias resistentes a antibióticos. De facto, tem-se vindo a assistir a um número crescente de infeções provocadas por bactérias resistentes a antibióticos, que se traduz num alarmante aumento da morbilidade e mortalidade a nível global.

O principal objetivo deste trabalho foi determinar a prevalência de *Staphylococcus* resistentes a antibióticos e metais em água natural. As colheitas de água foram realizadas no Rio Paiva entre o mês de março e abril de 2015. A pesquisa, quantificação e isolamento dos *Staphylococcus* foram realizadas pelo método de filtração por membrana, usando meio de cultura seletivo (Mannitol Salt Agar) e no mesmo meio suplementado com 1 mg/L de tetraciclina, ou 1 mM de sulfato de zinco ou 1 mM de sulfato de cobre pentahidratado. Para a identificação ao nível de espécie, recorreu-se à análise e sequenciação do gene que codifica o 16S rRNA através de PCR, técnica também utilizada para a deteção do gene *mecA*. A suscetibilidade das estirpes relativamente a várias classes de agentes antimicrobianos foi testada pelo método de difusão em agar.

Os meios seletivos permitiram enumerar presuntivamente *Staphylococcus* na água do rio, sendo que o meio MSA foi o que permitiu obter um maior número de UFC típicas por 100 mL de água e o meio suplementado com tetraciclina foi o que apresentou um menor número de UFC típicas por 100 mL. Os meios enriquecidos com soluções metálicas apresentaram crescimento de UFC típicas por 100 mL na ordem de grandeza do meio MSA.

Foram examinados um total de 56 isolados do meio MSA, 64 isolados em meio MSA suplementado com tetraciclina, 48 do meio MSA suplementado com sulfato de zinco e 59 do meio MSA suplementado com sulfato de cobre pentahidratado. Destes isolados, apenas 17% (39/227) foram confirmados como *Staphylococcus*. A maioria dos isolados de *Staphylococcus* foram identificados como não produtores de coagulase (97%). O meio que recuperou mais *Staphylococcus* foi o meio MSA+TET 28% (18/64) e o meio MSA+Zn recuperou apenas 10% de *Staphylococcus* (5/48). Os *Staphylococcus* isolados foram identificados como pertencendo a nove espécies, sendo as mais frequentes *S. saprophyticus* (36%) e *S. cohnii* (16%). A resistência à tetraciclina e à eritromicina foi observada em 56% e 28% dos isolados, respectivamente. O gene *mecA* foi detectado apenas num isolado, que foi susceptível aos beta-lactâmicos testados. O único isolado produtor de coagulase (*S. aureus*) não apresentou qualquer fenótipo de resistência.

Palavras Chave (Tema): Água, *Staphylococcus*, antibióticos, metais, resistência bacteriana.

Abstract

Water is an essential resource for life. It is crucial for the well-being of humanity as well as the survival and maintenance of the integrity and function of ecosystems. As an element of Nature, water holds a great number and vast diversity of life forms, thus making it a potential source of transmission of dangerous organisms. Among these threatening organisms, are pathogenic and antibiotic-resistant bacteria. In fact, we have been witnessing a rapidly increasing number of infections caused by antibiotic-resistant bacteria, which represents an alarming increase in morbidity and mortality, globally.

The main aim of this study was to determine the prevalence of antibiotic and metal resistant *Staphylococcus* in fresh water. Water samples were collected from the Rio Paiva between March and April of the present year. The research, quantification and isolation of *Staphylococcus* were performed by the Membrane Filtration method, using a selective medium (Mannitol Salt Agar). Each media was then supplemented with 1 mg/L tetracycline, or 1 mM zinc sulfate or 1 mM copper sulfate pentahydrate. In order to obtain a species-level identification, a polymerase chain reaction was performed, thus analyzing and sequencing the gene encoding 16S rRNA. This technique was also used to detect the *mecA* gene. The susceptibility of the strains in regards to the various classes of antimicrobial agents was tested by the agar diffusion method. The selective media allowed us to list the *Staphylococcus* present in the river; the MSA medium lead to the appearance of a higher number of CFU per 100 ml of water, and the medium supplemented with tetracycline had the fewer CFU per 100 ml. The medium enriched with the metallic solutions exhibited almost the same number of CFU per 100 mL as the MSA medium.

We examined a total of 56 isolates in the MSA medium, 64 isolates in the MSA medium supplemented with tetracycline, 48 isolates in the MSA medium supplemented with zinc sulfate and 59 isolates of MSA medium supplemented with copper sulfate pentahydrate. Of these isolates, only 17% (39/227) were confirmed as *Staphylococcus*. Most staphylococcal isolates were identified as coagulase-negative (97%). The medium in which more *Staphylococcus* species were recovered was the 28% MSA+TET medium (18/64), whilst the MSA+Zn medium recovered only 10% of *Staphylococcus* (5/48). The *Staphylococcus* isolates were identified as belonging to nine different species, the most frequent being *S. saprophyticus* (36%) and *S. cohnii* (16%). Resistance to tetracycline and erythromycin was observed in 56% and 28% of these isolates, respectively. The *mecA* gene was detected in only one isolate, as it was susceptible to the beta-lactam testing. The only coagulase producing isolate (*S. aureus*) displayed no phenotypic resistance.

Key-words: Water, *Staphylococcus*, antibiotic, metals, antimicrobial resistance.

Declaração

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

Daniela Sofia Costa Gomes Portugal

Índice

1	Introdução.....	1
1.1	Enquadramento e Apresentação do Projeto	1
1.2	Ciclo urbano da água	2
1.3	Bacia Hidrográfica do rio Paiva.....	3
1.4	Antibióticos	5
1.4.1	Inibidores da síntese da parede celular bacteriana	6
1.4.2	Inibidores da síntese proteica nos ribossomas	7
i.	Tetraciclinas	7
1.4.3	Inibidores da síntese de ácidos nucleicos	8
1.4.4	Inibidores da função da membrana citoplasmática	8
1.5	Metais	9
1.5.1	Cobre	9
1.5.2	Zinco	10
1.6	Resistência Bacteriana aos Antibióticos	10
1.6.1	Resistência natural	11
1.6.2	Resistência adquirida.....	11
1.6.3	Mecanismos de resistência.....	13
1.7	Género <i>Staphylococcus</i>	14
1.8	Contributos do Trabalho.....	16
1.9	Organização da Tese	16
2	Materiais e Métodos	17
2.1	Quantificação de <i>Staphylococcus</i>	17
2.1.1	Colheita das amostras	17
2.1.2	Preparação dos meios de cultura	17
2.1.3	Método analítico	18
2.2	Isolamento e Identificação de <i>Staphylococcus</i>	19
2.2.1	Confirmação Bioquímica de <i>Staphylococcus</i>	19

2.2.2	Extração de DNA	21
2.2.3	Amplificação do gene que codifica o rRNA 16S	22
2.2.4	Purificação, sequenciação e análise do gene 16S rRNA	23
2.3	Determinação da resistência a antibióticos	24
2.4	Deteção do gene <i>mecA</i>	26
3	Resultados e Discussão	27
3.1	Enumeração de <i>Staphylococcus</i>	27
3.2	Efeito da precipitação, turvação e temperatura da água	29
3.3	Isolamento e Identificação de <i>Staphylococcus</i>	31
3.4	Determinação da resistência a antimicrobianos	35
3.5	Deteção do gene <i>mecA</i>	39
4	Conclusões	41
4.1	Objectivos Realizados	42
4.2	Limitações e Trabalho Futuro	42
4.3	Apreciação final	43
	Referências	44
Anexo 1	Espécies do género <i>Staphylococcus</i>	51
Anexo 2	Equipamento e material	56
2.1	Quantificação de <i>Staphylococcus</i>	56
2.2	Amplificação, sequenciação e purificação do gene 16S rRNA	57
Anexo 3	Dados de precipitação, turvação e temperatura da água	58
Anexo 4	Resultados das contagens	60
Anexo 5	Dados da caracterização fenotípica dos isolados	68

Índice de Figuras

Figura 1: Bacia Hidrográfica do Rio Paiva e afluentes.	3
Figura 2: Classes de ocupação do solo por sub-bacia, 2006.....	4
Figura 3: Mecanismos de ação dos antibióticos nas bactérias.	6
Figura 4: Estrutura química dos B-lactâmicos.....	6
Figura 5: Mecanismos utilizados pelas bactérias para impedir a ação dos antibióticos.....	11
Figura 6: Modelo de formação do biofilme.	16
Figura 7: Processo de filtração por membrana..	18
Figura 8: Colónias amarelas típicas para <i>Staphylococcus</i>	19
Figura 9: Processo para extração de DNA.	22
Figura 10: Antibiógrama de uma estirpe bacteriana pelo método de difusão por discos.....	25
Figura 11: Fotografias das placas da colheita de 30 de março após 48 h de incubação.	60
Figura 12: Variação da turvação e temperatura média da água nos meses em que decorreu o estudo.	29
Figura 13: Variação do número de UFC típicas por 100 mL de água com a turvação.	30
Figura 14: Variação do número de UFC típicas por 100 mL de água com a temperatura da água.	31
Figura 15: Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de PCR de alguns isolados.....	32
Figura 16: Distribuição das diferentes espécies de <i>Staphylococcus</i> para cada meio em estudo.	34
Figura 17: Gel de agarose 1,5% resultante do PCR para deteção da banda característica para o gene <i>mecA</i> (banda 310 pb).....	40

Índice de Tabelas

Tabela 1: Necessidades hídricas para usos consumptivos, em ano médio, por sub-bacia	4
Tabela 2: Diferentes espécies de <i>Staphylococcus</i> , hospedeiros e principais infecções.	51
Tabela 3: Espécies de <i>Staphylococcus</i> patogênicos para o Homem.	15
Tabela 4: Zonas de inibição para diferentes tipos de agentes antimicrobianos.	25
Tabela 5: Número de UFC típicas / 100 mL de água para cada um dos meios e para cada colheita	27
Tabela 6: Percentagem de variação de UFC por mL de água em relação ao meio MSA.	28
Tabela 7: Identificação dos isolados com base na análise da sequência do gene para o 16S rRNA por consulta da base de dados da EzTaxon.	33
Tabela 8: Halos de inibição (mm) dos isolados <i>Staphylococcus spp.</i> para as diferentes classes de antibióticos.	36
Tabela 9: Variação da precipitação, turvação e temperatura da água durante o período em estudo.	58
Tabela 10: Número de colônias contabilizadas para cada dia de colheita e para cada meio. .	62
Tabela 11: Caracterização fenotípica dos isolados confirmados como <i>Staphylococcus</i>	68

Notação e Glossário

Letras gregas

λ	Comprimento de onda
β	Beta

Lista de Siglas

16S rRNA	Ácido ribonucleico ribossomal 16S
AML	Amoxicilina
CAZ	Ceftazidima
CIP	Ciprofloxacina
CLI	Clindamicina
CN	Gentamicina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ERY	Eritromicina
ETA	Estação de tratamento de água
ETAR	Estação de tratamento de água residual
KF	Cefalotina
<i>mecA</i>	Gene que codifica a proteína 2 de ligação à penicilina; confere resistência a penicilinas
MEM	Meropenem
MHA	Mueller-Hinton Agar
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
MSA	Mannitol Salt Agar
NA	Nutriente Agar
NTU	Unidades nefelométricas de turvação
pb	Pares de bases
PBP	Proteínas de ligação às penicilinas
PCA	Plate Count Agar
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEN	Penicilina
RAPD	DNA polimórfico amplificado ao acaso
rcf	Força centrífuga relativa
RH3	Região hidrográfica do Douro
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto

SXT	Sulfametoxazol
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TET	Tetraciclina
THG	Transferência horizontal de genes
TMDP	Tetrametil-p-fenilenediamina dihidrocloreto
tRNA	Ácido ribonucleico de transferência
UFC	Unidades formadoras de colônias
UV	Ultravioleta

1 Introdução

1.1 Enquadramento e Apresentação do Projeto

O género *Staphylococcus*, pertencente à família *Micrococcaceae*, faz parte da flora natural do ar, solo, água e humanos (Götz, 2006). São cocos Gram-positivos, anaeróbios facultativos, não esporulados e com capacidade de crescer em meios com elevado teor de sal (halotolerantes).

Algumas destas bactérias consideram-se como patogénicas estando na origem de infeções cutâneas e infeções oportunistas. De entre todas as espécies do género *Staphylococcus* a espécie *Staphylococcus aureus* foi a primeira a ser considerada como agente patogénico humano e é considerada a mais importante do ponto de vista clínico, não só pelos mecanismos de virulência (toxinas, enzimas, resistência aos antibióticos, entre outros) que possui, mas também pela diversidade de infeções em que geralmente se encontra envolvida (ANVISA, 2010; Alves e Lemos, 2007).

Os antibacterianos podem combater as infeções provocando a morte de bactérias, isto é, exercendo uma ação bactericida ou podem traduzir-se por uma inibição da multiplicação bacteriana, sendo a sua ação bacteriostática.

Para além dos antibióticos, outros agentes com ação bactericida e/ou bacteriostática, como os desinfetantes e alguns metais pesados têm importância para a população microbiana. Vários são os estudos que mostram haver co-seleção entre resistência a metais e a antibióticos (Baker-Austin *et al.*, 2006; Chudobova *et al.*, 2014; Gu e Karthikeyan, 2005; Malik e Aleem, 2011). A libertação de metais no ecossistema quer a partir de fontes de ocorrência natural quer a partir de atividades antropogénicas representa um problema e uma ameaça para a saúde pública devido à sua persistência e acumulação na cadeia alimentar. Alguns metais pesados traduzem-se em agentes tóxicos enquanto outros assumem-se como essenciais para o desenvolvimento dos seres vivos como o cobalto, cobre, níquel e zinco (Sengor e Gikas, 2014; Summers, 2006).

O uso abusivo de antibióticos tornou-se uma ameaça uma vez que a sua capacidade de prevenir ou tratar uma infeção bacteriana fica comprometida. Assim, nos últimos anos tem aumentado a preocupação acerca da resistência a antibióticos, sendo o seu controlo um desafio global, motivo pela qual este tema foi escolhido para ser desenvolvido.

No presente estudo pretendeu-se avaliar a prevalência de *Staphylococcus* em água natural e averiguar a sua resistência à tetraciclina e a dois metais, o cobre e o zinco. Outro objetivo do trabalho foi estudar a resistência dos isolados a doze antibióticos representativos das classes beta-lactâmicos, tetraciclina, sulfonamidas, fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e macrólidos. A colheita de amostras foi realizada no rio Paiva. As bactérias foram isoladas em meio Mannitol Salt Agar (MSA) sendo depois feita a sua confirmação morfológica, bioquímica e genotípica. Para identificar os isolados recorreu-se à sequenciação do gene que codifica o 16S rRNA, e determinou-se a prevalência do gene de resistência *mecA*, que codifica proteínas de ligação às penicilinas.

1.2 Ciclo urbano da água

A água é um bem essencial para a vida, devendo estar garantida de forma segura e sustentável a todos (WHO, 2011). Segundo o Decreto-Lei n.º 306/2007 a água destinada para consumo humano é “Toda a água no seu estado original, ou após tratamento, destinada a ser bebida, a cozinhar, à preparação de alimentos, à higiene pessoal ou a outros fins domésticos, independentemente da sua origem e de ser fornecida a partir de uma rede de distribuição, de um camião ou navio-cisterna, em garrafas ou outros recipientes, com ou sem fins comerciais”.

Globalmente, estima-se que 2,5 mil milhões de pessoas careçam de saneamento adequado e mais de 700 milhões de pessoas não têm acesso a água potável (WHO, 2014). Mecanismos de formação e ações para uma melhor utilização racional dos recursos hídricos do nosso planeta são essenciais uma vez que, se não houver um melhor controlo deste bem natural a procura será cada vez maior do que a demanda.

A água destinada ao consumo é captada nos rios, lagos ou lençóis freáticos, podendo ser submetida apenas a uma desinfecção final ou ser transportada até às Estações de Tratamento de Água (ETA). As ETA são o local onde se produz água potável a partir de água bruta sendo o processo de tratamento dependente da origem e das características da água bruta. O processo de tratamento numa ETA pode englobar diversas etapas como sedimentação, coagulação/floculação, filtração e desinfecção.

O processo de sedimentação tem como principal objetivo a remoção de areias e outros sólidos sedimentáveis. Na coagulação, as partículas coloidais são neutralizadas e aglutinadas em partículas de maiores dimensões (maior volume e maior peso) através do uso de coagulantes (reagentes químicos), que eliminam a carga eletrostática negativa da superfície das partículas, o que diminui a repulsão entre elas, e através da agitação rápida que promove o choque entre as partículas. A floculação consiste na agregação das partículas neutralizadas, na fase de coagulação, formando-se flocos com a ajuda de um floculante (polímero) que se

liga às mesmas através de “pontes”. Os flocos vão aumentando de peso e tamanho permitindo a sua sedimentação por ação da gravidade, de forma a mais tarde poderem ser separados da água por processos como a decantação e filtração (Metcalf & Eddy, 2003; Sawyer, 2002). Normalmente, antes da distribuição da água, procede-se à sua desinfecção para remoção dos organismos patogénicos. Relativamente à água destinada para consumo humano a sua desinfecção realizada nas ETA é geralmente feita por cloragem. A utilização de outros métodos para a desinfecção da água como, por exemplo, a ozonização não é usada porque não permite a existência de um residual de desinfetante que garanta a proteção contra possíveis contaminações posteriores da água. Por último, a água é armazenada num reservatório sendo depois distribuída aos consumidores através da rede pública de abastecimento.

O tratamento adequado das águas residuais e o tratamento das águas brutas para consumo humano são fatores fundamentais que contribuem para a proteção da qualidade da água e da saúde pública.

1.3 Bacia Hidrográfica do rio Paiva

A região hidrográfica do Douro (RH3) é constituída por nove sub-bacias hidrográficas: Águeda, Côa, Costeiras entre o Douro e o Vouga, Douro, Paiva, Rabaçal/Tuela, Sabor, Tâmega e Tua.

O rio Paiva situa-se a Norte de Portugal e nasce na Serra da Nave em Moimenta da Beira desaguando no Douro em Castelo de Paiva, com um comprimento de cerca de 111 km e uma área de bacia de 77 km² (AdDP, 2007).

A sub-bacia do Paiva abrange doze concelhos: Arouca, Castelo de Paiva, Castro Daire, Cinfães, Lamego, Moimenta da Beira, São Pedro do Sul, Sátão, Sernancelhe, Tarouca, Vila Nova de Paiva e Viseu (ARH-N, 2011b).

Possui diversos afluentes, os rios Touro (ou Covo), Rio Mau, Paivó, Vidoeiro, Sonso, Tenente, Cabril e Ardena, nascem quase todos na Serra de Montemuro e desaguam na margem direita do rio Paiva; na margem esquerda, existem menos afluentes, com relevo para a ribeira de Reiriz e o Rio Paivó, que nasce na Serra da Coelheira (Oliveira *et al.*, 1999; AMP, 2009) (Figura 1).

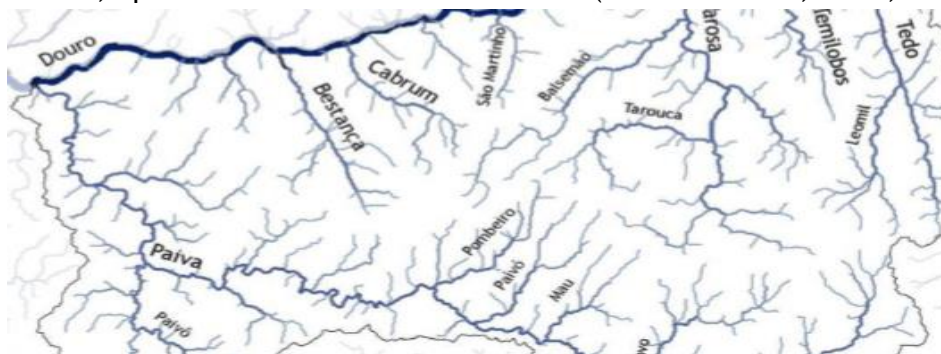


Figura 1: Bacia Hidrográfica do Rio Paiva e afluentes (Boaventura, 2004).

De acordo com a carta de ocupação do solo, com base na CORINE Land Cover (CLC) de 2006, salienta-se, na RH3, um predomínio das áreas afetadas a florestas e meios naturais e seminaturais, seguindo-se as áreas agrícolas e agroflorestais (Figura 2). No período entre 2000 e 2006 verificou-se uma variação significativa no crescimento dos territórios artificializados nas sub-bacias do Tâmega, Tua, Douro e Paiva (ARH-N, 2011b).

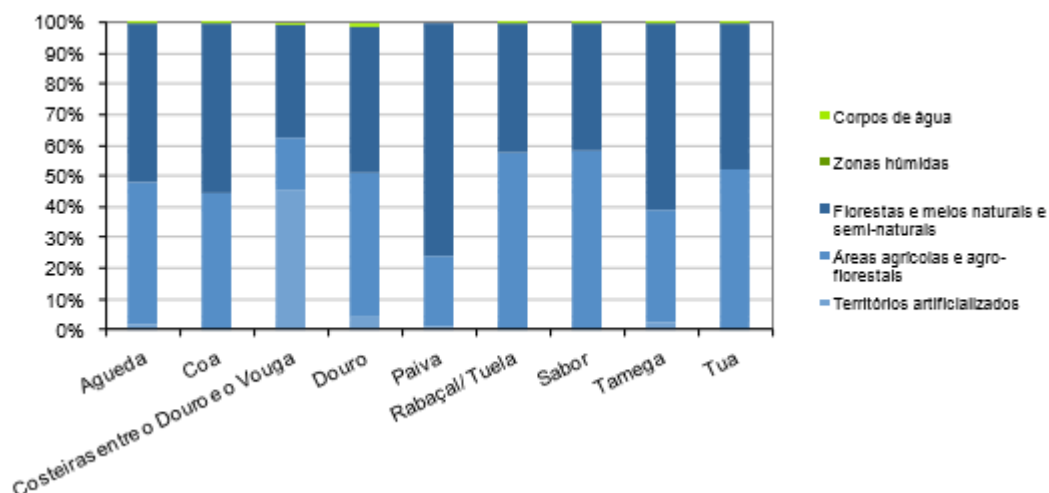


Figura 2: Classes de ocupação do solo por sub-bacia, 2006 (ARH-N, 2011b).

A água retirada dos abastecimentos disponíveis é utilizada para setores como a agricultura, pecuária e indústria. Na Tabela 1 são apresentadas as necessidades de água para usos consumptivos, por sub-bacia e de acordo com a sua utilização.

Tabela 1: Necessidades hídricas para usos consumptivos, em ano médio, por sub-bacia (ARH-N, 2011c).

Sub-bacia	Necessidades hídricas para usos consumptivos (hm ³ /ano)						Necessidades hídricas por unidade de área (hm ³ /ano.km ²)
	Urbano	Indústria	Agricultura	Pecuária	Golfe	Total	
Costeiras entre o Douro e o Vouga	12,48	1,75	2,40	0,06	0,26	16,94	0,082
Douro	64,15	5,00	170,90	0,75	-	240,80	0,040
Paiva	1,75	0,06	22,14	0,15	-	24,09	0,030
Tâmega	13,56	0,69	149,50	0,33	0,46	164,54	0,062
Tua	3,20	0,14	26,48	0,13	-	29,95	0,024

1.4 Antibióticos

A presença de fármacos, em particular os antibióticos, no meio aquático exige a avaliação do seu impacto ambiental e dos seus efeitos negativos nos seres humanos. Antibióticos são substâncias químicas, naturais ou sintéticas, que têm a capacidade de impedir a multiplicação de bactérias (bacteriostático) ou de as destruir (bactericidas), sem ter efeitos tóxicos para o homem ou animal (INSA).

A utilização excessiva ou inadequada de antibióticos em humanos e animais acelerou o aparecimento e propagação das bactérias resistentes aos antibióticos. A maioria dos antibióticos é pouco metabolizada pelos seres humanos e animais após ingestão, sendo que 25% a 75% são excretados em forma inalterada após o seu consumo (Borghi e Palma, 2014).

Vários estudos mostram que as ETAR não degradam todos os resíduos de antibióticos e portanto estes são libertados para o meio ambiente, colocando em risco a reutilização da água. Devido à livre circulação de bactérias em diferentes ambientes e a facilidade com que estas se adaptam a novas condições, a presença de antibióticos nas águas permite que estes continuem a exercer uma pressão seletiva nos microrganismos aí presentes, potenciando a sua resistência bacteriana (Graham *et al.*, 2011; Manaia *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2005).

Os antibióticos podem ser classificados de acordo com o local de ação ou estrutura química. A combinação destes dois parâmetros permite compreender o seu mecanismo de ação que resulta da interação entre o antibiótico e a bactéria e o mecanismo de resistência bacteriana que resulta da interação entre a bactéria e o antibiótico.

Os principais mecanismos de ação dos antibióticos (Figura 3) são: a inibição da síntese da parede celular, a inibição da síntese proteica, a inibição da síntese dos ácidos nucleicos e a inibição da membrana celular. O conhecimento do mecanismo de ação dos antibacterianos permite compreender as suas potencialidades tóxicas, as razões da sua inocuidade, o risco que apresenta o aparecimento de certos mutantes bem como descrever possíveis terapêuticas futuras (Guimarães *et al.*, 2014).

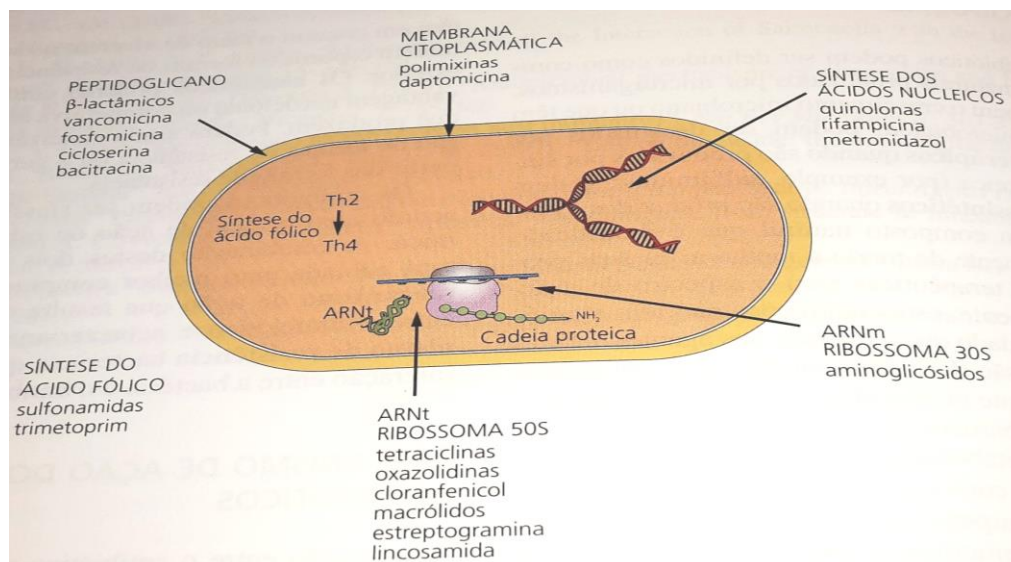


Figura 3: Mecanismos de ação dos antibióticos nas bactérias (Barroso *et al.*, 2014).

1.4.1 Inibidores da síntese da parede celular bacteriana

A parede celular bacteriana apresenta-se como uma estrutura rígida que recobre a membrana citoplasmática, conferindo forma às bactérias. A parede celular possui importância para as bactérias pois protege as células e permite manter a pressão osmótica no interior das bactérias. Os antibióticos β-lactâmicos são exemplo de antibióticos com ação ao nível da síntese do peptidoglicano que atuam através da inibição da transpeptidase, ligando-se a esta enzima mediante ligação covalente. Como resultado, o polímero linear não é transformado em polímero cruzado e não se forma a parede celular bacteriana (Barroso *et al.*, 2014).

Os antibióticos β-lactâmicos podem ser divididos em quatro grupos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenemos e monobactams, e apresentam em comum um anel β-lactâmico constituído por três átomos de carbono e um de azoto (Figura 4).

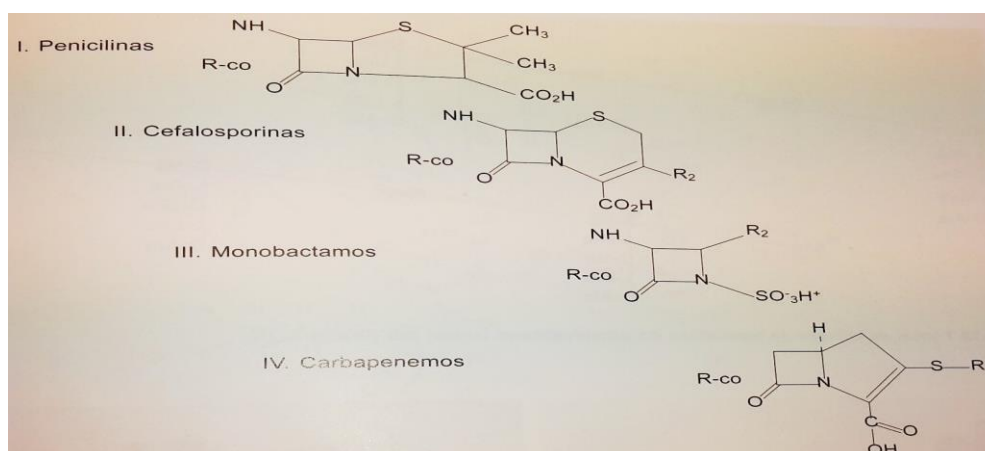


Figura 4: Estrutura química dos β-lactâmicos (Ferreira *et al.*, 2010).

O anel β -lactâmico determina não só o mecanismo de ação (inibição da síntese do peptidoglicano) como também a baixa toxicidade direta, visto que atuam na parede celular e esta não está presente nas células eucariotas do Homem. Os β -lactâmicos atuam quando a bactéria está em fase ativa de crescimento. No entanto, quer nas bactérias Gram-negativo quer nas Gram-positivo, a suscetibilidade é variável devido a diferenças estruturais no peptidoglicano, à constituição dos recetores da membrana e à atividade das autolisinas (Ferreira *et al.*, 2010).

1.4.2 Inibidores da síntese proteica nos ribossomas

Os ribossomas são unidades citoplasmáticas onde se sintetizam as proteínas. Os antibióticos inibidores da síntese proteica atuam ao nível do ribossoma e nunca numa fase de ativação do aminoácido ou de ligação a um ácido ribonucleico. Estes antibióticos possuem afinidade para as subunidades ribossômicas 30S e 50S, específicas das bactérias (Azevedo, 2005; Ferreira *et al.*, 2010). Alguns exemplos de antibióticos que inibem a síntese proteica são os aminoglicosídeos, tetraciclina, anfenicóis, macrólidos, lincosamida e oxazolidinonas.

Dadas as diferenças entre os ribossomas bacterianos e os das células humanas, é possível a utilização terapêutica de antibióticos inibidores de síntese proteica sem efeitos graves para o hospedeiro.

i. Tetraciclina

As tetraciclina caracterizam-se pelo esqueleto do octaidronaftaceno, sistema formado de quatro anéis condensados, e pelo seu amplo espectro de ação. O espectro de ação das tetraciclina é essencialmente o mesmo para todas, sendo as diferenças apenas quantitativas e não qualitativas (Guimarães *et al.*, 2014). São o terceiro antibiótico mais consumido, depois da penicilina e quinolonas, e devido ao seu uso indiscriminado tem sido detetado um número de bactérias resistentes às tetraciclina (Pereira-Maia *et al.*, 2010).

As tetraciclina são antibióticos de primeira escolha no tratamento da Cólera, da Peste, da Brucelose, das Riquetsioses e no tratamento das infeções por *Chlamydia* e por *Mycoplasma* (Infarmed).

O mecanismo de ação ocorre na subunidade 30S do ribossoma, bloqueando a ligação dos aminoacil-tRNA, impedindo a ligação codão-anticodão entre o tRNA e o local A dos ribossomas e consequentemente, inibindo a síntese de novas proteínas. A formação de quelatos com iões metálicos das bactérias contribui, também, para um efeito bacteriostático sobre os diversos microrganismos (Ferreira *et al.*, 2010; Goodman & Gilman, 2010; Borghi e Palma, 2014).

Yang *et al.* (2005) avaliaram a presença de antimicrobianos do grupo das tetraciclinas e sulfonamidas em amostras de afluentes e de efluentes de ETAR no norte de Colorado, EUA, tendo verificado a existência desses antibióticos em ambas as correntes, ainda que em menor quantidade nas amostras provenientes do efluente. Zhao *et al.* (2011) também encontraram resíduos de antibióticos, incluindo as tetraciclinas, em efluentes urbanos e agrícolas em ETAR. Deste modo, conclui-se que estes antimicrobianos não são totalmente eliminados nas ETAR, colocando em risco a reutilização da água, exercendo pressão seletiva nos microrganismos presentes e potenciando a sua resistência bacteriana.

1.4.3 Inibidores da síntese de ácidos nucleicos

Os antibacterianos que inibem a síntese de ácidos nucleicos podem atuar em várias etapas desta síntese.

A replicação de DNA bacteriano é um processo regulado por um grupo de enzimas designadas por topoisomerasas, que asseguram que o DNA bacteriano se mantém no seu estado condensado. As fluoroquinolonas, expressam atividade bactericida, inibindo a replicação e transcrição do DNA bacteriano por se ligarem às topoisomerase II (ou DNA girase) e IV (Bakken, 2004; Korolkovas e Burckhalter, 1976).

As rifampicinas inibem a transcrição por ligação à subunidade beta da polimerase bacteriana do RNA. O metronidazol atua sobre o DNA por um mecanismo particular, funcionando como um aceitador de elétrons que determina a formação de radicais livres tóxicos que interagem com o DNA bacteriano desintegrando-o e provocando a sua morte (Ferreira *et al.*, 2010; Guimarães *et al.*, 2014).

1.4.4 Inibidores da função da membrana citoplasmática

A membrana para além de isolar a célula do meio exterior e delimitar os seus compartimentos intracelulares, também permite a criação de uma barreira impermeável a iões. Permite estabelecer gradientes eletroquímicos no interior da célula e assim armazenar energia, como uma bateria. A permeabilidade da membrana celular é essencial para que o antibiótico tenha o efeito desejado, quer seja bactericida quer bacteriostático (Azevedo, 2005; Goodman & Gilman, 2010).

1.5 Metais

Os metais têm uma distribuição ubíqua na natureza. A sua deposição no ecossistema pode ocorrer a partir de fontes naturais ou de atividades antropogénicas representando uma ameaça para a saúde pública devido à sua persistência, biomagnificação e acumulação na cadeia alimentar (Fadigas *et al.*, 2002; Sengor e Gikas, 2014). O material de origem do solo, os processos da sua formação e a composição e proporção dos constituintes da sua fase sólida são os principais contribuintes para a determinação da presença e da concentração naturais de metais (Fadigas *et al.*, 2002). Por exemplo, solos formados a partir de rochas básicas apresentam maiores concentrações de metais quando comparados com solos formados sobre granitos e arenitos (Oliveira *et al.*, 1999). A contaminação do solo por metais exercida pelas atividades humanas deve-se a atividades como a extração mineira, as indústrias de madeiras e de transformação de metais, a combustão de carvão e o tráfego rodoviário.

Alguns metais são considerados essenciais por funcionarem como micronutrientes para os organismos, como por exemplo, o cobalto, cobre, ferro e zinco. Por outro lado, alguns metais pesados são prejudiciais para os organismos mesmo em concentrações baixas, como é o caso do mercúrio e chumbo (Gadd, 1992; Nies, 1999; Rathnayake *et al.*, 2009).

Os metais pesados possuem influência na população microbiana, afetando o seu crescimento, a sua morfologia, as suas atividades bioquímicas e diminuindo a quantidade de biomassa disponível. Diversos estudos tem sido centrados nas metaloenzimas e estima-se que até um terço de todas as enzimas conhecidas contêm um ião metálico, como um participante funcional (Gadd, 1992).

Cádmio, cobre e zinco estão entre os metais que mais são depositados para o meio ambiente. Tendo em conta o problema de saúde pública da resistência das bactérias aos metais, várias abordagens e estudos tem sido realizados para avaliar o risco representado pelos metais contaminantes no solo, cursos de água, entre outros.

1.5.1 Cobre

O cobre é um dos metais incluídos no presente estudo, devido à sua ampla e crescente utilização e distribuição na natureza. É encontrado numa grande variedade de sais minerais e de compostos orgânicos, podendo também ser encontrado na Natureza na sua forma de sulfetos, arsenitos, cloretos e carbonatos.

Este metal é considerado um micronutriente essencial para a maioria, se não todos, os organismos vivos, uma vez que é o constituinte de muitas metaloenzimas e proteínas envolvidas no transporte de eletrões, reações redox, e outras reações importantes. A sua toxicidade é principalmente devido às suas interações com os ácidos nucleicos, às alterações

dos locais ativos de enzimas e à oxidação de componentes da membrana, processos que podem ser relacionados com a capacidade de cobre para gerar radicais livres hidroxilo que são tóxicos (Cervantes e Gutierrez-Corona, 1994).

Recentemente, o cobre na sua forma metálica demonstrou ser de um grande interesse devido às suas propriedades antimicrobianas. O uso de superfícies metálicas em estudos hospitalares em todo o mundo resultou em reduções consideráveis em contaminações superficiais (Casey *et al.*, 2010; Mikolay *et al.*, 2010).

1.5.2 Zinco

Os principais compostos de zinco são os óxidos (ZnO), utilizados nas indústrias de cerâmica, borracha e tintas, o sulfato de zinco (ZnSO₄) com aplicação na indústria têxtil e no enriquecimento de solos pobres em zinco e, por fim, o cloreto de zinco usado principalmente para preservar madeiras.

O zinco é um ião metálico essencial, mas em excesso exerce efeitos tóxicos na célula. O zinco entra na constituição de várias enzimas e é ativador de outras que atuam no crescimento, reprodução e no funcionamento normal do sistema imunológico e de outros processos fisiológicos. Devido à versatilidade das suas características físico-químicas é um componente de mais de 200 tipos diferentes de enzimas que são identificadas em diferentes espécies onde é indispensável a sua função catalítica e a sua capacidade de estabilidade estrutural. Além destas funções, o zinco também é conhecido por ser estabilizador de membranas e de várias macromoléculas (Choudhury e Srivastava, 2001; Prasad, 1979).

O zinco é conhecido por ser um potente inibidor dos sistemas de transporte eletrônico respiratório de bactérias e mitocôndrias (Choudhury e Srivastava, 2001). A toxicidade do zinco é relativamente baixa em comparação com outros metais como o cádmio, mercúrio e cobre (Duxbury, 1981).

1.6 Resistência Bacteriana aos Antibióticos

Os mecanismos de resistência bacterianos podem ser intrínsecos (ou naturais) do microrganismo ou adquiridos por transmissão de material genético ou mutação. São exemplos destas resistências a alteração da permeabilidade na membrana da bactéria, as bombas de efluxo, a produção enzimática e a alteração genética do alvo, representados na Figura 5. A resistência intrínseca resulta de um processo de evolução genética, enquanto a adquirida pode surgir num curto espaço de tempo (Guardabassi e Dalsgaard, 2002).

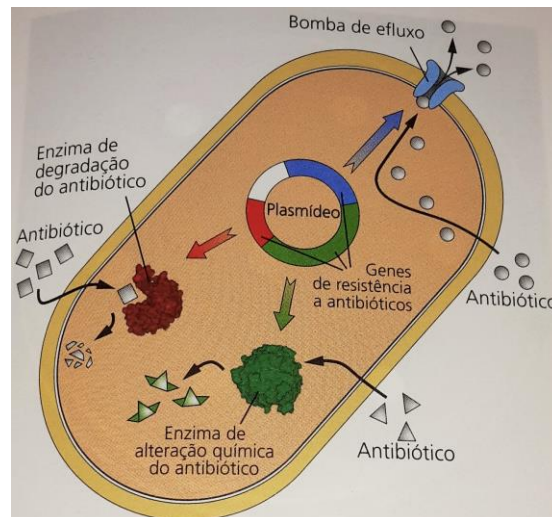


Figura 5: Mecanismos utilizados pelas bactérias para impedir a ação dos antibióticos (Barroso *et al.*, 2014; Levy e Marshall, 2004).

1.6.1 Resistência natural

A resistência natural é uma característica intrínseca do microrganismo, observa-se em todos os membros de uma mesma espécie ou gênero, independentemente do seu local de isolamento. O conhecimento da resistência intrínseca das diferentes espécies ajuda a escolher as estratégias de tratamento empírico. Um exemplo ilustrativo é a resistência natural dos micoplasmas aos antibióticos β -lactâmicos, por não possuírem peptidoglicano (Ferreira *et al.*, 2010).

1.6.2 Resistência adquirida

A resistência adquirida envolve alterações genéticas nos microrganismos devido a mutações espontâneas ou aquisição de genes exógenos por mecanismos de transdução, conjugação ou transformação associados a estruturas de DNA móveis como os plasmídeos, integrões e transposições (Barroso *et al.*, 2014).

Quando se fala da evolução das bactérias é imprescindível referir as mutações. As mutações são fenômenos que podem ocorrer espontaneamente na Natureza ou podem ser induzidas por exposição a determinadas radiações ou substâncias químicas. Um agente capaz de provocar uma mutação designa-se agente mutagénico. Os agentes mutagénicos podem ser divididos em diferentes categorias tendo em conta a forma como atuam: 1) agentes químicos que, dada a sua semelhança com os nucleótidos, se incorporam no DNA; 2) agentes químicos ou físicos que modificam as bases do DNA; 3) agentes químicos ou físicos que provocam inserções ou deleções de nucleótidos ou mesmo de porções cromossômicas (Videira, 2001).

Se o erro (mutação) for um benefício para a bactéria, como no caso da resistência aos antibióticos, então tenderá a predominar naquela espécie. Assim o maior problema da

resistência mediada por mutação é a sua transmissão às gerações seguintes, o que torna a bactéria resistente predominante. (Neihardt, 2004).

Outro mecanismo para além da mutação que é responsável pela aquisição da resistência ao antibiótico resulta de uma transferência horizontal ou lateral de genes (THG). Como o próprio nome indica, o processo consiste na transferência de material genético de uma célula dadora para uma célula recetora que não é sua descendente. O conceito aparece por contraste com a transferência vertical de genes que ocorre quando um organismo recebe material genético do seu antecessor, por exemplo dos progenitores ou de uma espécie a partir da qual evoluiu (Brown, 2003; Miller, 1998). Pela rápida adaptação bacteriana a pressões seletivas resultante do uso de múltiplos antibióticos este processo é extremamente dependente de elementos genéticos móveis, dentre os quais os plasmídeos assumem maior importância enquanto transposões e integrões assumem menor importância (Goodman & Gilman, 2010). Os três mecanismos possíveis para o processo de THG são a conjugação, a transdução e a transformação.

O processo de conjugação envolve a transferência de DNA de uma bactéria para outra, quando ocorre contacto entre as duas células. O processo de conjugação é mediado por plasmídeos F, que contêm genes localizados que codificam proteínas envolvidas na formação de pilus sexuais. Uma bactéria atua como doadora (F+) e outra como receptora (F-), em que a primeira transfere parte do seu material genético para a outra, e a segunda apenas o recebe e incorpora ao seu genoma (Miller, 1998).

A transdução é a transferência de informação genética de uma bactéria para outra tendo como vetor um vírus (bacteriófago), podendo ser generalizada (em que qualquer gene pode ser transmitido) ou restrita (limitada a alguns genes específicos). A transdução generalizada está associada ao ciclo lítico onde fragmentos de DNA da célula hospedeira são encapsulados, formando-se uma partícula transdutora que pode integrar o seu DNA quando infeta outra bactéria. A transdução restrita está relacionada com o ciclo lisogénico dos fagos: o genoma viral insere-se num local específico do genoma bacteriano e é transmitido à descendência (Miller, 1998). A transdução não é considerada um mecanismo de elevada importância na troca de material genético na natureza uma vez que apresenta um espectro de ação muito reduzido (Dröge *et al.*, 1998).

A transformação é um mecanismo de transferência genética entre bactérias no qual o DNA dador é DNA livre no ambiente que circunda a bactéria recetora, ou seja, quando uma célula sofre lise ou morte celular liberta o seu DNA que depois pode ser absorvido por outra bactéria.

A transferência de genes por conjugação é comum entre os bastonetes Gram-negativos e a transferência conjugativa de resistência antimicrobiana ocorre para enterococos e *Staphylococcus* que são bactérias Gram-positivas (Goodman & Gilman, 2010).

1.6.3 Mecanismos de resistência

i. Alteração da permeabilidade

A permeabilidade constitui uma propriedade da membrana celular externa das bactérias Gram-negativas. As porinas existentes na membrana são os canais de passagem para o interior da célula de nutrientes e outras substâncias, como os antibióticos (Azevedo, 2005). Algumas bactérias podem modificar e alterar a expressão das porinas, de forma a excluir o antimicrobiano do seu alvo (Nikhaido, 1994).

Por exemplo o imipenem atravessa a membrana de *Pseudomonas aeruginosa* através de uma porina específica. A ausência ou um decréscimo da expressão do gene *oprD*, codificador desta porina torna inviável a atividade deste antibiótico, contribuindo para a resistência da *P. aeruginosa* ao imipenem (Barroso *et al.*, 2014).

ii. Bombas de efluxo

O bombeamento ativo de antimicrobianos do meio intracelular para o extracelular, isto é, o seu efluxo ativo, produz resistência bacteriana a determinados antibióticos. As proteínas de efluxo exportam os antibióticos através das membranas celulares, fazendo com que a concentração no meio intracelular seja mais reduzida que a necessária para ocorrer efeito antibacteriano. Este é um dos principais mecanismos às tetraciclinas e assume importância tanto em bactérias Gram-negativo (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*) como em bactérias Gram-positivo (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* e *Streptococcus pneumoniae*) (Barroso *et al.*, 2014; Ferreira *et al.*, 2010).

iii. Alteração da estrutura dos antibióticos por via enzimática

Muitas bactérias produzem enzimas que têm a capacidade de inativar os antibióticos, sendo este o mecanismo de resistência mais importante nos β -lactâmicos, aminoglicosídeos e quinolonas. Um dos fatores é a existência de bactérias produtoras de enzimas inativadoras dos antibióticos como é o caso das β -lactamases que hidrolisam a ligação amida do anel β -lactâmico, destruindo o local onde os antimicrobianos β -lactâmicos se ligam às PBPs bacterianas e através do qual exercem seu efeito antibacteriano. A localização dos determinantes de resistência com elementos genéticos móveis e a sua capacidade de disseminação também são elementos a ter em consideração neste mecanismo de resistência bacteriana (Barroso *et al.*, 2014; Ferreira *et al.*, 2010).

iv. Alteração genética do alvo

A alteração do local onde atua determinado antimicrobiano, de modo a impedir a ocorrência de qualquer efeito inibitório ou bactericida, constitui um dos mais importantes mecanismos de resistência.

Um exemplo é o caso da espécie *Staphylococcus aureus*, resistente à oxacilina, e *Staphylococcus* produtores de coagulase que adquirem o gene cromossômico *mecA* e produzem uma proteína de ligação da penicilina (PBP), a PBP2a, com baixa afinidade para todos os antibióticos β -lactâmicos (Ferreira *et al.*, 2010).

Relativamente aos metais algumas espécies bacterianas são inerentemente tolerantes, vivendo no solo independentemente dos níveis de contaminação (Angle *et al.*, 1993). Devido à pressão seletiva a partir do metal no meio ambiente de crescimento, os microrganismos desenvolveram alterações ao nível do genoma e do metabolismo de modo a serem resistentes aos metais. Assim, mecanismos de resistência a iões metálicos essenciais, como o zinco, têm especial interesse porque ajudam na compreensão do controlo homeostático que a célula exerce na aquisição e na manutenção da quantidade necessária de metal (Choudhury e Srivastava, 2001). Como já foi discutido, o zinco está associado a um número de processos essenciais para o crescimento e metabolismo, mas em concentrações mais elevadas torna-se tóxico. A exclusão por barreira de permeabilidade, o sequestro intra e extracelular, o transporte ativo e as bombas de efluxo são alguns dos mecanismos identificados para a resistência a metais (Rathnayake *et al.*, 2009).

1.7 Género *Staphylococcus*

O género *Staphylococcus* pertence à família dos *Micrococcaceae* e atualmente estão descritas 51 espécies e 27 subespécies (Euzébi, 2015). Na Tabela 2 do Anexo 1 apresentam-se todas as espécies e refere-se o seu habitat e as possíveis infeções que podem originar. O nome do género tem origem grega e significa cocos em cacho, morfologia característica destes microrganismos. Estas bactérias são imóveis, não esporuladas, Gram-positivas e possuem uma parede celular característica que contém peptidoglicano O-acetilado composto por resíduos de glicina na ponte interpeptídica. São anaeróbios facultativos, produtores de catalase (catalase positivo) e são capazes de crescer em meios com elevado teor de cloreto de sódio (10%) e a temperaturas compreendidas entre 18 °C e 40 °C (Ferreira e Sousa, 2000).

Das várias enzimas produzidas por *Staphylococcus*, a coagulase destaca-se por permitir a distinção, a nível clínico e laboratorial, assentando na capacidade ou incapacidade de coagular plasma. Com base nesta característica distinguem-se dois grupos de *Staphylococcus*: *Staphylococcus* produtores (por exemplo, *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus*) ou não produtores de coagulase (por exemplo, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* e *S. haemolyticus*). A coagulase, enzima proteica, converte o fibrinogénio do plasma em fibrina, ficando as bactérias aprisionadas na rede de fibrina, provocando uma coagulação do plasma.

Os *Staphylococcus* são bactérias que vivem em contacto íntimo com o Homem, numa relação habitual de comensalismo ou mutualismo. Muitas espécies fazem parte da flora natural da pele e mucosas, tendo nichos específicos de acordo com a espécie em causa. Para além de se encontrarem em humanos e animais, os *Staphylococcus* podem ser encontrados em produtos alimentares (carne, leite e queijo), em solo ou areia, em água doce ou salgada e em poeiras na atmosfera (Kloos *et al.*, 1992; Götz, 2006). Segundo Picoli *et al.* (2006), os *Staphylococcus* podem ser introduzidos num alimento sob várias formas, entre as quais o ato de o manipulador levar a mão à boca ou nariz, assim como, por lesões estafilocócicas presentes na pele do funcionário que trabalha diretamente com o alimento.

De entre todas as espécies *Staphylococcus*, *S. aureus* foi a primeira espécie a ser reconhecida como agente patogénico humano, estando associada a uma elevada taxa de morbilidade e mortalidade. Na Tabela 3 apresentam-se as espécies consideradas do ponto de vista médico como agentes patogénicos primários e responsáveis por infeções oportunistas.

Tabela 3: Espécies de *Staphylococcus* patogénicos para o Homem (Ferreira e Sousa, 2000).

Espécie	Patogenicidade
<i>Staphylococcus aureus</i>	Patogénico primário frequente
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Patogénico primário frequente
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Oportunista frequente
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Oportunista frequente
<i>Staphylococcus hominis</i>	Oportunista ocasional
<i>Staphylococcus schleiferi</i>	Oportunista ocasional
<i>Staphylococcus lugdumensis</i>	Oportunista ocasional

Segundo Oliveira *et al.* (2006) o género *Staphylococcus* apresenta grande versatilidade de estratégias de patogenicidade, fatores de virulência e capacidade de sobrevivência e multiplicação em uma diversidade de ambientes. O fator mais importante na patogénese dos *Staphylococcus* não produtores de coagulase é a produção do biofilme. O biofilme é definido como uma comunidade microbiana séssil rodeada por uma matriz polimérica extracelular designada “slime” (Donlan e Costerton, 2002). A sua formação envolve diferentes fases,

Figura 6, incluindo a adesão inicial das células bacterianas às células do hospedeiro ou a uma superfície, seguida da adesão das várias camadas de células bacterianas, formando biofilmes maduros que depois vão libertando as células (O'Toole *et al.*, 2000).

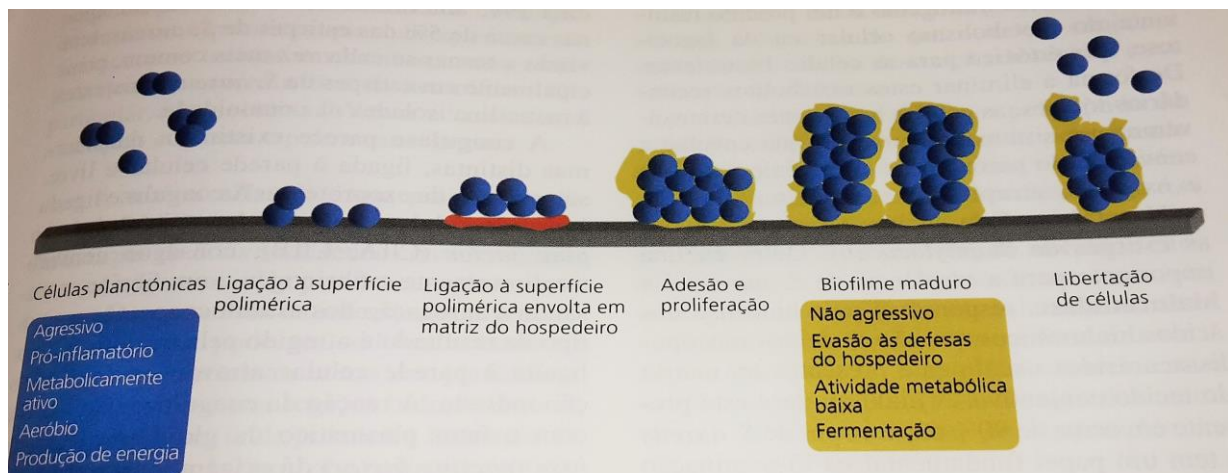


Figura 6: Modelo de formação do biofilme (Barroso *et al.*, 2014).

O diagnóstico bacteriológico baseia-se no isolamento e identificação do microrganismo recorrendo a provas simples, ao alcance de todos os laboratórios uma vez que, como causam frequentemente infeções, a sua rápida caracterização epidemiológica permite atuar mais rapidamente no tratamento da infeção.

1.8 Contributos do Trabalho

Este estudo contribui para compreender a evolução e dispersão na natureza dos *Staphylococcus* e examina a sua resistência aos antibióticos e metais, o que pode originar um problema de saúde pública e ambiental. O presente trabalho procura aumentar o conhecimento sobre o problema da multiressistência das bactérias presentes em águas naturais.

1.9 Organização da Tese

Podem ser identificadas quatro seções principais na presente tese:

- **Introdução**, presente no Capítulo 1, consiste numa apresentação, enquadramento e contextualização dos assuntos referentes à temática em estudo.
- **Materiais e métodos**; nesta secção são descritas as práticas laboratoriais.
- **Resultados e Discussão**, Capítulo 3, onde se apresentam os resultados obtidos, a sua discussão e uma comparação com outros estudos já existentes.
- **Conclusões**, onde se enquadram os resultados obtidos com os objetivos enunciados e foca-se o sucesso do trabalho, revendo as dificuldades encontradas.

2 Materiais e Métodos

2.1 Quantificação de *Staphylococcus*

2.1.1 Colheita das amostras

As amostras de água natural foram colhidas entre março e abril de 2015 no rio Paiva. A colheita foi efetuada para recipientes estéreis de plástico com capacidade de 1 L, em condições assépticas, sendo o transporte até ao laboratório executado recorrendo a uma mala térmica refrigerada com termoacumuladores congelados. As amostras foram analisadas nas 6 horas posteriores à colheita, sendo que no laboratório foram armazenadas em frigorífico à temperatura de 5 ± 3 °C, ao abrigo da luz. As análises relativas à pesquisa e quantificação de bactérias do género *Staphylococcus* foram realizadas de acordo com o protocolo implementado no laboratório, o qual é baseado na norma ISO 9308-1:2000.

Todo o material e equipamento utilizado para a colheita das amostras, bem como para a restante realização deste trabalho encontra-se listado no Anexo 2.

2.1.2 Preparação dos meios de cultura

Utilizou-se o meio de cultura Mannitol Salt Agar (MSA), da marca Oxoid e de referência CM0085, de modo a quantificar e isolar bactérias *Staphylococcus*, sendo que a sua preparação foi realizada de acordo com as indicações fornecidas pelo fabricante. A esterilização do meio foi efetuada por autoclavagem a 121 ± 3 °C durante 15 minutos. Depois de autoclavado, o meio foi arrefecido num banho de água até cerca de 45 °C.

Posteriormente, adicionou-se ao meio os volumes adequados de solução stock de 1 mg/mL tetraciclina, 1 M de sulfato de zinco ou de 1 M sulfato de cobre pentahidratado, previamente esterilizados por filtração, para obter concentrações finais de 1 mg/L antibiótico, 1 mM de cada metal, respetivamente. Procedeu-se à homogeneização de cada meio e distribuiu-se, em condições de assepsia, por placas de Petri com diâmetro de 55 mm. Finalmente, quando os meios solidificaram as placas foram invertidas e armazenadas em frigorífico à temperatura de 5 ± 3 °C.

2.1.2.1 Preparação da solução de antibiótico

A tetraciclina (Fluka®) 1 mg/mL encontrava-se na forma pulverizada pelo que foram preparadas soluções stock de 1 mg/L, esterilizadas por filtrações em membrana com porosidade 0,22 µm. De notar, que o solvente utilizado apresentava uma composição de 60% em etanol e 40% em água.

2.1.2.2 Preparação das soluções metálicas

As soluções de sulfato de zinco e de sulfato de cobre pentahidratado encontravam-se já preparadas na concentração de 1 M.

O armazenamento das soluções exigiu temperaturas criogénicas de cerca de -20°C , recorrendo-se assim ao congelador para preservar e evitar a degradação das soluções.

2.1.3 Método analítico

O método utilizado para a pesquisa, quantificação e isolamento de bactérias do género *Staphylococcus* foi baseado na filtração por membrana, método vulgarmente utilizado para *Staphylococcus*, bactérias coliformes e *Escherichia coli* (APHA,2005). Filtraram-se volumes diversos de amostra, numa rampa de filtração, utilizando uma membrana estéril composta por ésteres de celulose, da marca Pall, com porosidade de $0,45\text{ }\mu\text{m}$ e diâmetro de 47 mm.

De seguida, colocaram-se as membranas em placas de Petri contendo o meio MSA e os meios seletivos, preparados anteriormente, tendo o cuidado de as posicionar sem formação de bolhas de ar de modo a garantir o contacto com o meio, como indicado na Figura 7.

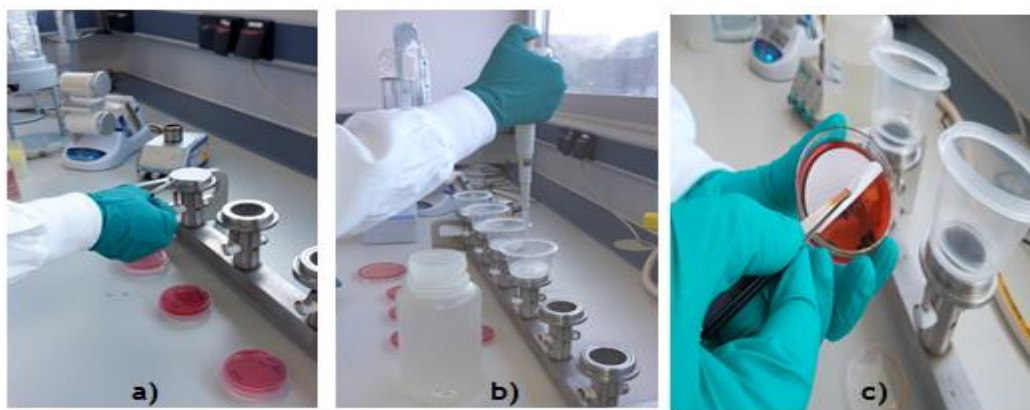


Figura 7: Processo de filtração por membrana. a) Colocação da membrana na rampa de filtração; b) Inserção do volume de amostra para filtração; c) Colocação da membrana na placa de Petri após filtração.

As placas foram incubadas a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$, durante 48 ± 4 h, período ao fim do qual se observou o crescimento de colónias. Destas foram contabilizadas as colónias amarelas ou brancas, envolvidas ou não por um halo amarelo (colónias típicas), Figura 8, e determinou-se o número de unidades formadoras de colónias (UFC) por unidade de volume.

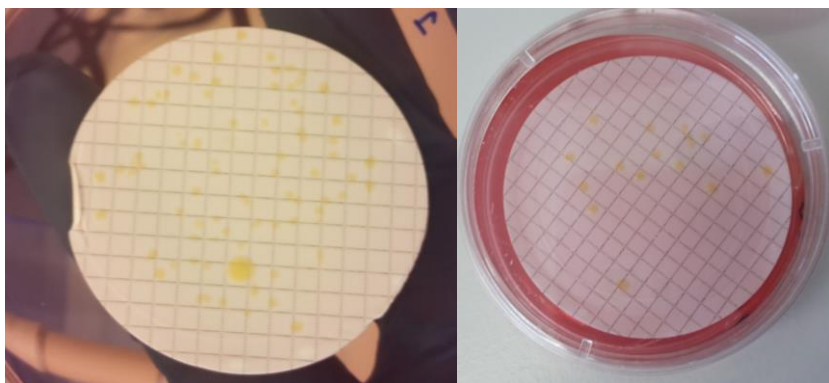


Figura 8: Colônias amarelas típicas para *Staphylococcus*.

2.2 Isolamento e Identificação de *Staphylococcus*

Para confirmar a presença de *Staphylococcus* foi necessário isolar as colônias típicas, até obter uma cultura pura, isto é, contendo apenas um tipo de organismo. O isolamento dos microrganismos foi realizado pela técnica de estriamento em meio Plate Count Agar (PCA) da marca LiofilChem com referência 610040, sendo que para cada placa de meio presuntivo foram isoladas até 5 colônias típicas. Com uma ansa previamente esterilizada à chama e arrefecida, escolheram-se as colônias e semearam-se no meio, seguindo o processo de estriamento de modo a obter-se um perfeito isolamento das bactérias existentes na amostra. De seguida, as culturas foram conservadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ num meio nutritivo suplementado com glicerol 15% (v/v).

Após obtenção de uma cultura pura, o passo seguinte consistiu na identificação do isolado. A identificação de bactérias baseou-se numa caracterização preliminar que incluiu a coloração de Gram e os testes de catalase, coagulase, tipo respiratório, oxidase e oxidação/fermentação da glicose. Para além desta caracterização, procedeu-se à análise da sequência do gene que codifica para o 16S rRNA que permitiu identificar os isolados ao nível da espécie. A identificação dos isolados ao nível de espécie abrangeu três etapas: extração de DNA; análise e sequenciação do gene que codifica o 16S rRNA; e análise comparativa com estirpes de diferentes espécies para confirmar a identificação e definir grupos taxonómicos.

2.2.1 Confirmação Bioquímica de *Staphylococcus*

Em cada colheita e meio, repicaram-se aleatoriamente até 5 colônias típicas para o meio geral Nutriente Agar (NA) e procedeu-se à incubação das placas em posição invertida a $37\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante $24\pm 4\text{ h}$.

Terminado este período efetuou-se a **coloração de Gram**, técnica de coloração diferencial, que permite distinguir os dois principais grupos bacterianos em microscopia ótica. De acordo com a coloração apresentada, as bactérias dividem-se em bactérias de Gram-positivo e de Gram-negativo. O método consistiu em colocar uma gota de água numa lâmina e com uma ansa de plástico espalhou-se uma porção de biomassa de um isolado e secou-se à chama. Coraram-se as células com cristal de violeta durante 1 minuto. A retenção deste corante depende das propriedades das paredes celulares bacterianas. No caso de células Gram-positivas, como apresentam uma parede espessa, predominantemente constituída por peptidoglicano, o corante fica retido no interior da célula; no caso das Gram-negativas como contêm uma membrana externa e uma camada mais interna que contém peptidoglicano e que é mais fina que a das Gram-positivo, não conseguem reter o corante. Lavou-se a lâmina com água corrente e cobriu-se com um fixador Lugol durante 1 minuto. Repetiu-se a lavagem e lavou-se com álcool a 96% durante 30 segundos. A adição do álcool desidrata a camada de peptidoglicano das células Gram-positivo para a tornar mais impermeável ao cristal de violeta; no caso das células Gram-negativo, o álcool dissolve a sua membrana externa deixando pequenos espaços pelos quais o cristal de violeta se difunde ficando as bactérias incolores. Por último, cobriu-se durante 1 minuto com safranina durante 1 minuto, um corante que permite que as bactérias Gram-negativa adquiram a cor rosa.

Após confirmação da presença de bactérias em forma de Cocos Gram positivas, prosseguiu-se com o **teste da catalase** que consistiu em colocar uma gota de solução de peróxido de hidrogénio 3% (Perhydrol®) sobre uma lâmina e colocar uma colónia em contacto com o reagente. No caso de formação de bolhas, estas indicavam a presença da enzima Catalase (catalase positivo); caso contrário, verificava-se ausência da enzima catalase (colónia catalase negativo).

Seguidamente procedeu-se à determinação do **tipo respiratório** através da inoculação de uma colónia em meio semi-sólido, em movimento helicoidal, de baixo para cima. Incubaram-se os tubos a 37 ± 1 °C, durante 24 ± 4 h. O crescimento em todo o meio permitiu aferir que se tratavam de *Staphylococcus* uma vez que estes são bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas.

Para a pesquisa da presença da **enzima coagulase** inocularam-se colónias isoladas em tubos pequenos que continham 0,5 mL de água peptonada e 0,5 mL de plasma de coelho reconstituído (bioMérieux® SA). Homogeneizou-se a mistura e incubou-se a 37 ± 1 °C durante 18 a 24 h. Após o período de incubação, os tubos onde ocorreu formação de coágulo confirmaram a presença de *Staphylococcus* produtores de coagulase e a não formação de coágulo indicava a presença de *Staphylococcus* não produtores de coagulase.

A detecção da **oxidase** (citocromo c oxidase) fez-se colocando as células bacterianas em contacto com uma solução de um indicador de óxido-redução (reagente tetrametil-p-fenilenediamina dihidroclorato - TMDP) a 1%. Este indicador é incolor na forma reduzida e ao ser oxidado pelo citocromo oxidase adquire cor azul. Como estirpes de controlo foram usadas *Staphylococcus aureus* (controlo negativo) e *Pseudomonas aeruginosa* (controlo positivo).

Existem microrganismos que podem metabolizar compostos orgânicos via fermentativa ou por via oxidativa, mas outros apenas podem usar uma das vias. O **teste da oxidação/fermentação da glicose (O/F)** permite determinar o uso da via oxidativa ou fermentativa da glicose. É considerado um método simples e eficaz para a identificação de bactérias que utilizam a glicose em presença ou na ausência de oxigênio, e baseia-se na produção de ácido quando a glicose é metabolizada (Oliveira, 2000). O meio O/F possui um indicador de pH (azul de bromotimol) que em meio ácido tem cor amarela e em meio alcalino tem cor verde. Os microrganismos aeróbios facultativos ou aerotolerantes produzem reação ácida, quer seja em aerobiose, quer seja em anaerobiose. Os organismos aeróbios obrigatórios são oxidativos porque apenas produzem ácido em aerobiose. Inoculou-se, por picada no centro, dois tubos de meio O/F com glicose e a um dos tubos adicionou-se cerca de 2 mL de parafina líquida estéril. As culturas foram incubadas a 30 °C durante 48 horas e a observação dos resultados permitiu aferir se o açúcar foi metabolizado por via oxidativa e fermentativa no caso dos dois tubos apresentarem cor amarela ou se o açúcar apenas foi metabolizado por via oxidativa no caso de apenas o tubo com parafina adquirir cor amarela.

2.2.2 Extração de DNA

Com o auxílio de uma ansa estéril, inseriu-se uma colónia pura de um isolado num tubo *Eppendorf* contendo 100 µL de água ultrapura estéril. Este foi colocado num banho à temperatura de 95 °C durante 10 minutos, e de seguida num banho de gelo, cerca de 5 minutos. Este processo provoca um choque térmico, favorecendo a lise celular.

Centrifugou-se o tubo *Eppendorf* durante 2 minutos e 30 segundos a uma velocidade de 12000 rpm, ocorrendo a precipitação de biomassa. Para finalizar, retirou-se 70 µL do sobrenadante para outro tubo *Eppendorf*, estando o DNA pronto para amplificar e descartou-se o tubo que continha a biomassa. De notar, que o DNA foi conservado a -20 °C. Repetiu-se todo o procedimento para todos os isolados em análise, como se observa na Figura 9.

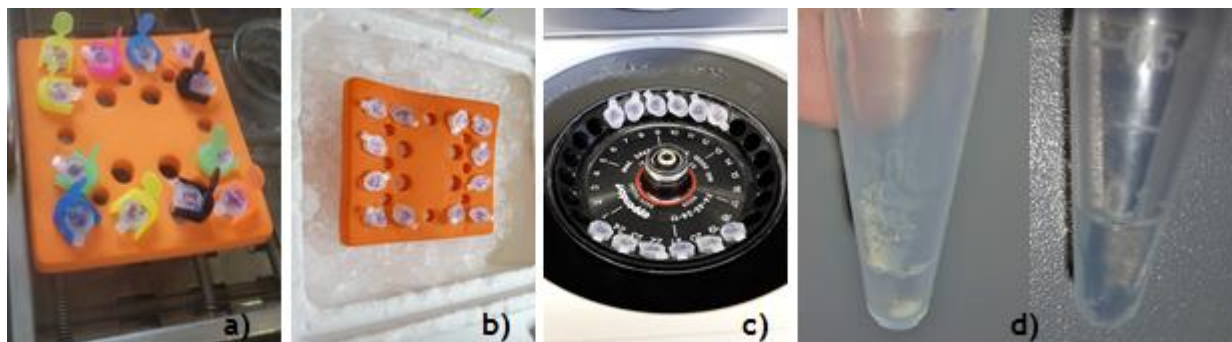


Figura 9: Processo para extração de DNA. a) Amostras colocadas no banho a 95 °C; b) Amostras colocadas no gelo; c) Centrifugação das amostras; d) Tubo Eppendorf com biomassa e com sobrenadante.

Os *Staphylococcus* apresentam uma parede celular espessa composta principalmente por glicopeptídeos, ácido teicoico e proteína A, que proporcionam um exoesqueleto rígido dificultando a sua lise (Chapaval *et al.*, 2008). Deste modo, para alguns isolados foi necessário proceder a uma extração de DNA com lisostafina, metaloenzima que possui uma ação lítica específica contra os microrganismos do género *Staphylococcus* (Hylary, 1970). Para a extração, uma porção de colónias frescas foi suspensa em 100 µL de Tris-EDTA (10 mM, pH:8,0) com lisostafina (2 mg/mL; Sigma-Aldrich, Milwaukee, Wisconsin, USA) (20:1, v/v) e incubou-se a 37 °C durante 3 horas. Ocorreu a lise das células e a degradação prosseguiu-se adicionando 100 µL de SDS (4%), incubando-se a mistura a 60 °C durante 1 hora. Decorrido esse tempo, adicionou-se proteinase K (10 mL; Qiagen, Hilden) e durante 1 hora a mistura permaneceu a 37 °C. O DNA foi extraído a partir dos resíduos celulares com 200 µL de uma solução de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1, v/v). A fase aquosa foi obtida depois de 10 minutos de centrifugação a 12000 rpm e precipitada em 100 µL de etanol frio. O extrato de DNA foi re-suspenso em 30 µL de água ultrapura.

2.2.3 Amplificação do gene que codifica o rRNA 16S

A amplificação do fragmento de DNA que codifica o RNA 16S ribossomal foi feita através da técnica da reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* ou *PCR*). As reações de PCR foram realizadas para um volume final de 50 µL por *Eppendorf*, sendo os reagentes necessários: 26,75 µL de água ultrapura; 5 µL de 10X tampão *Taq* com (NH₄)₂SO₄; 5 µL de MgCl₂ (25 mM); 10 µL de dNTP's (1 mM); 0,5 µL de *primer* 1 (100 µM); 0,5 µL de *primer* 2 (100 µM); 0,25 µL de enzima *Taq* polimerase (5 U/µL); e 2 µL de amostra de DNA molde. De notar que o *primer* 1 utilizado foi o 27F (5'-AGAGTTTGGATCMTGGCTCAG-3') e o *primer* 2 foi o 1492R (5'-CGGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Lane, 1991).

De seguida, as amostras foram inseridas num termociclador, onde ocorreu a desnaturação inicial do DNA a uma temperatura de 95 °C durante 5 minutos para separar as cadeias simples. No minuto seguinte a temperatura foi de 94 °C e posteriormente, diminuiu-se a temperatura para 55 °C durante 1 minuto para ocorrer o emparelhamento dos *primers*. Para complementar o ciclo é feita a síntese de DNA pela *Taq* polimerase a uma temperatura de 72 °C, durante 1 minuto e 30 segundos. O ciclo de desnaturação, emparelhamento e síntese é repetido 30 vezes no aparelho. Para terminar, a extensão final é realizada durante 10 minutos a 72 °C (Ferreira *et al.*, 2007).

Os fragmentos de DNA polimórficos foram analisados por eletroforese em gel 1,5% agarose em Tris-Acetate-EDTA (TAE), durante 35 minutos com aplicação de um campo elétrico de 90 V, utilizando como corante o Midori® que emite fluorescência em observação na luz ultravioleta e permite a observação dos fragmentos de DNA. Para tal, colocou-se em cada poço 5 µL das soluções de DNA juntamente com 2 µL de tampão de carregamento que confere peso e densidade à amostra permitindo a sua entrada no gel. Nos terminais dos poços de gel inseriu-se um controlo positivo e negativo para verificar se ocorreram contaminações e 2 µL de um marcador molecular. O gel foi depois fotografado num transiluminador da BioRad, permitindo verificar se as amostras foram ou não amplificadas, tendo o fragmento amplificado esperado aproximadamente 1500 pb.

2.2.4 Purificação, sequenciação e análise do gene 16S rRNA

Recorreu-se ao kit da Grisp® - *Protocol for PCR clean up*, com referencia GK01.0100, para proceder à purificação dos fragmentos obtidos.

Num tubo coletor contendo uma coluna colocaram-se 250 µL de *gel solubilization solution* e 50 µL de amostra de DNA. De modo a promover a adsorção das moléculas de DNA à parede da coluna, centrifugou-se o tubo durante 30 segundos a 14000 rcf e rejeitou-se o fluxo de passagem contido no tubo coletor.

Adicionaram-se 600 µL da solução *Wash buffer 2º* durante 1 minuto para permitir a adesão do DNA à matriz da coluna. Centrifugou-se durante 30 segundos a 14000 rcf, descartando-se o fluído do tubo coletor e centrifugou-se novamente 3 minutos a 14000 rcf.

Transferiu-se a coluna para um tubo microcentrifugado 1,5 mL e adicionou-se 50 µL da solução *Elution Buffer* diretamente para o centro da coluna sem tocar na membrana. Incubou-se durante 2 minutos à temperatura ambiente e findo esse tempo procedeu-se à última centrifugação a 14000 rcf por 2 minutos para eluir o DNA purificado.

No final destes procedimentos, descartou-se a coluna e o tubo conterá o gene que codifica o 16S rRNA na sua forma purificada e as amostras encontravam-se prontas para serem enviadas

à empresa de serviços (Macrogen®) para a sua sequenciação, conforme o método apresentado por Sanger *et al.* (1997). De notar que as amostras antes de serem enviadas foram conservadas a -20 °C.

Analisou-se a sequência do gene que codifica para o 16S rRNA utilizando o software Mega (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versão 6 que permite um alinhamento das sequências, inferir sobre as árvores filogenéticas e testar hipóteses evolucionistas das espécies (Kulmar *et al.*, 2004). Recorrendo à base de dados EzBioCloud (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>), comparou-se a sequência obtida com sequências aí depositadas visando obter informação relativa à percentagem de similaridade entre elas.

2.3 Determinação da resistência a antibióticos

A atividade antimicrobiana de antibióticos foi testada usando o método de difusão em agar como descrito anteriormente (Ferreira da Silva *et al.*, 2007). Foram estudados doze antibióticos representativos das diferentes classes (beta-lactâmicos, tetraciclina, sulfonamidas, fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e macrólidos) e outros para os quais os *Staphylococcus* apresentam alta prevalência ou resistência emergente. A lista completa encontra-se na Tabela 4.

O procedimento consistiu na preparação de uma suspensão de bactérias de cultivo recente, inoculação desta suspensão na superfície de uma placa de Mueller-Hinton Agar, e adição dos discos de papel impregnados com antimicrobianos. Para tal, com o auxílio de um palito estéril recolheu-se uma pequena quantidade de biomassa e mergulhou-se num tubo com solução salina estéril (0,85% (m/v) NaCl) até obter uma turvação equivalente a 0,5 unidades McFarland. Embebeu-se um zaragatoa estéril na suspensão bacteriana, comprimindo-a contra as paredes do tubo para tirar o excesso da suspensão e em seguida esfregou-se de forma suave em três direções na placa procurando abranger toda a superfície. Com um dispensador colocaram-se os discos, sobre a superfície do meio inoculado, exercendo uma leve pressão para uma boa adesão dos discos e incubaram-se as placas a 37±1 °C, durante 24±4 h.

Após a incubação, foi analisado o padrão de crescimento ou inibição ao redor de cada disco, Figura 10, sendo então medido o diâmetro de cada halo e os critérios de interpretação foram baseados nos diâmetros das zonas de inibição (mm) apresentados na Tabela 4, de acordo com o estudo realizado por Faria *et al.* (2009) e de acordo com a Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

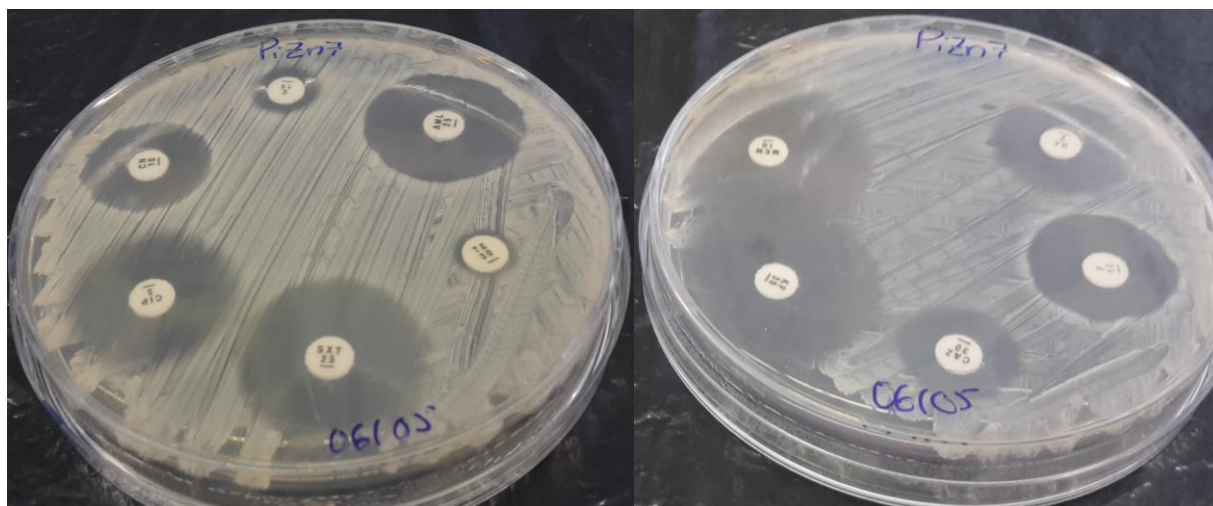


Figura 10: Antibiógrama de uma estirpe bacteriana pelo método de difusão por discos.

Tabela 4: Zonas de inibição para diferentes tipos de agentes antimicrobianos, em que R corresponde a um microrganismo resistente, I intermédio e S sensível. (adaptado de Faria *et al.* (2009) e CLSI (2011)).

Agente antimicrobiano	Conteúdo do disco	Diâmetros das zonas de inibição (mm)		
		S	I	R
Amoxicilina (AML)	25 µg	>21	14-20	<14
Tetraciclina (TET)	30 µg	≥19	15-18	≤14
Sulfametoxazol (SXT)	25 µg	≥16	11-15	≤10
Ciprofloxacina (CIP)	5 µg	≥21	16-20	≤15
Gentamicina (CN)	10 µg	≥15	13-14	≤12
Eritromicina (ERY)	15 µg	≥23	14-22	≤13
Clindamicina (CLI)	2 µg	≥21	15-20	≤14
Penicilina (PEN)	10 IU	>29	8-28	<8
Ceftazidima (CAZ)	30 µg	≥18	15-17	≤14
Cefalotina (KF)	30 µg	≥18	15-17	≤14
Meropenem (MEM)	10 µg	≥16	14-15	≤13
Oxacilina (OX)	1 µg	≥13	11-12	≤10

2.4 Detecção do gene *mecA*

O gene *mecA* foi detetado pela técnica de PCR, utilizando os *primers mecA1* (forward) 5'-GTAGAAATGACTGAACGTCCGATAA-3' e *primer mecA2* (reverse) 5'-CCAATTCCACATTGTTTCGGTCTAA-3' de acordo com Zhang *et al.*, 2004. As reações foram realizadas para um volume final de 25 µL e a mistura era composta por 1 x PCR tampão com KCl, 25 mM de MgCl₂, 10 mM de dNTPs, 10 µM de cada primer, 1 U/µL de Taq polimerase e 5 µL de DNA molde. Os ciclos da reação foram: 1 ciclo de 94 °C por 5 minutos; 30 ciclos de 94 °C por 1 minuto; 50 °C por 1 minuto; 72°C por 2 minuto; e extensão final de um ciclo a 72°C por 10 minutos. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% em TAE. A presença de fragmentos de 310 pb resultantes dos produtos de amplificação foram visualizados em transiluminador e fotografados (Zhang *et al.*, 2004; Faria *et al.*, 2009; Zhou, 2013). Recorrendo à base de dados Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), comparou-se a sequência de nucleótidos obtida com sequências aí depositadas visando obter informação relativa à percentagem de similaridade entre elas.

3 Resultados e Discussão

3.1 Enumeração de *Staphylococcus*

No período compreendido entre o dia 10 de março e 8 de abril de 2015 foram recolhidas e analisadas 14 amostras de água. Enumeraram-se os *Staphylococcus* em meio MSA e em meio MSA suplementado com tetraciclina ou sulfato de zinco ou sulfato de cobre pentahidratado.

Após o tempo de incubação de 48 horas, foram observadas todas as placas de Petri e determinadas as UFC por unidade de volume. Como já referido, os organismos do género *Staphylococcus* têm a capacidade de fermentar o manitol. O meio MSA contém como indicador de pH o vermelho de fenol. Assim, neste meio, as colónias típicas e atípicas são identificadas através de uma reação positiva quando o meio ao redor das colónias se torna amarelo e negativa quando permanece avermelhado, respetivamente. Na Figura 11 do Anexo 4 encontra-se um exemplo do resultado após o tempo de incubação de uma colheita para os diferentes meios em estudo.

Nas análises efetuadas foram encontradas um total de 1572 colónias, das quais 1458 (92,8% do total) apresentavam aspeto típico de bactérias *Staphylococcus* e 114 aspeto atípico. Na Tabela 5 apresenta-se o número de colónias típicas por 100 mL de água encontradas em cada meio de cultura e para cada colheita. Para os dados detalhados de cada amostra consultar as Tabelas do Anexo 4.

Tabela 5: Número de UFC típicas/100 mL de água para cada um dos meios e para cada colheita.

Data / Meio	MSA	MSA + TET	MSA + Zn	MSA + Cu
10/03/2015	$1,2 \times 10^4$	$9,0 \times 10^0$	$1,1 \times 10^4$	$1,6 \times 10^4$
12/03/2015	$1,0 \times 10^3$	$6,0 \times 10^0$	$5,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^3$
13/03/2015	$5,0 \times 10^2$	$8,0 \times 10^0$	0	$5,0 \times 10^2$
16/03/2015	$2,0 \times 10^2$	$7,5 \times 10^0$	0	$5,0 \times 10^1$
17/03/2015	$1,5 \times 10^2$	$6,5 \times 10^0$	$5,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^2$
18/03/2015	$6,5 \times 10^3$	$4,0 \times 10^0$	NE*	$6,0 \times 10^3$
23/03/2015	$5,0 \times 10^1$	$7,5 \times 10^0$	$1,0 \times 10^2$	$2,0 \times 10^2$
24/03/2015	$6,0 \times 10^2$	$9,0 \times 10^0$	$3,0 \times 10^2$	$5,0 \times 10^2$
25/03/2015	$1,5 \times 10^2$	$6,0 \times 10^0$	$4,2 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$
30/03/2015	$1,2 \times 10^4$	$2,0 \times 10^0$	$1,2 \times 10^4$	$9,3 \times 10^3$
31/03/2015	$1,2 \times 10^3$	$7,5 \times 10^0$	$1,7 \times 10^3$	$3,0 \times 10^3$
06/04/2015	$2,5 \times 10^2$	$4,0 \times 10^0$	$9,0 \times 10$	0
07/04/2015	$3,0 \times 10^2$	$7,0 \times 10^0$	$1,3 \times 10^2$	$2,5 \times 10^2$
08/04/2015	$1,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^1$	$7,0 \times 10^1$	$6,0 \times 10^2$

*NE - Não efetuado

De acordo com a Tabela 5 verifica-se que houve uma grande oscilação da densidade de UFC ao longo do período de colheita, com exceção para o meio MSA suplementado com tetraciclina cujos valores são da mesma ordem de grandeza. A densidade de *Staphylococcus* em MSA variou entre $5,0 \times 10^1$ e $1,2 \times 10^4$ UFC / 100 mL e em MSA+TET oscilou entre $2,0 \times 10^0$ e $1,0 \times 10^1$ UFC / 100 mL. Esta diferença entre a variação no número de bactérias por unidade de volume levou a que a percentagem de *Staphylococcus* isolados em meio MSA+TET tenha oscilado entre 0,08 e 15,0 (Tabela 6). Maior variação foi observada para os *Staphylococcus* isolados em meio MSA com metais, cuja concentração variou entre 0 e $1,6 \times 10^4$ UFC / 100 mL para o meio MSA+Cu e 0 e $1,2 \times 10^4$ UFC / 100 mL para o meio MSA+Zn.

Na Tabela 6 é possível observar a percentagem das UFC por mL de água nos meios suplementados em relação ao meio MSA. Relativamente ao zinco e ao cobre, a percentagem de UFC por mL na maioria das colheitas foi idêntica ou inferior às do meio MSA. Este resultado era esperado uma vez que vários estudos relatam as propriedades antimicrobianas de superfícies metálicas embora, segundo Espírito Santo *et al.* (2012), o mecanismo de ação, ou seja, a forma como o cobre mata os microrganismos ainda não esteja bem definido. Cervantes e Gutierrez-Corona (1994) e Weaver *et al.* (2010) referem que o mecanismo de ação do cobre pode estar relacionado com as suas alterações nos locais ativos de enzimas, com a mudança da integridade estrutural da membrana celular e com a degradação do DNA. Para o zinco, os mecanismos identificados incluem o sequestro por metalotioneínas, a acumulação extracelular, o sequestro intracelular e as bombas de efluxo (Choudhury e Srivastava, 2001; Rathnayake *et al.*, 2009).

Tabela 6: Percentagem de UFC por mL de água nos meios suplementados em relação ao meio MSA.

Data / Meio	MSA + TET	MSA + Zn	MSA + Cu
10/03/2015	0,08	91,7	133
12/03/2015	0,6	50,0	100
13/03/2015	1,6	0,00	100
16/03/2015	3,8	0,00	25,0
17/03/2015	4,3	33,3	66,7
18/03/2015	0,06	NE	93,1
23/03/2015	15,0	200	400
24/03/2015	1,5	50,0	83,3
25/03/2015	4,0	280	66,7
30/03/2015	0,02	98,7	77,7
31/03/2015	0,6	144,2	250
06/04/2015	1,6	36,0	0,00
07/04/2015	2,3	43,3	83,3
08/04/2015	0,1	0,7	6,00

*NE - Não efetuado

3.2 Efeito da precipitação, turvação e temperatura da água

A água natural contém uma grande variedade de microrganismos. A sua diversidade e quantidade são influenciadas por fatores, tais como a precipitação, turvação, temperatura pH, concentração de nutrientes e de poluente como os metais, entre outros.

Para aferir o comportamento da população microbiana perante as condições climáticas foram reunidos os valores de turvação e temperatura na água do Rio Paiva. Os dados da precipitação foram obtidos através do Instituto Português do Mar e da Atmosfera, registados pelo radar meteorológico da Serra da Freita, em Arouca (Anexo 3).

A Figura 12 mostra a temperatura e a turvação da água entre 10 de março e 8 de abril de 2015. Estes fatores foram relevantes no decorrer do presente estudo uma vez que têm influência na população microbiana do rio e sofreram variações significativas ao longo deste período.

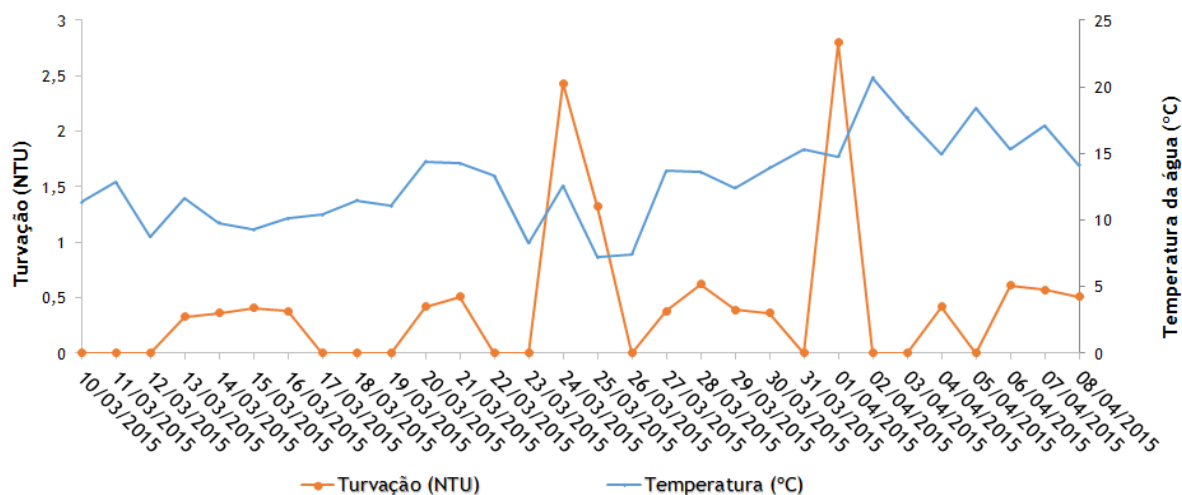


Figura 12: Variação da turvação e temperatura da água no período em que decorreu o estudo.

A turvação da água é originada pelas partículas em suspensão, as quais interferem com a dispersão dos raios luminosos através da água. A presença de sólidos em suspensão altera as condições de iluminação das águas e o alcance da radiação luminosa, influenciando a fotossíntese e o crescimento das plantas aquáticas e do plâncton.

Analisando a Figura 13 parece haver um efeito da turvação no crescimento de microrganismos, verificando-se que um aumento da turvação se traduziu numa diminuição da quantidade de *Staphylococcus*, e que na ausência ou baixa turvação a presença destes microrganismos foi superior.

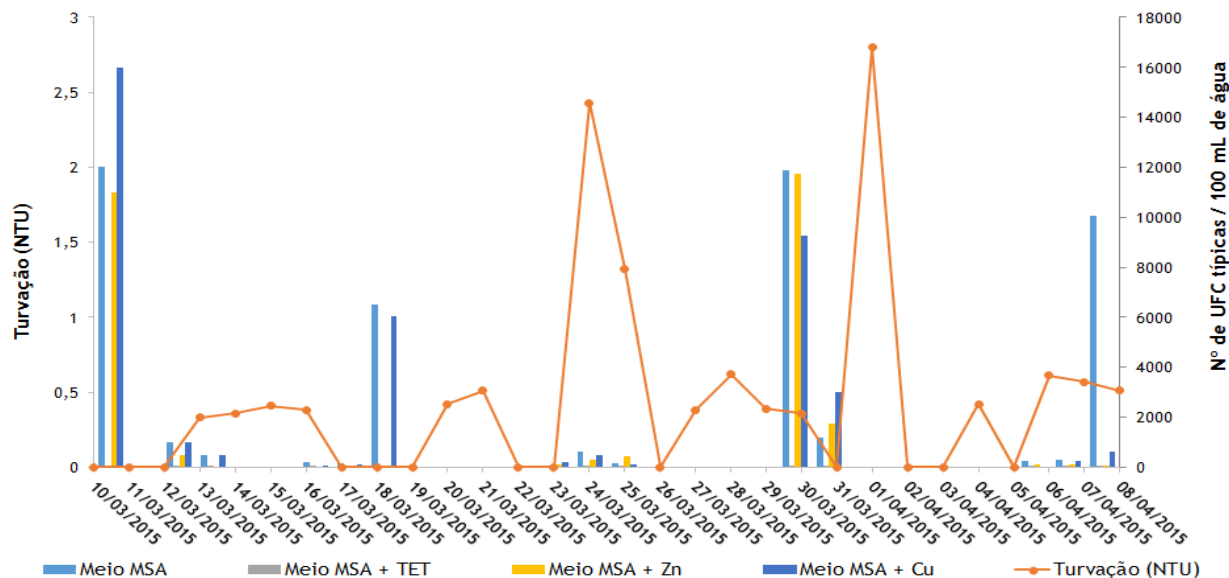


Figura 13: Variação do número de UFC típicas por 100 mL de água com a turvação.

As condições ambientais no que diz respeito à temperatura e ao pH também possuem um efeito importante na seleção, sobrevivência e crescimento de microrganismos. Todos os microrganismos se encontram adaptados a uma determinada faixa de temperatura e possuem uma temperatura ótima de crescimento, embora a maioria possa sobreviver dentro de limites mais amplos. Um aumento de temperatura pode traduzir-se numa morte térmica ou na inativação dos microrganismos. A análise dos resultados apresentados na Figura 14 sugere que a abundância de *Staphylococcus* não está relacionada com a temperatura da água.

De notar que as conclusões da interferência das características da água com o crescimento de colônias são insuficientes uma vez que não existem dados das colheitas para todos os dados de turvação e temperatura.

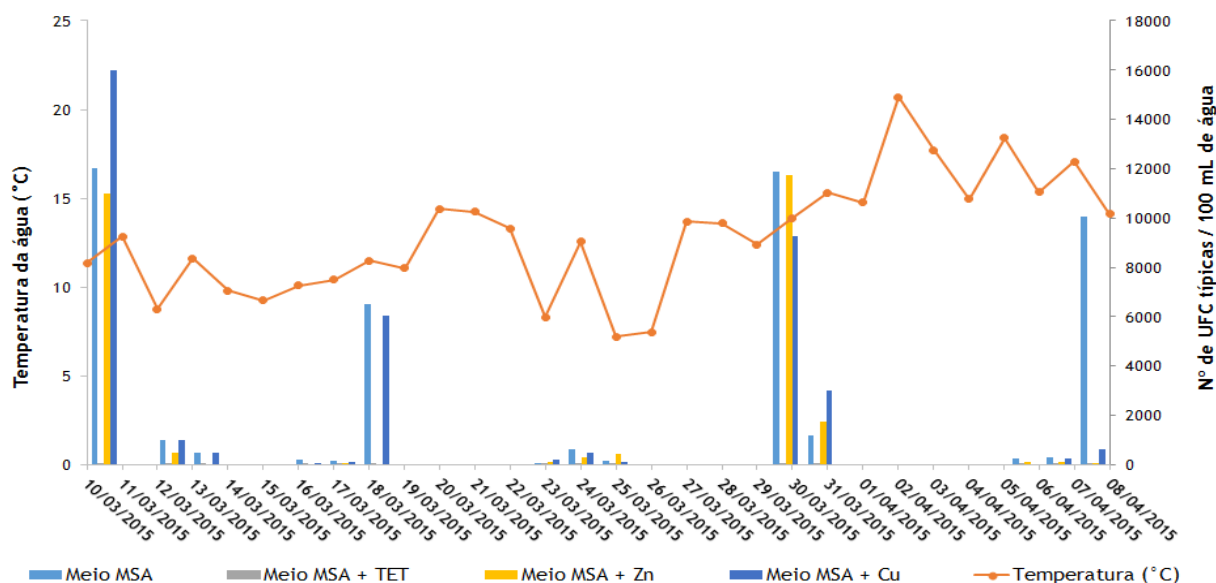


Figura 14: Variação do número de UFC típicas por 100 mL de água com a turvação.

3.3 Isolamento e Identificação de *Staphylococcus*

Selecionaram-se 227 colónias das 1548 que apresentaram um aspeto típico de *Staphylococcus*, sendo examinados um total de 56 isolados do meio MSA, 64 isolados em meio MSA suplementado com tetraciclina, 48 do meio MSA suplementado com sulfato de zinco e 59 do meio MSA suplementado com sulfato de cobre pentahidratado. Os isolados foram identificados por um código constituído por letras e números, sendo que P representa o local da colheita (Rio Paiva); a letra seguinte representa o dia de colheita; MSA, TET, Zn e Cu designam o meio de cultura; e, finalmente, o último número significa o número da colónia isolada em cada colheita.

Os isolados que apresentaram estrutura cocos Gram-positivo, produtores de catalase, oxidase negativa e que metabolizam o açúcar por via oxidativa e por fermentativa (anaeróbios facultativos) foram considerados *Staphylococcus*. Estes testes permitiram diferenciar os *Staphylococcus* de outros géneros com os quais se poderiam confundir, nomeadamente *Enterococcus* (catalase negativo) e *Micrococcus* (O+ F-). No Anexo 5 encontra-se a tabela com todos os isolados e respetivos resultados para cada teste referido anteriormente.

A abundância de *Staphylococcus* na água do rio foi mais baixa do que estimada presuntivamente acima, pois apenas 17% (39/227) dos isolados foram confirmados como sendo *Staphylococcus*. Entre os meios usados para isolamento de *Staphylococcus*, o meio MSA+TET foi o que apresentou uma taxa de recuperação mais elevada (28%), confirmando 18 *Staphylococcus* dos 64 isolados. O meio menos eficaz foi o meio suplementado com zinco, cuja recuperação foi de apenas 10% (5 *Staphylococcus* confirmados em 48 isolados).

Relativamente ao meio MSA e MSA+Cu as taxas de recuperação foram de 14%, sendo confirmados 8 *Staphylococcus* dos isolados para cada meio. De notar que apenas um isolado confirmado (PnMSA7) apresentou reação positiva ao teste da coagulase.

Para a confirmação da identificação dos isolados como *Staphylococcus*, bem como para a sua distinção ao nível de espécie, recorreu-se à análise e sequenciação do gene que codifica o 16S rRNA. Para tal, realizou-se uma reação de PCR que necessita da presença da sequência de DNA que se quer amplificar, de um par de primers 27F e 1492R, de nucleótidos e de uma enzima para síntese de DNA, como a *Taq polimerase*. Como resultado da reação foram obtidos fragmentos com cerca de 1500 pb, tal como exemplifica a Figura 15, correspondentes ao tamanho do gene que se desejou amplificar. Note-se que foi obtida a banda amplificada de 1500 pb para todos os isolados em estudo.

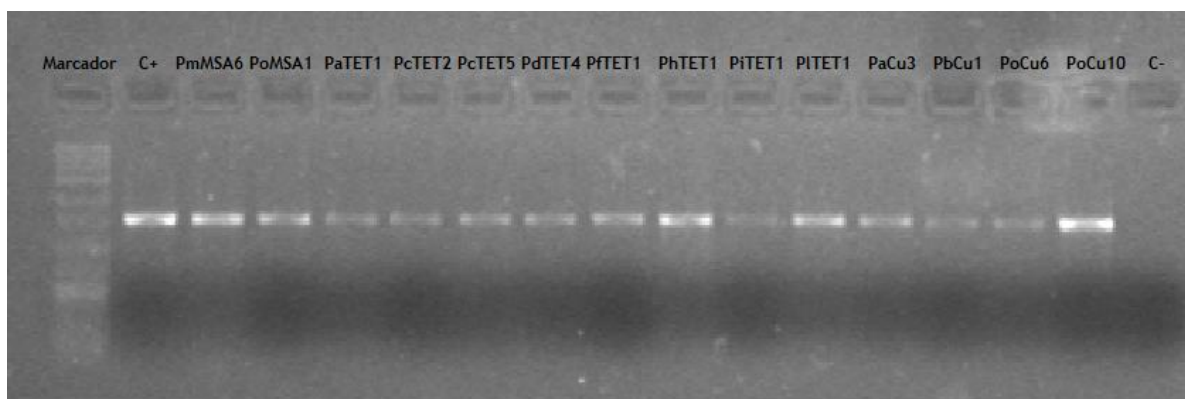


Figura 15: Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de PCR de alguns isolados (Marcador corresponde a um marcador de peso molecular da Grisp®, C+ representa um controlo positivo e C- um controlo negativo ou branco).

A análise da sequência dos cerca primeiros 900 nucleótidos, através da base de dados EzBioCloud (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>), demonstrou que do total de trinta e nove isolados sequenciados, *S. saprophyticus* foi a única espécie a ser isolada em todos os meios, sendo dominante no meio suplementado com cobre. Os resultados de identificação ao nível da espécie encontram-se na Tabela 7 e a sua distribuição em cada meio pode ser observada na Figura 16.

Tabela 7: Identificação dos isolados com base na análise da sequência do gene para o 16S rRNA por consulta da base de dados da EzTaxon.

Designação Isolado	Espécie	% Similaridade
PcMSA1	<i>S. hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i> GTC 1228 ^T	99,87
PgMSA2	<i>S. hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i> GTC 1228 ^T	99,89
PmMSA6	<i>S. hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i> GTC 1228 ^T	99,88
PnMSA7	<i>S. aureus</i> subsp. <i>anaerobius</i> ATCC 35844	100
PoMSA1	<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>bovis</i> GTC 843 ^T	100
PoMSA2	<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i> ATCC 15305 ^T	99,87
PoMSA4	<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i> ATCC 15305 ^T	100
PoMSA5	<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>bovis</i> GTC 843 ^T	99,75
PaTET1	<i>S. equorum</i> subsp. <i>equorum</i> ATCC 43958 ^T	99,65
PcTET1	<i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i> ATCC 29974 ^T	100
PcTET2	<i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i> ATCC 29974 ^T	100
PcTET5	<i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i> ATCC 29974 ^T	100
PdTET2	<i>S. equorum</i> subsp. <i>equorum</i> ATCC 43958 ^T	100
PeTET3	<i>S. epidermidis</i> ATCC 14990 ^T	100
PfTET1	<i>S. equorum</i> subsp. <i>equorum</i> ATCC 43958 ^T	99,65
PfTET4	<i>S. vitulinus</i> ATCC 51145 ^T	98,81
PfTET5	<i>S. equorum</i> subsp. <i>equorum</i> ATCC 43958 ^T	100
PgTET1	<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i> ATCC 15305 ^T	99,89
PhTET1	<i>S. lentus</i> ATCC 29070 ^T	97,04
PhTET2	<i>S. lentus</i> ATCC 29070 ^T	100
PiTET1	<i>S. equorum</i> subsp. <i>equorum</i> ATCC 43958 ^T	99,65
PiTET2	<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i> ATCC 15305 ^T	100
PlTET1	<i>S. equorum</i> subsp. <i>equorum</i> ATCC 43958 ^T	99,65
PlTET5	<i>S. lentus</i> ATCC 29070 ^T	100
PnTET4	<i>S. vitulinus</i> ATCC 51145 ^T	99,87
PoTET2	<i>S. lentus</i> ATCC 29070 ^T	100
PiZn6	<i>S. epidermidis</i> ATCC 14990 ^T	100
PiZn7	<i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i> ATCC 29974 ^T	100
PlZn1	<i>S. warneri</i> ATCC 27836 ^T	99,88
PnZn1	<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>bovis</i> GTC 843 ^T	99,76
PnZn5	<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>bovis</i> GTC 843 ^T	99,76
PaCu3	<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i> ATCC 15305 ^T	99,65
PbCu1	<i>S. epidermidis</i> ATCC 14990 ^T	99,77
PjCu1	<i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i> ATCC 29974 ^T	100
PlCu6	<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>bovis</i> GTC 843 ^T	99,75
PoCu6	<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>bovis</i> GTC 843 ^T	99,76
PoCu7	<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>bovis</i> GTC 843 ^T	99,76
PoCu10	<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>bovis</i> GTC 843 ^T	99,77
PoCu12	<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i> ATCC 15305 ^T	99,88

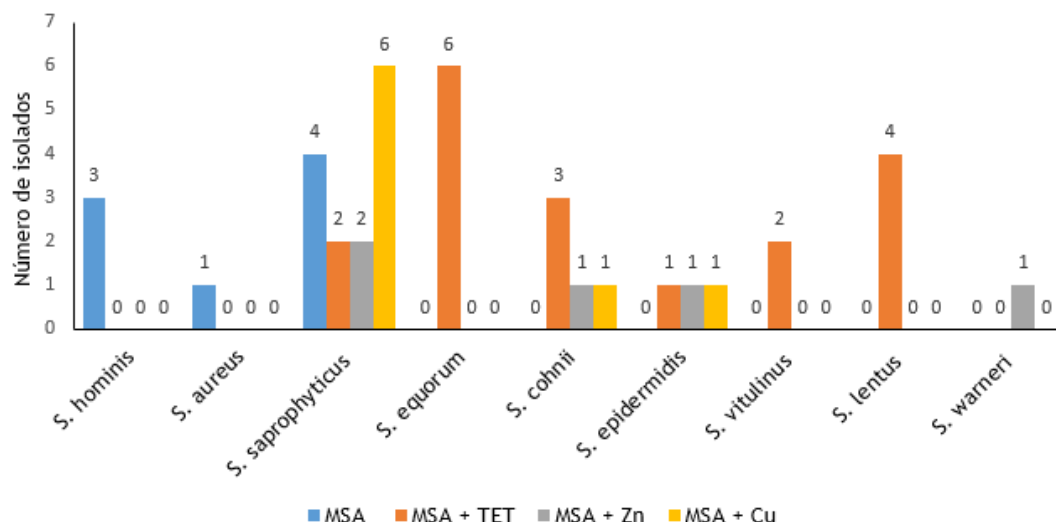


Figura 16: Distribuição das diferentes espécies de *Staphylococcus* para cada meio em estudo.

Observando a Figura 16 constata-se que a espécie *S. hominis* e *S. aureus* apenas apresentaram crescimento no meio MSA e as espécies *S. equorum*, *S. vitulinus* e *S. lentus* apenas cresceram em meio MSA suplementado com tetraciclina. O meio suplementado com zinco também foi seletivo para a espécie *S. warneri*.

S. saprophyticus foi a espécie mais frequentemente isolada, tendo crescido em todos os meios, resultado que vai de encontro ao estudo feito por Serapicos (2008) em águas residuais brutas e tratadas. Faria *et al.* (2009) também encontrou uma maior prevalência desta espécie em estações de tratamento de águas residuais. *S. saprophyticus* existe em número reduzido na pele, mucosas e intestino, trata-se de um frequente agente etiológico de cistites (infecção urinária baixa-zona da bexiga). Esta espécie predomina em infecções urinárias por *Staphylococcus*, pois possui uma maior capacidade de aderência às células epiteliais do trato urinário (Ferreira *et al.*, 2010).

S. epidermidis faz parte da flora normal da pele, sendo considerado um patógeno oportunista que pode colonizar válvulas cardíacas, cateteres intravasculares. O principal fator de virulência é a sua capacidade de aderência a materiais sintéticos, pela produção de uma substância de natureza mucopolissacarídica (*slime*, em língua inglesa), que aumenta a aderência do microrganismo a superfícies inertes, formando biofilme que funciona como uma barreira protegendo-o contra a ação de antibióticos, anticorpos e mecanismos de defesa do hospedeiro (Ferreira e Sousa, 2000; Huebner *et al.*, 1999). As características físico-químicas do biofilme conferem às bactérias que o produzem resistência aos antimicrobianos, desinfetantes e germicidas (Donlan e Costerton, 2002).

Apenas um isolado foi identificado como *S. aureus* não apresentando qualquer fenótipo de resistência. *S. aureus* é o agente mais comum de infecções patogênicas no homem, causando

várias infecções como síndrome da pele queimada, pneumonia, meningite, endocardite, amigdalite, entre outras. As doenças causadas por esta espécie podem ocorrer pela produção de toxinas, como é caso das intoxicações alimentares, ou devido à invasão e destruição tecidual (Jorge, 2012). As principais fontes de intoxicação relatadas na literatura são os alimentos derivados do leite (Jorgensen *et al.*, 2005; Tebaldi *et al.*, 2008; Thaker *et al.*, 2013). Esta espécie também já foi descrita em águas de rios e águas potáveis (Abulreesh, 2014; Harakeh *et al.*, 2006; Mulamattathil, 2014).

S. hominis e *S. haemolyticus* são principalmente isolados das axilas (ANVISA, 2010; Ferreira *et al.*, 2010). Neste estudo, a presença de *S. hominis* apenas ocorreu em meio MSA e não foi isolado nenhum *S. haemolyticus*.

3.4 Determinação da resistência a antimicrobianos

A resistência bacteriana ocorre quando a bactéria evolui, possuindo mecanismos de resistência, para combater o modo de ação do fármaco. A sensibilidade da bactéria ao antibiótico assume um papel importante no sucesso terapêutico uma vez que o antibiótico a ser usado para o tratamento de determinada infecção deve ser selecionado após a identificação e determinação de sua sensibilidade ao fármaco.

O antibiograma permite determinar em laboratório, o grau de sensibilidade de um microrganismo a determinados antibióticos ou antibacterianos. Com o objetivo de se conhecer a resposta dos isolados à presença de um conjunto de antibióticos, referidos anteriormente na seção 2.4, realizaram-se testes de avaliação do perfil de suscetibilidade a agentes bacterianos através do método de difusão em disco.

Os resultados, Tabela 8, permitiram através da medição dos diâmetros de inibição (mm) caracterizar os microrganismos como resistente (cor alaranjada), intermédio (cor cinza) ou suscetível (incolor). De notar que os critérios utilizados para esta designação estão apresentados na Tabela 4 e estão de acordo com a Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

Tabela 8: Halos de inibição (mm) dos isolados *Staphylococcus spp.* para as diferentes classes de antibióticos.

	Classe de antibiótico											
	B-lactâmicos						Tetraciclina	Sulfonamidas	Fluoroquinolonas	Aminoglicosídeos	Macrólidos	Lincosamidas
Isolado	AML	PEN	OX	CAZ	KF	MEM	TET	SXT	CIP	CN	ERY	CLI
PcMSA1	24	18	29	22	36	40	30	23	29	24	0	0
PgMSA2	33	23	23	18	42	40	32	31	36	20	31	26
PmMSA6	21	20	31	24	31	30	28	25	24	26	28	29
PnMSA7	23	32	21	20	34	32	21	23	21	22	25	28
PoMSA1	30	24	22	17	31	32	26	31	28	25	26	27
PoMSA2	32	28	20	17	34	36	30	32	29	26	25	31
PoMSA4	34	30	14	20	32	33	31	33	30	28	29	27
PoMSA5	30	32	19	17	27	31	28	30	27	26	26	30
PaTET1	42	40	21	38	42	42	14	34	36	34	26	24
PcTET1	33	23	20	17	28	30	9	30	26	25	18	20
PcTET2	30	30	26	20	40	34	20	33	33	25	28	21
PcTET5	34	26	21	17	31	32	8	30	25	24	15	16
PdTET2	40	32	24	27	40	38	10	30	27	24	27	27
PeTET3	23	19	22	26	33	40	26	26	25	21	0	26
PfTET1	40	36	24	22	36	38	7	26	23	25	12	25
PfTET4	35	32	23	20	34	35	0	24	22	22	26	25
PfTET5	35	33	27	23	32	32	12	33	29	28	17	29
PgTET1	29	28	21	17	26	30	7	24	22	23	12	30
PhTET1	22	16	19	8	12	15	0	30	31	24	0	22

Legenda: Cor alaranjada - microrganismo resistente; Cor cinza - microrganismo com resistência intermédia; Incolor- Microrganismo suscetível.

Tabela 8 (continuação): Halos de inibição (mm) dos isolados *Staphylococcus spp.* para as diferentes classes de antibióticos.

Isolado	Classe de antibiótico											
	B-lactâmicos						Tetraciclinas	Sulfonamidas	Fluoroquinolonas	Aminoglicosídeos	Macrólidos	Lincosamidas
	AML	PEN	OX	CAZ	KF	MEM	TET	SXT	CIP	CN	ERY	CLI
PhTET2	36	32	15	21	34	36	0	30	28	26	32	20
PiTET1	34	36	22	26	34	36	21	28	30	24	10	26
PiTET2	31	24	26	16	22	23	0	28	25	23	24	26
PlTET1	44	42	21	20	41	32	14	30	33	27	15	----
PlTET5	36	31	20	22	30	36	0	25	27	22	0	0
PnTET4	42	38	23	24	36	38	0	28	29	25	23	30
PoTET2	36	32	18	24	36	40	10	24	28	26	9	15
PiZn6	19	17	21	30	32	37	9	24	20	23	15	25
PiZn7	26	20	23	15	27	28	8	24	23	19	9	17
PlZn1	34	32	28	18	24	36	26	30	24	18	20	----
PnZn1	32	40	24	25	40	40	32	33	33	32	24	32
PnZn5	35	22	18	15	27	30	23	28	27	24	25	30
PaCu3	26	20	16	16	32	34	30	29	26	24	0	28
PbCu1	38	39	32	19	42	35	23	30	30	22	9	29
PjCu1	36	35	21	10	34	32	27	38	29	22	27	20
PlCu6	22	19	17	25	32	39	27	29	29	27	30	25
PoCu6	33	32	18	0	0	0	30	31	26	24	28	25
PoCu7	35	37	16	12	34	32	25	34	29	22	28	22
PoCu10	30	26	20	15	29	31	28	31	28	24	26	27
PoCu12	28	34	18	16	28	31	25	30	27	23	27	27

De forma geral, os microrganismos apresentam perfis de resistência mais elevados para a tetraciclina (56% de isolados resistentes) seguida da eritromicina (28% de isolados resistentes). Não foram verificados perfis de resistência para a amoxicilina, penicilina, oxacilina, sulfametoxazol, ciprofloxacina e gentamicina.

Para os isolados do meio MSA, a resistência aos antibióticos em estudo foi praticamente nula, só havendo um isolado (PcMSA1) resistente à eritromicina e clindamicina. Relativamente aos isolados do meio MSA+TET e MSA+Zn, estes demonstraram perfis de resistência elevados para a tetraciclina e eritromicina.

Vários estudos anteriores também relataram a resistência a antibióticos em *Staphylococcus* isolados em águas residuais, poluídas e água potável. Kessie *et al.* (1998) identificou *Staphylococcus* não produtores de coagulase isolados de água poluída resistentes ao cloranfenicol e eritromicina. Serapicos (2008) observou uma alta frequência de resistência à lincomicina, eritromicina, clindamicina e gentamicina e uma baixa frequência de isolados resistentes à penicilina em água coletadas de uma estação de tratamento de águas residuais. Faria *et al.* (2009) constatou uma alta percentagem de isolados resistentes à eritromicina, tetraciclina, clindamicina e eritromicina em águas residuais e em água potável. Basso *et al.* (2014) reportou uma elevada frequência de resistência à eritromicina e nenhuma resistência a gentamicina e ciprofloxacina, em isolados de águas poluídas do córrego Dilúvio. Neste trabalho, não se procedeu à realização do estudo dos mecanismos de resistência utilizados por estes isolados, no entanto poderá ser efetuado em trabalhos subsequentes.

A presença de metais no ambiente também pode fortalecer a propriedade de multirresistência aos antibióticos. Segundo Baker-Austin *et al.* (2006) a presença de iões metálicos afeta a resistência aos antibióticos através de dois mecanismos: (i) co-resistência, que consiste na presença de diferentes determinantes de resistência presentes no mesmo elemento genético e (ii) resistência cruzada, causada pela presença de iões comuns em metais e antibióticos. Malik e Aleem (2011), num estudo de água do rio, de solo agrícola irrigado com águas residuais e de águas subterrâneas, verificaram que a maioria dos isolados de *Pseudomonas* da água e do solo apresentaram resistência a múltiplos metais (Hg, Cd, Pb, Cu, Zn, Ni) e antibióticos (na água - tetraciclina e polimixina B; no solo- sulfadiazina, ampicilina e eritromicina).

Gu e Karthikeyan (2005) também analisaram a influência de óxido hidratado de alumínio (Al) e ferro (Fe) no destino ambiental e na transformação de tetraciclina. Os resultados indicaram que Al e Fe, componentes importantes de partículas ambientais, podem influenciar a mobilidade e reatividade ambiental da tetraciclina, bem como a capacidade da tetraciclina de formar complexos fortes com Fe e Al, o que irá aumentar a solubilidade destes minerais. Chudobova *et al.* (2014) também estudaram os efeitos dos antibióticos (ampicilina,

estreptomicina, penicilina e tetraciclina) e efeitos de iões de metais pesados (cádmio ou chumbo) em *Staphylococcus*. Os resultados demonstraram um efeito antimicrobiano significativo de penicilina e tetraciclina, tanto na estirpe de controlo como nas estirpes resistentes a iões de metais pesados. Também Yazdankhah *et al.* (2014) num estudo feito em animais de criação concluiu que a resistência ao zinco é associada com a resistência à meticilina em *Staphylococcus* e a suplementação de Zn para a alimentação animal pode aumentar a proporção de *Escherichia coli* multirresistentes no intestino. A resistência ao Cu em bactérias, em particular os enterococos, é relacionada com resistência a antimicrobianos, como macrólidos (por exemplo, eritromicina) e glicopéptidos (por exemplo, vancomicina). Os genes de resistência destas bactérias são localizadas em plasmídeos, que podem ser transferidos dos animais para os seres humanos (agricultores, veterinários, e consumidores).

Analisando a Tabela 8 verifica-se que os isolados do meio suplementado com zinco apresentaram um perfil de resistência maior para a tetraciclina e eritromicina e um perfil de suscetibilidade para os restantes antibióticos. Os isolados do meio suplementado com cobre apresentaram resistência para a ceftazidima, cefalotina, meropenem e eritromicina. Apesar de se verificar esta relação entre os isolados do meio com metais e os antibióticos, como os isolados destes meios foram apenas 13 (5 isolados do meio MSA+Zn e 8 isolados do meio MSA+Cu) não é possível concluir que houve uma co-seleção entre metais e antibióticos.

Como o objetivo era averiguar o possível efeito de pressão seletiva ou de resistência cruzada, os resultados foram analisados através de uma correlação de Pearson. Contudo, não foi encontrada nenhuma correlação positiva entre resistência a tetraciclina, a mais abundante, e qualquer outro antibiótico testado.

3.5 Detecção do gene *mecA*

A deteção laboratorial do gene que confere resistência à meticilina foi feita através da técnica PCR para todos os isolados. Por definição, a presença do gene *mecA* é responsável pelo fenótipo de resistência à meticilina em *Staphylococcus* (Fang e Hedin, 2003). A resistência é devida à produção de β -lactamases, enzimas que destroem o anel β -lactâmico das penicilinas. A β -lactamase predominante é do tipo A, sendo a sua produção codificada por genes localizados em plasmídeos ou transposões, facilmente transmissíveis entre *Staphylococcus* (Gordon e Lowy, 2008).

Na Figura 17 apresenta-se os produtos de amplificação das reações que foram visualizados em transiluminador e fotografados. Apenas um dos isolados (PgMSA2) identificado à espécie *S. hominis subsp. novobiosepticus* apresentou uma banda característica de aquisição do gene *mecA* (Zhang *et al.*, 2004), confirmada posteriormente por sequenciação. A sequência de nucleótidos amplificada (310 pb) apresentou 99% de similaridade com o gene *mecA* de *S. aureus* KM505042.1. Este organismo apresentou o gene mas é sensível aos antibióticos β -lactâmicos testados. O gene cromossômico *mecA* produz uma proteína de ligação à penicilina (PBP), PBP2a, com baixa afinidade para os antibióticos aos β -lactâmicos (Ferreira *et al.*, 2010), portanto seria esperado que a estirpe PgMSA2 apresentasse resistência para esta classe de antibióticos. Este resultado aparentemente contraditório parece indicar que embora presente, o gene *mecA* não é expresso neste isolado.

As estirpes de estafilocos meticilina-resistentes estão na base de importantes problemas terapêuticos uma vez que são também resistentes a outros antibióticos, incluindo eritromicina, clindamicina, tetraciclina e aminoglicosídeos (Ferreira e Sousa, 2000; Rehm e Tice, 2010). Contudo, neste estudo nenhum dos isolados resistentes a mais do que uma classe de antibióticos apresentou resistência a beta-lactâmicos.



Figura 17: Gel de agarose 1,5% resultante do PCR para detecção da banda característica para o gene *mecA* (banda 310 pb); Marcador corresponde a um marcador de peso molecular da Grisp®, MRSA1 e MRSA2 representam controles positivos e C- controle negativo ou branco.

4 Conclusões

Quanto à caracterização microbiana inicial pode referir-se que os meios seletivos em estudo permitiram enumerar presuntivamente *Staphylococcus* na água do rio, sendo que o meio MSA foi o que permitiu obter um maior número de UFC típicas por 100 mL de água, meio que é seletivo para *Staphylococcus* devido à sua elevada concentração de NaCl. O meio suplementado com 1 mg/L tetraciclina foi o que apresentou um menor número de UFC típicas por 100 mL, demonstrando que uma pequena percentagem de bactérias capazes de crescer em MSA e fermentar o manitol são resistentes a este antibiótico. Os meios enriquecidos com soluções metálicas apresentaram crescimento de UFC típicas por 100 mL na ordem de grandeza do meio MSA.

A análise das condições físicas e químicas da água, permitiu constatar que estas interferem na quantidade de microrganismos encontrados em ambiente aquático. Em relação à turvação verificou-se que um aumento deste fator se traduziu numa diminuição da quantidade de *Staphylococcus* e a sua ausência permitiu uma maior presença destes microrganismos. Quanto à temperatura, a análise dos resultados concluiu que a abundância de *Staphylococcus* não está relacionada com a temperatura da água. Contudo, as conclusões da interferência destes parâmetros com o crescimento de colónias são insuficientes uma vez que não existem dados das colheitas para todos os dados de turvação e temperatura.

Relativamente à confirmação de isolados apenas 17% (39/227) foram confirmados como *Staphylococcus*. O meio que apresentou maior recuperação de *Staphylococcus* foi o meio MSA+TET 28% (18/64) e o meio MSA+Zn foi o que recuperou menos *Staphylococcus* 10% (5/48). Nove espécies de *Staphylococcus* foram detetadas e as mais frequentes foram *S. saprophyticus* (36%) e *S. cohnii* (16%).

Nos 39 isolados confirmados como *Staphylococcus* foi observado que para os isolados do meio MSA, predominaram perfis de suscetibilidade, só havendo um isolado resistente à eritromicina e clindamicina. Relativamente aos isolados do meio MSA+TET e MSA+Zn, estes demonstraram perfis de resistência elevados para a tetraciclina e eritromicina e os isolados do meio MSA+Cu apresentaram maioritariamente perfis de suscetibilidade às diferentes classes de antibióticos, havendo algumas resistências à família dos B-lactâmicos e macrólidos.

Não foram verificados perfis de resistência para a amoxicilina, penicilina e oxacilina sulfametoxazol, ciprofloxacina e gentamicina.

A deteção genotípica do gene *mecA*, que confere resistência à meticilina, foi verificada em apenas um dos isolados do meio MSA. Contudo, apesar desta característica fenotípica o isolado não apresentou nenhuma resistência aos antibióticos em estudo.

A solução para a problemática de resistência a antimicrobianos não está na síntese de novos fármacos, nem na modificação dos pré-existentes, mas sim na utilização moderada e responsável dos mesmos, recorrendo a campanhas de consciencialização para o perigo da automedicação e desenvolvimento da resistência a antibióticos. Por último, importa salientar que este estudo, pela sua reduzida dimensão, dá-nos meramente indicações sobre a problemática da resistência a antibióticos em águas naturais.

4.1 Objetivos Realizados

Avaliou-se a prevalência de *Staphylococcus* em água natural e averiguou-se a sua resistência em meio suplementado com 1 mg/L tetraciclina, 1 mM de sulfato de zinco e 1 mM de sulfato de cobre pentahidratado. Para além disso, determinou-se a prevalência de resistência dos isolados a doze antibióticos representativos das classes beta-lactâmicos, tetraciclinas, sulfonamidas, fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e macrólidos pelo método de difusão em agar.

4.2 Limitações e Trabalho Futuro

A principal limitação deste trabalho foi o tempo em que decorreu o trabalho (um mês) que não permitiu efetuar mais colheitas da água do rio. Ocorreram também dificuldades de contagem e isolamento nos meios de cultura iniciais devido à presença de outras bactérias interferentes e dificuldades em corrigir os volumes a filtrar (diluições) uma vez que para eliminar ou reduzir as colónias atípicas por vezes perdiam-se as típicas.

No futuro, seria interessante continuar este estudo para saber se a baixa prevalência de *Staphylococcus* resistentes a antibióticos no rio Paiva se mantém ou se pode vir a ser alterada e avaliar a presença de resistência a outros antibióticos e outros efeitos sinérgicos.

Uma vez que os resultados deste estudo parecem indicar haver correlação entre os parâmetros físico-químicos da água e a abundância de *Staphylococcus*, sugere-se a inclusão destes parâmetros em futuros trabalhos.

Além disso, seria interessante avaliar a sua presença em água destinada ao consumo humano, tanto em redes de abastecimento público, como em captações particulares e fontanários.

4.3 Apreciação final

O trabalho desenvolvido foi muito gratificante, permitindo a aplicação de competências e saberes adquiridos durante o Mestrado. Esta etapa final possibilitou-me o contacto com o mundo laboral, um momento enriquecedor e de aprendizagem para quem só teve a experiência académica. O trabalho em vários laboratórios permitiu o contacto com diferentes metodologias de trabalho e uma aprendizagem de várias técnicas.

Penso que fica muito por dizer deste processo e alguma dificuldade em quantificar a grandeza da minha aprendizagem. Enalteço a relação pessoal e afetiva muito positiva com todos os elementos que fizeram parte, direta ou indiretamente, deste meu percurso.

Referências

1. AdDP (Águas do Douro e Paiva, Grupo Águas de Portugal), 2007. *Os rios - Rio Paiva* [Versão eletrônica]. Disponível em: <http://www.addp.pt/pt/dados.php?ref=rios>. Acedido em 18 de Maio de 2015.
2. Abulreesh HH. *Absence of vancomycin-resistance genes in Staphylococcus aureus isolated from potable water*. Journal of Public Health and Epidemiology, 6(2), pp. 70-75, 2014.
3. Al Masalma M, Raoult D e Roux V. *Staphylococcus massiliensis sp. nov., isolated from a human brain abscess*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 60, pp.1066-1072, 2010.
4. Área Metropolitana do Porto (AMP). *Relatório Final Anexo A- Sistemas Estruturantes Paiva*. Fevereiro de 2009.
5. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). *Módulo 3: Principais Síndromes Infecciosas*. Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção relacionada à Assistência à Saúde. (2010).
6. Alves C e Lemos F. *Deteção de genes da resistência antimicrobiana em cromossomos e plasmídeos da Staphylococcus spp.* Arquivo do Instituto de Biologia, 74(3), pp. 2007-2013, São Paulo, 2007.
7. APHA. Standard methods for the examination of water and waste water. 21st ed. Washington, DC: American Public Health Association (2005).
8. ARH-N, 2011b. Plano de Gestão da Região hidrográfica do Douro, RH3. *Relatório Técnico*. Administração da Região Hidrográfica do Norte I.P.
9. ARH-N, 2011c. Plano de Gestão da Região hidrográfica do Douro, RH3. *Relatório Técnico Anexo II - Informação adicional*. Administração da Região Hidrográfica do Norte I.P.
10. Azevedo, Carlos (coord.). *Biologia Celular e Molecular*. 4^aEd. Lidel, 2005.
11. Baker-Austin C, Wright MS, Stepanauskas R e McArthur JV. *Co-selection of antibiotic and metal resistance*. Trends Microbiol., 14, pp.176-182, 2006.
12. Bakken JS. The fluoroquinolones: How long will their utility last? Scandinavian Journal of Infectious Diseases. 36(2), pp. 85-92, 2004.
13. Barroso H, Meliço-Silvestre A e Taveira N. *Microbiologia Médica - Volume 1*. Lidel, 2014. ISBN: 978-989-752-057-0.
14. Basso AP, Martins Pd, Nachtigall G, Sand SV,mp Moura TM e Frazzon AP. Antibiotic resistance and enterotoxin genes in Staphylococcus sp. isolates from polluted water in Southern Brasil. Anais da Academia Brasileira de Ciências, 86(4), pp.1813-1820, 2014.
15. Boaventura R. (2004). *Avaliação da qualidade da água do Rio Paiva em termos microbiológicos e de nutrientes*. Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto.
16. Borghi AA e Palma MSA. *Tetracycline: production, waste treatment and environmental impact assessment*. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 50(1), pp.25-40, 2014.
17. Brown J. *Ancient horizontal gene transfer*. Nat. Rev. Genet., 4, pp. 121-132, 2003.
18. Casey AL, Adams D, Karpanen TJ, Lambert PA, Cookson BD, Nightingale P, Miruszenko L, Shillam R, Christian P e Elliott TSJ. *Role of copper in reducing hospital environment contamination*. J. Hosp. Infect., 74, pp.72-77, 2010.
19. Cervantes C e Gutierrez-Corona F. *Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi*. FEMS Microbiology Reviews, 14, pp. 121-138, 1994.

20. Chapaval L, Moon DH, Gomes JE, Duarte FR, Tsai SM. *An alternative method for Staphylococcus aureus DNA isolation*. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec, 60 (2), pp.299-306, 2008.
21. Chesneau O, Morvan A, Grimont F, Labischinski H e Solh N. *Staphylococcus pasteun' sp. nov., Isolated from Human, Animal, and Food Specimens*. International Journal of Systematic Bacteriology, Apr. 1993, pp. 237-244.
22. Chudobova D *et al.* Effect of Ampicillin, Streptomycin, Penicillin and Tetracycline on Metal Resistant and Non-Resistant Staphylococcus aureus. Int. J. Environ. Res. Public Health, 11, pp. 3233-3255, 2014.
23. Clinical and Laboratory Standards Institute (2011). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; M100-S21, Twenty-First Informational Supplement. CLSI, Wayne, PA.
24. Choudhury R e Srivastava S. *Zinc resistance mechanisms in bacteria*. Current Science, 81(7), 2001.
25. De Bel A., Van Hoorde K, Wybo I, Vandoorslaer K, Echahidi F, De Brandt E, Schumann P, Ieven M, Soetens O, Pierard D e Vandamme P. *Staphylococcus jettensis sp. nov., a coagulase-negative staphylococcal species isolated from human clinical specimens*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 63, pp.3250-3256, 2013.
26. Devriese LA, Hájek V, Oeding P, Meyer SA e Schleifer KH. *Staphylococcus hyicus (Sompolinsky 1953) comb. nov. and Staphylococcus hyicus subsp. chromogenes subsp. nov.* Int. J. Syst. Bacteriol., 28, pp.482- 490, 1978.
27. Devriese LA, Poutrel B, Klipper-Balz R e Schleifer KH. *Staphylococcus gallinarum and Staphylococcus caprae, two new species from animals*. Int. J. Syst. Bacteriol., 33, pp.480-486, 1983.
28. Diário da República, 1.^a série — N.º 164 — 27 de Agosto de 2007. Disponível em: <http://dre.pt/pdf1s/2007/08/16400/0574705765.pdf>. Acedido em 24 de maio de 2015.
29. Donlan RM e Costerton JW. *Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms*. Clinical Microbiology Reviews, pp. 167-193, Abril 2002.
30. Dröge M, Puhler A & Selbitschka W. *Horizontal gene transfer as a biosafety issue: A natural phenomenon of public concern*. Journal of Biotechnology, 64, pp.75-90, 1998.
31. Duxbury T. *Toxicity of heavy metals to soil bacteria*. FEMS Microbiology Letters, 11, pp.217-220, 1981.
32. Espírito Santo C, Quaranta D e Grass G. *Antimicrobial metallic copper surfaces kill Staphylococcus haemolyticus via membrane damage*. Microbiologyopen, 1(1), pp.46-52, 2012.
33. Euzéby, J. List of Prokaryotic names with standing in nomenclature - genus Staphylococcus. Disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>. Acedido em 16 de maio de 2015.
34. Fadigas FS, Amaral-Sobrinho NMB, Mazur N, Anjos LHC, Freixo AA. *Concentrações naturais de metais pesados em algumas classes de solos brasileiros*. Bragantia, Campinas, 61, pp.151-159, 2002.
35. Fang H e Hedin G. *Rapid screening and identification of methicillin-resistant Staphylococcus aureus from clinical samples by selective broth and Real-Time PCR assay*. Journal of Clinical Microbiology, 41, pp.2894-2899, 2003.
36. Faria C, Vaz-Moreira I, Serapicos E, Nunes O, Manaia CM. *Antibiotic resistance in coagulase negative staphylococci isolated from wastewater and drinking water*. Science of the Total Environment, 2009.

37. Freney J, Brun Y, Bes M, Meugnier H, Grimont F, Grimont PAD, Nerv C e Fleurette J. *Staphylococcus lugdunensis* sp. nov. and *Staphylococcus schleiferi* sp. nov., Two Species from Human Clinical Specimens. International Journal of Systematic Bacteriology, pp. 168-172, 1988.
38. Ferreira WC e Sousa JC. *Microbiologia Volume 2*. Lidel. Lisboa, 2000.
39. Ferreira WC, Sousa JC e Lima N. *Microbiologia*. Lidel, 2010. ISBN: 978-972-757-515-2
40. Ferreira da Silva M, Vaz-Moreira I, Gonzalez-Pajuelo M, Nunes OC, Manaia CM. *Antimicrobial resistance patterns in Enterobacteriaceae isolated from an urban wastewater treatment plant*. FEMS Microbiology Ecology, 60, pp.166-76, 2007.
41. Foster G, Rossi HM, Hutson RA e Collins MD. *Staphylococcus lutrae* sp. nov., a New Coagulase-Positive Species. International Journal of Systematic Bacteriology, pp. 724-726, 1997.
42. Gadd GM. *Metals and microorganisms: A problem of definition*. FEMS Microbiology Letters, 100, pp.197-204, 1992.
43. Goodman & Gilman. *Manual de Farmacologia e Terapêutica*. McGraw Hill, 2010.
44. Gordon RJ e Lowy FD. *Pathogenesis of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection*. Clinical Infectious Diseases, 46, pp. S350-S359, 2008.
45. Götz F, Bannerman T e Schileifer KH. *The Genera Staphylococcus and Micrococcus*. The Prokaryotes, 4, pp.5-75, 2006.
46. Graham DW, Olivares-Rieumont S, Knapp CW, Lima L, Werner D e Bowen E. *Antibiotic resistance gene abundances associated with waste discharges to the Almendares River near Havana, Cuba*. Environ. Sci. Technol., 45 (2), pp.418-424, 2011.
47. Guardabassi L e Dalsgaard A. *Occurrence and fate of antibiotic resistance bacteria in sewage*. Danish Environmental Protection Agency, projecto nº 722, 2002.
48. Gu C e Karthikeyan KG. *Interaction of Tetracycline with Aluminum and Iron Hydrous Oxides*. Environ. Sci. Technol., 39, pp.2660-2667, 2005.
49. Guimarães S, Moura D e Silva P. *Terapêutica medicamentosa e suas bases farmacológicas: Manual de Farmacologia e Farmacoterapia*. Porto Editora, 2014.
50. Hájek V. *Staphylococcus intermedius, a New Species Isolated from Animals*. International Journal of Systematic Bacteriology, pp. 401-408, 1976.
51. Hájek V, Ludwig W, Schleifer KH, Springer N, Zitzelsberger W, Kroppenstedt RM e Kocur M. *Staphylococcus muscae, a New Species Isolated from Flies*. International Journal of Systematic Bacteriology, Jan. 1992, pp. 97-101.
52. Harakeh S, Yassine H, Hajjar S e El-Fadel M. *Isolates of Staphylococcus aureus and saprophyticus resistant to antimicrobials isolated from the Lebanese aquatic environment*. Marine Pollution Bulletin, 52, pp.912-919, 2006.
53. Hauschild T, Stepanovic S e Zakrzewska-Czerwinska J. *Staphylococcus stepanovicii* sp. nov., a novel novobiocin-resistant oxidase-positive staphylococcal species isolated from wild small mammals. Syst. Appl. Microbiol., 33, pp.183-187, 2010.
54. Huebner J & Godmann DA. *Coagulase-Negative Staphylococci: Role as Pathogens*. Annual Review of Medicine, 50, pp.223-236, 1999.
55. Hylary RT e Buckley CE. *Molecular Properties of Lysostaphin, a Bacteriolytic Agent Specific for Staphylococcus aureus*. The Journal of Biological Chemistry, 245 (18), pp.4842-4846, 1970.
56. Igimi S, Kawamura S, Takahashi E e Mitsuoka T. *Staphylococcus felis, a New Species from Clinical Specimens from Cats*. International Journal Of Systematic Bacteriology, , pp. 373-377, Oct. 1989.

57. Infarmed. *Formulário Hospitalar Nacional de Medicamentos* (9ª edição ed.). Lisboa: Infarmed.
58. Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA). *Vigilância Epidemiológica das Resistências aos Antimicrobianos*. Disponível em: <http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/Paginas/AntibioticosResi.aspx>. Acedido a 19 de maio de 2015.
59. Jorge, António Olavo Cardoso. *Microbiologia e Imunologia Oral*. Elsevier Editora, 2012.
60. Jorgensen HJ, Mork T e Rorvik LM. *The occurrence of Staphylococcus aureus on a farm with small-scale production of raw milk cheese*. Journal of Dairy Science, 88, pp.3810-3817, 2005.
61. Kessie G, Ettayebi M, Haddad AM, Shibl AM, Alshammary FJ, Tawfik AF e Al-Ahdal MN. *Plasmid profile and antibiotic resistance in coagulase negative staphylococci isolated from polluted water*. J Appl Microbiol, 84, pp.417-422, 1998.
62. Kilpper-Bälz R e Schleifer KH. *Transfer of Peptococcus saccharolyticus Foubert and Douglas to the Genus Staphylococcus: Staphylococcus saccharolyticus (Foubert and Douglas) comb. nov.* Int. J. Syst. Bacteriol., 34, pp.91-92, 1984.
63. Kloos WE, Schleifer KH e Smith RF. *Characterization of Staphylococcus sciuri sp.nov. and Its Subspecies*. International Journal of Systematic Bacteriology, pp. 22-37, 1976.
64. Kloos WE e Schleifer KH. *Staphylococcus auricularis sp. nov.: an inhabitant of the human external ear*. Int. J. Syst. Bacteriol., 33, pp.9-14, 1983.
65. Kloos WE, Schleifer K-H & Götz F. *The genus Staphylococcus*. The Prokaryotes, 63(2), pp. 1369-1420, 1992. Editado por A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder & K. H. Schleifer. New York: Springer.
66. Korolkovas A e Burckhalter JH. *Química Farmacêutica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1976.
67. Kumar S, Tamura K, Nei M. *MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment*. Brief Bioinform, 5, pp.150-63, 2004.
68. Lane DJ. *16S/23S rRNA sequencing*. Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics (Stackebrandt E & Goodfellow M, eds), pp. 115-175, 1991. Wiley, Chichester.
69. Levy SB e Marshall B. *Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses*. Nature medicine, 2004.
70. Malik A e Aleem A. *Incidence of metal and antibiotic resistance in Pseudomonas spp. from the river water, agricultural soil irrigated with wastewater and groundwater*. Environ. Monit. Assess., 178, pp.293-308, 2011.
71. Manaia CM, Vaz-Moreira I e Nunes OC. *Antibiotic Resistance in Waste Water and Surface Water and Human Health Implications*. Emerging organic contaminants and human health, 20, pp.173-212, 2012.
72. Metcalf & Eddy, Inc. *Wastewater Engineering Treatment and Reuse*. 4th ed. McGraw-Hill, New York, 2003.
73. Miller RV. *Bacterial Gene Swapping in Nature*. Scientific American, 278, pp.47-51, 1998.
74. Mikolay A, Huggett S, Tikana L, Grass G, Braun J e Nies DHH. *Survival of bacteria on metallic copper surfaces in a hospital trial*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 87, pp.1875- 1879, 2010.
75. Misawa Y, Yoshida A, Okugawa S e Moriya K. *First reported case of Staphylococcus condimenti associated with cateter-related bacteraemia*. New Microbe and New Infect, 3, pp.18-20, 2015.
76. Mulamattathil SG, Bezuidenhout C, Mbewe M e Ateba CN. *Isolation of Environmental Bacteria from Surface and Drinking Water in Mafikeng, South Africa, and Characterization Using Their*

- Antibiotic Resistance Profiles*. Hindawi Publishing Corporation Journal of Pathogens Volume 2014, Article ID 371208, 11 páginas. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/371208>.
77. Neihardt F. *Bacterial genetics*. Em McGraw Hill (Eds.), Sherris Medical Microbiology - An introduction to infectious diseases, 4ª ed., pp. 53 - 74. Nova Iorque, 2004.
78. Nies DH. Microbial heavy-metal resistance. *Applied microbiology and biotechnology*, 51, pp.730-750, 1999.
79. Nováková D, Pantucek R, Hubálek Z, Falsen E, Busse H, Schumann P e Sedláček I. *Staphylococcus microti* sp. nov., isolated from the common vole (*Microtus arvalis*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60, pp.566-573, 2010.
80. Oliveira A, Gomes A, Paiva J & Silveira P. Rio Paiva. *Águas do Douro e Paiva, Associação da Defesa do Património Arouquense*. Campo das Letras - Editores, S.A. (1999).
81. Oliveira TSd, Costa LMD, Cruz CD, Horn HA. *Metais pesados como indicadores de materiais de origem em uma topolitosequência do Triângulo Mineiro, Estado de Minas Gerais*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 34, pp.1451-1465, 1999.
82. Oliveira SJ. *Microbiologia Veterinária, Guia Bacteriológico Prático*. Canoas: ULBRA, 2a Edição (2000).
83. Oliveira M, Bexiga R, Nunes SF, Carneiro C, Cavaco LM, Bernardo F e Vilela CL. *Biofilm-forming ability profiling of Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis mastitis isolates*. *Veterinary Microbiology*, 118, pp.133 - 140, 2006.
84. O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.*, 54, pp.49-79, 2000.
85. Pantucek R, Sedlacek I, Petras P, Koukalova D, Svec P, Stetina V, Vancanneyt M, Crastinova L, Vokurkova J, Ruzickova V, Doskar J, Swings J e Hajek V. *Staphylococcus simiae* sp. nov., isolated from South American squirrel monkeys. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 55, pp.1953-1958, 2005.
86. Pantucek R, Svec P, Dajcs J, Machova I, Cernohlavkova J, Sedo O, Gelbicova T, Maslanova I, Doskar J, Zdrahal Z, Ruzickova V e Sedlacek I. *Staphylococcus petrasii* sp. nov. including *S. petrasii* subsp. *petrasii* subsp. nov. and *S. petrasii* subsp. *croceilyticus* subsp. nov., isolated from human clinical specimens and human ear infections. *Syst. Appl. Microbiol.*, 36, pp.90-95, 2013.
87. Pereira-Maia EC, Silva PP, Almeida WB, Santos HF, Marcial BL, Ruggiero R, Guerra W. *Tetraciclinas e glicilciclinas: uma visão geral*. *Quím. Nova*, 33, pp.700-706, 2010.
88. Picoli SU, Bessa MC, Castagna SMF, Gottardi CPT, Schmidt V, Cardoso M. *Quantificação de coliformes, Staphylococcus aureus e mesófilos presentes em diferentes etapas da produção de queijo frescal de leite de cabra em laticínios*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 26, pp.64-69, 2006.
89. Prasad, Ananda. Clinical, Biochemical and Pharmacological role of zinc. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 20, pp.393-426, 1979.
90. Probst AJ, Hertel C, Richter L, Wassill L, Ludwig W e Hammes WP. *Staphylococcus condimenti* sp. nov., from soy sauce mash, and *Staphylococcus carnosus* (Schleifer and Fischer 1982) subsp. *utilis* subsp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48, pp.651-658, 1998.
91. Rathnayake IVN, Megharaj M, Bolan N, Naidu R. *Tolerance of Heavy Metals by Gram Positive Soil Bacteria*. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 53, pp.1185 - 1189, 2009.

92. Rehm SJ e Tice A. *Staphylococcus aureus: Methicillin-susceptible S.Aureus to methicillin-resistant S.aureus and vancomycin-resistant S.aureus*. Clin Infect Dis. S2, 51, pp. S176-S182, 2010.
93. Riesen A e Perreten V. *Staphylococcus rostri sp. nov., a haemolytic bacterium isolated from the noses of healthy pigs*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 60, pp.2042-2047, 2010.
94. Sawyer CN, McCarty P, Parkin G. Chemistry for Environmental Engineering and Science - 5th ed. McGraw-Hill Inc. (2002).
95. Schleifer KH e Fischer U. *Description of a new species of the genus Staphylococcus: Staphylococcus carnosus*. Int. J. Syst. Bacteriol., 32, pp.153-156, 1982.
96. Schleifer KH, Geyer U, Klipper-Balz R e Devriese LA. *Elevation of Staphylococcus sciuri subsp. lentus (Kloos et al.) to Species Status: Staphylococcus lentus (Kloos et al.) comb. nov.* Syst. Appl. Microbiol., 4, pp.382-387, 1983.
97. Schleifer KH, Kilpper-Balz R e Devriese LA. *Staphylococcus arlettae sp. nov., S. equorum sp. nov. and S. kloosii sp. nov.: Three New Coagulase-Negative, Novobiocin-Resistant Species from Animals*. System. Appl. Microbiol., 5, pp.501-509, 1984.
98. Seng P, Barbe M, Pinelli PO, Gouriet F, Drancourt M, Minebois A, Cellier N, Lechiche C, Asencio G, Lavigne JP, Sotto A, Stein A. *Staphylococcus caprae bone and joint infections: a re-emerging infection*. Clin Microbiol Infect 2014; 20: O1052-O1058 10.1111/1469-0691.12743; 30 Junho 2014.
99. Şengör S.S. e Gikas P. *The influence of single and combined effects of Zn, Cu and temperature on microbial growth*. Global NEST Journal, 16(4), pp. 699-706, 2014.
100. Serapicos E. *Prevalência da resistência a antibióticos, metais e desinfetantes em isolados de Staphylococcus provenientes de uma ETAR municipal*. Dissertação para satisfação parcial dos requisitos do grau de mestre em Engenharia do Ambiente. Porto, 2008.
101. Shittu A, Lin J, Morrison D e Kolawole D. *Identification and molecular characterization of mannitol salt positive, coagulase-negative staphylococci from nasal samples of medical personnel and students*. Journal of Medical Microbiology, 55, pp.317-324, 2006.
102. Spengler J, Wieser M, Taubel M, Rosselló-Mora MA, Rosengarten R e Busse H. *Staphylococcus nepalensis sp. nov., isolated from goats of the Himalayan region*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 53, pp.2007-2011, 2003.
103. Summers AO. *Genetic linkage and horizontal gene transfer, the roots of the antibiotic multi-resistance problem*. Animal Biotechnology., 17, pp.125-135, 2006.
104. Supré K, Vliegheer S, Cleenwerck I, Engelbeen K, Trappen SV, Piepers S, Sampimon OC, Zadoks RN, Vos P e Haesebrouck F. *Staphylococcus devriesei sp. nov., isolated from teat apices and milk of dairy cows*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 60, pp.2739-2744, 2010.
105. Tanasupawat S, Hasimoto Y, Kozaki TM e Komagata K. *Staphylococcus piscifemzantans sp. nov., from Fermented Fish in Thailand*. International Journal of Systematic Bacteriology, Oct. 1992, pp. 577-581.
106. Taponen S, Supre K, Piessens V, Coillie EV, Vliegheer S e Koort JMK. *Staphylococcus agnetis sp. nov., a coagulase-variable species from bovine subclinical and mild clinical mastitis*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 62, pp.61-65, 2012.
107. Tebaldi VMR, Oliveira TLC, Boari CA e Piccoli RH. *Isolamento de coliformes, Staphylococcus e enterococos de leite cru provenientes de tanques de refrigeração por expansão comunitários*:

- identificação, ação lipolítica e proteolítica*. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 28(3), pp.753-760, jul.-set. 2008.
108. Thaker HC, Brahmabhatt MN e Nayak JB. *Isolation and identification of Staphylococcus aureus from milk and milk products and their drug resistance patterns in Anand, Gujarat*. Vet World, 6(1), pp.10-13, 2013. doi:10.5455/vetworld.2013.10-13.
 109. Tong SYC, Schaumburg F, Ellington MJ, Corander J, Pichon B, Leendertz F, Bentley SD, Parkhill J, Holt DC, Peters G e Giffard PM. *Novel staphylococcal species that form part of a Staphylococcus aureus-related complex: the non-pigmented Staphylococcus argenteus sp. nov. and the non-human primate-associated Staphylococcus schweitzeri sp. nov.* International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 65, pp.15-22, 2015.
 110. Varaldo PE, Kilpper-Bälz R, Biavasco F, Satta Ge Schleifer KH. *Staphylococcus delphini sp. nov., a coagulase-positive species isolated from dolphins*. Int. J. Syst. Bacteriol. 38, pp.436-439, 1988.
 111. Vernozy-Rozand C, Mazuy C, Meugnier H, Bes M, Lasne Fiedler F, Etienne J e Freney J. *Staphylococcus fleurettii sp. nov., isolated from goat's milk cheeses*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 50, pp.1521-1527, 2000.
 112. Videira, Arnaldo. Engenharia Genética: Princípios e aplicações. Lidel, 2001.
 113. Weaver L, Noyce JO, Michels HT e Keevil CW. *Potential action of copper surfaces on meticillin-resistant Staphylococcus aureus*. J. Appl. Microbiol., 109, pp.2200-2205, 2010.
 114. Webster JA, Bannerman TL, Hubner RJ, Ballard DN, Cole EM, Bruce JL, Fiedler F, Schubert K e Kloos W. *Identification of the Staphylococcus sciuri Species Group with EcoRI Fragments Containing rRNA Sequences and Description of Staphylococcus vitulus sp. nov.* International Journal of Systematic Bacteriology, pp. 454-460, 1994.
 115. World Health Organization (WHO). *Guidelines for drinking-water quality - 4th ed.* (2011).
 116. World Health Organization and UNICEF Joint Monitoring Programme (JMP). *Progress on Drinking Water and Sanitation, 2014 Update.* (2014).
 117. Yang S, Cha J, Carlson K. *Simultaneous extraction and analysis of 11 tetracycline and sulfonamide antibiotics in influent and effluent domestic wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 1097, pp. 40 - 53, 2005.
 118. Yazdankhah S, Rudi K e Bernhoft A. *Zinc and copper in animal feed - development of resistance and co-resistance to antimicrobial agents in bacteria of animal origin*. Microbial Ecology in Health & Disease, 25, 2014.
 119. Zakrzewska-Czerwińska J, Gaszewska-Mastalarz A, Lis B, Gamian A e Mordarski M. *Staphylococcus pulvereri sp. nov., Isolated from Human and Animal Specimens*. International Journal of Systematic Bacteriology, Jan. 1995, pp. 169-172.
 120. Zhang K, Sparling J, Chow BL, Elsayed S, Hussain Z, Church DL, Gregson DB, Louie T, Conly JM. *New quadriplex PCR assay for detection of methicillin and mupirocin resistance and simultaneous discrimination of Staphylococcus aureus from coagulase-negative staphylococci*. J Clin Microbiol, 42, pp.4947-4955, 2004.
 121. Zhao Y, Geng J, Wang X, Gu X, Gao S. *Tetracycline adsorption on kaolinite: pH, metal cations and humic acid effects*. Ecotoxicology, 20, pp.1141-1147, 2011.
 122. Zhou F, Wang Y. *Characteristics of Antibiotic Resistance of Airborne Staphylococcus Isolated from Metro Stations*. Int. J. Environ. Res. Public Health 10, pp.2412-2426, 2013.

Anexo 1 Espécies do Género *Staphylococcus*

Tabela 2: Diferentes espécies de *Staphylococcus*, hospedeiros e principais infeções.

Espécie	Hospedeiro	Infeções	Referências
<i>S. agnetis</i>	Bovinos	Mastites	Taponen <i>et al.</i> , 2012
<i>S. argenteus</i>	Humanos	Infeções da pele	Tong <i>et al.</i> , 2015
<i>S. arlettae</i>	Mamíferos e aves		Schleifer <i>et al.</i> , 1985
<i>S. aureus</i>	Flora normal: narinas, pele, períneo ou lesão superficial	Intoxicação alimentar estafilocócica, síndrome da pele escaldada, síndrome do choque térmico, bacteremia, endocardite	Rosenbach, 1884
<i>S. auricularis</i>	Humanos (canal auditivo externo)	Infeções oportunistas ou sepses	Kloos e Schleifer, 1983
<i>S. capitis</i>	Flora normal da pele dos humanos	Endocardite, infeções do trato urinário e bacteremia	Kloos e Schleifer, 1975
<i>S. caprae</i>	Caprinos Humanos	Colonização da pele e das glândulas mamárias, podendo causar mastites. Infeções da corrente sanguínea, do trato urinário, ossos e articulações.	Devriese <i>et al.</i> , 1983 Seng P <i>et al.</i> , 2014

Tabela 2 (continuação): Diferentes espécies de *Staphylococcus*, hospedeiros e principais infecções.

<i>S. carnosus</i>	Produtos alimentares (exemplos: fermentação de salsicha e peixe)		Schleifer e Fischer, 1982
<i>S. caseolyticus</i>	Pele e alimentos de origem animal (exemplos: leite e carne)		Schleifer <i>et al.</i> , 1982 Tsubakishita <i>et al.</i> , 2010
<i>S. chromogenes</i>	Bovinos	Infeções cutâneas e Mastites	<i>Devriese et al.</i> , 1978
<i>S. cohnii</i>	Bovinos Pele humana	Mastites Infeções cutâneas	<i>Schleifer e Kloos, 1975c</i>
<i>S. condimentii</i>	Produtos alimentares	Infeções sanguíneas	<i>Probst et al.</i> , 1998 <i>Misawa et al.</i> , 2015
<i>S. delphini</i>	Golfinhos	Lesões da pele	<i>Varaldo et al.</i> , 1988
<i>S. devriesei</i>	Bovinos		Supré <i>et al.</i> 2010
<i>S. epidermidis</i>	Flora natural: pele e mucosas	Infeções relacionadas com a presença de corpos estranhos, como próteses, cateteres, enxertos vasculares e com estados de imunossupressão	Winslow e Winslow, 1908
<i>S. equorum</i>	Equinos	Infeções do trato genital	Schleifer <i>et al.</i> , 1984
<i>S. felis</i>	Felinos	Otite externa, cistite, abscessos, feridas e outras infecções de pele	Igimi <i>et al.</i> , 1989
<i>S. fleurettii</i>	Produtos alimentares (queijo)		Vernozy-Rozand <i>et al.</i> , 2000

Tabela 2 (continuação): Diferentes espécies de *Staphylococcus*, hospedeiros e principais infecções.

<i>S. gallinarum</i>	Aves Humanos (saliva)		Devriese <i>et al.</i> , 1983
<i>S. haemolyticus</i>	Flora natural: pele e mucosas	Endocardite, septicemia, peritonite e infecções urinárias	Schleifer e Kloos, 1975c
<i>S. hominis</i>	Humanos e animais	Pode causar infecções em pacientes com o sistema imunológico comprometido, como por exemplo quimioterapia	Kloos e Schleifer, 1975b
<i>S. hyicus</i>	Suínos	Dermatite exsudativa	Devriese <i>et al.</i> , 1978
<i>S. intermedius</i>	Aves	Abscessos e artrites	Hájek, 1976a
<i>S. jettensis</i>	Humanos		De Bel <i>et al.</i> , 2013
<i>S. kloosii</i>	Animais selvagens		Schleifer <i>et al.</i> , 1984
<i>S. lentus</i>	Animais Humanos	Mastites Abscessos	Schleifer <i>et al.</i> , 1983 Karachalios <i>et al.</i> , 2006
<i>S. lugdunensis</i>	Flora natural: pele e mucosas	Infeções cardíacas (por exemplo, endocardite grave), peritonite, infecções do sistema nervoso central, encefalites e infecções urinárias	Freny <i>et al.</i> , 1988
<i>S. lutrae</i>	Lontras	Fígado, Baço, Glândula Mamária	Foster <i>et al.</i> , 1997

Tabela 2 (continuação): Diferentes espécies de *Staphylococcus*, hospedeiros e principais infecções.

<i>S. massiliensis</i>	Humanos	Abcesso cerebral humano	Al Masalma <i>et al.</i> , 2010
<i>S. microti</i>	Ratazanas		Nováková <i>et al.</i> , 2010
<i>S. muscae</i>	Animais	Não está associada a nenhuma doença	Hájek <i>et al.</i> , 1992
<i>S. nepalensis</i>	Caprinos	Importância patológica ainda não está bem definida	Spergser <i>et al.</i> , 2003
<i>S. pasteurii</i>	Humanos, animais e alimentos	Infeções nosocomiais, infecções do trato urinário, prostatite crônica e bacteremias	Chesneau <i>et al.</i> , 1993
<i>S. petrasii</i>	Humanos		Pantucek <i>et al.</i> , 2013
<i>S. pettenkoferi</i>	Humanos	Pode ocasionalmente causar infecção em pacientes cujo sistema imunológico esteja comprometido. Foi identificado como osteomielite numa infecção de pé diabético	Trülzsch <i>et al.</i> , 2007 Song <i>et al.</i> , 2008
<i>S. piscifermentans</i>	Alimentos fermentados		Tanasupawat <i>et al.</i> , 1992
<i>S. pseudintermedius</i>	Animais domésticos	Otite externa, piodermites	Devriese <i>et al.</i> , 2005
<i>S. pulvereri</i>	Humanos e Animais		Zakrzewska-Czerwińska <i>et al.</i> , 1995
<i>S. rostri</i>	Suínos		Riesen e Perreten 2010
<i>S. saccharolyticus</i>	Humanos	Endocardite infecciosa	Kilpper-Bälz e Schleifer 1984 Westblom <i>et al.</i> , 1990

Tabela 2 (continuação): Diferentes espécies de *Staphylococcus*, hospedeiros e principais infecções.

<i>S. saprophyticus</i>	Flora normal da pele, região periuretral e mucosas das vias urinárias e genitais.	Infecções do trato urinário em mulheres jovens, sexualmente ativas, cistites e pielonefrite	Shaw et al., 1951
<i>S. schleiferi</i>	Humanos	Infeções nosomocais	Freney et al., 1988
<i>S. schweitzeri</i>	Narinas de primata não humano		Tong et al., 2015
<i>S. sciuri</i>	Humanos, animais e produtos alimentares de origem animal	Endocardite, peritonite, choque séptico, infecção do trato urinário e infecções de feridas	Kloos et al., 1976 Stepanovic et al., 2004
<i>S. simiae</i>	Macacos		Pantucek et al., 2005
<i>S. simulans</i>	Humanos e animais	Osteomielite vertebral e endocardite	Kloos e Schleifer, 1975
<i>S. stepanovicii</i>	Pequenos animais selvagens		Hauschild et al., 2012
<i>S. succinus</i>	Produtos alimentares (queijo, salsicha) e pele de animais selvagens	Não definida	Lambert et al., 1998
<i>S. vitulinus</i>	Alimentos e animais		Webster et al., 1994
<i>S. warneri</i>	Humanos e animais	Infeções do trato urinário, meningite, infecções ortopédicas e endocardite	Kloos e Schleifer, 1975
<i>S. xylosus</i>	Humanos Animais Meio ambiente Alimentos (leite, queijo e salsicha)	Dermatite nasal e pielonefrite Infecção intermamária bovina	Schleifer e Kloos, 1975

Anexo 2 Equipamento e material

2.1 Quantificação de *Staphylococcus*

Meio de cultura:

- Mannitol Salt Agar (MSA);
- Gelose Salina de Manitol de Chapman (MSA);
- Meio Semi-sólido de Carne e Levedura (MSS);
- Nutriente Agar (NA).

Antibiótico:

- Tetraciclina (Fluka®).

Reagentes:

- Sulfato de zinco (ZnSO_4);
- Sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$);
- Álcool etílico (96%);
- Água Peptonada;
- Óleo de imersão;
- Peróxido de Hidrogénio;
- Plasma de coelho liofilizado (bioMérieux® SA);
- Reagentes para Coloração de Gram: Descolorante; Solução de Lugol; Solução de Safranina; e Solução de Cristal Violeta.

Equipamento:

- Balança de precisão;
- Autoclave 121 ± 3 °C;
- Placa de aquecimento 100 °C;
- Banho de água 45 ± 1 °C;
- Bico de Bunsen;
- Rampa de filtração;
- Bomba de vácuo;
- Reservatório para recolha de filtrados;
- Incubadora 37 ± 1 °C;
- Hotte;
- Microscópio ótico;
- Frigorífico 5 ± 3 °C;
- Pipetas automáticas;
- Unidade purificadora de água;
- Vórtex.

Material:

- Frascos estéreis;
- Placas de Petri estéreis;
- Agitador magnético;
- Lâminas e lamelas;
- Membranas filtrantes estéreis, compostas por ésteres de celulose, com poro de diâmetro nominal de 0,45 µm, com grelha;
- Material de laboratório de uso corrente.

2.2 Amplificação, sequenciação e purificação do gene 16S rRNA**Reagentes:**

- Água ultrapura;
- *Primer* 1492R (100 µM);
- Gelo;
- Enzima *Taq* polimerase (5 U/µL);
- Álcool etílico (99%);
- Amostra de DNA molde;
- Tampão *Taq* com (NH₄)₂SO₄;
- Controle positivo;
- MgCl₂ (25 mM);
- Gel 1,5% agarose em TAE;
- dNTP's (1 mM);
- Corante Midori® Green Advanced;
- *Primer* 27F (100 µM);
- Solução salina (0,85% NaCl).

Equipamento:

- Banho de água 95±2 °C;
- Termociclador;
- Centrífuga;
- Transiluminador UV.
- Câmara de luxo;

Material:

- Tubos *Eppendorf* estéreis;
- Ansa estéril;
- Micropipetas;
- Matraz;
- Kit de purificação Grisp®.

Anexo 3 Dados de precipitação, turvação e temperatura da água

Tabela 9: Variação da precipitação, turvação e temperatura da água durante o período em estudo.

Data	Precipitação (mm)	Turvação (NTU)	Temperatura (°C)
10/03/2015	0	-	11,35
11/03/2015	0	-	12,85
12/03/2015	0	-	8,75
13/03/2015	0	0,33	11,60
14/03/2015	0	0,36	9,80
15/03/2015	0	0,41	9,25
16/03/2015	0	0,38	10,10
17/03/2015	0	-	10,40
18/03/2015	0	-	11,50
19/03/2015	0	-	11,05
20/03/2015	0	0,42	14,40
21/03/2015	0	0,51	14,25
22/03/2015	0	-	13,30
23/03/2015	0	-	8,30
24/03/2015	0	2,43	12,55
25/03/2015	0	1,32	7,20
26/03/2015	2,1	-	7,45
27/03/2015	0,9	0,38	13,70
28/03/2015	0	0,62	13,60
29/03/2015	0	0,39	12,40
30/03/2015	0	0,36	13,90
31/03/2015	0	-	15,30

Continua na página seguinte

Tabela 9 (continuação): Variação da precipitação, turvação e temperatura da água durante o período em estudo.

Data	Precipitação (mm)	Turvação (NTU)	Temperatura (°C)
01/04/2015	0	2,8	14,75
02/04/2015	0	-	20,70
03/04/2015	0	-	17,70
04/04/2015	0	0,42	14,95
05/04/2015	0	-	18,40
06/04/2015	0,1	0,61	15,35
07/04/2015	0,1	0,57	17,05
08/04/2015	0,1	0,51	14,10

Anexo 4 Resultados das contagens

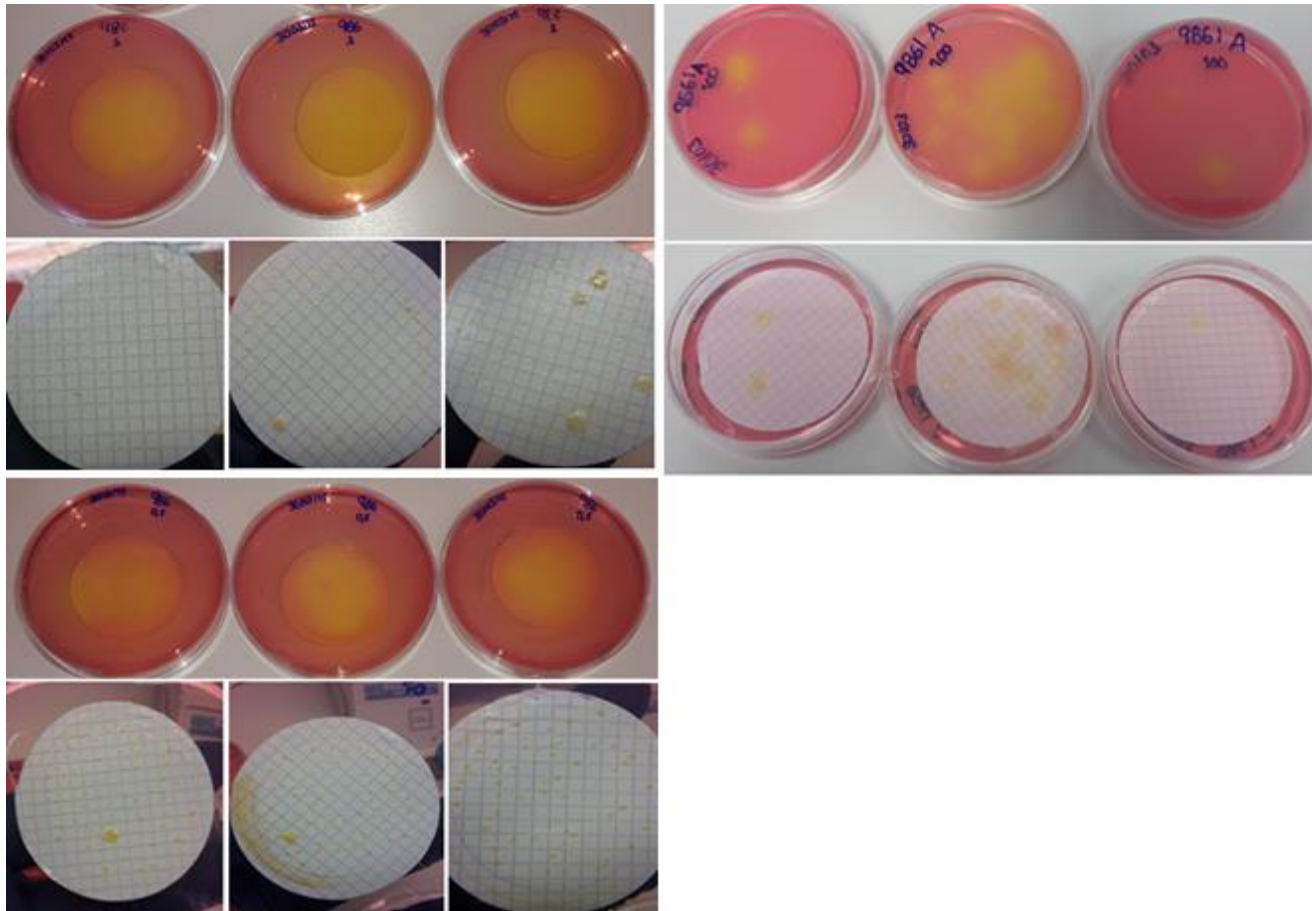


Figura 11: Imagens das placas da colheita de 30 de março após 48 h de incubação, para meio MSA (lado direito) e MSA suplementado com tetraciclina 1 mg/L (lado esquerdo).

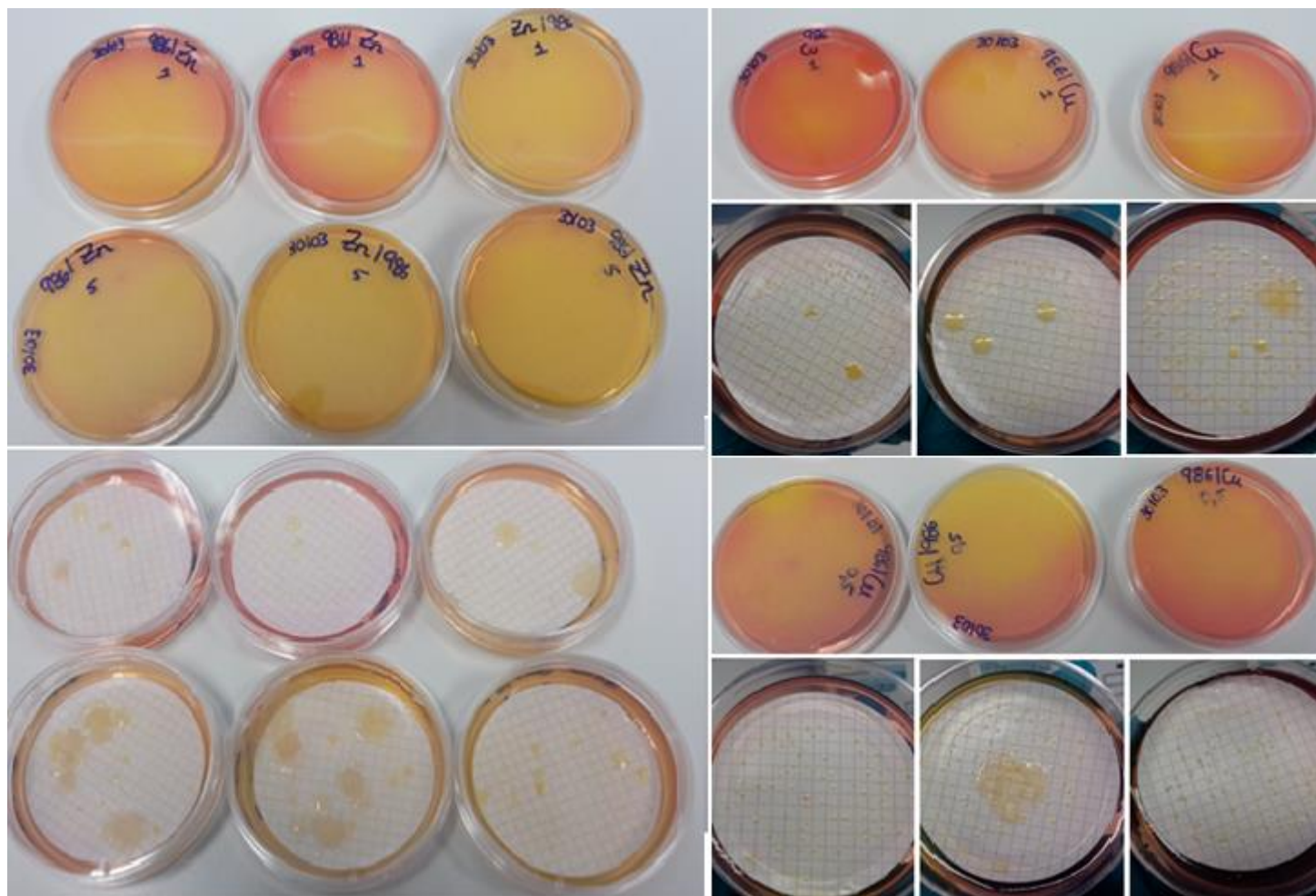


Figura 11 (continuação): Imagens das placas da colheita de 30 de março após 48 h de incubação para os meios MSA suplementados com 1 mM de zinco (lado esquerdo) e 1 mM de cobre (lado direito).

Tabela 10: Número de colônias contabilizadas para cada dia de colheita e para cada meio.

Data	Meio	Volume	Fator	Nº Colônias contabilizadas						UFC / 100 mL	
				Réplica 1		Réplica 2		Média Típicas	Média Atípicas	Típicas	Atípicas
				Típicas	Atípicas	Típicas	Atípicas				
10/03/2015	MSA	100	1	NDTR*		-----		-----	-----	-----	-----
		10	10	NDTR*		-----		-----	-----	-----	-----
		5	20	NDTR*		-----		-----	-----	-----	-----
		1	100	89	5	-----	-----	89	5	8900	500
		0,1	1000	12	2	-----	-----	12	2	12000	2000
	MSA + TET	100	1	9	3	-----	-----	9	3	9	3
		10	10	0	0	-----	-----	0	0	-----	-----
		5	20	0	0	-----	-----	0	0	-----	-----
		1	100	0	0	-----	-----	0	0	-----	-----
		0,1	1000	0	0	-----	-----	0	0	-----	-----
	MSA + Zn	100	1	NDTR*		-----		-----	0	-----	-----
		10	10	NDTR*		-----		-----	0	-----	-----
		5	20	NDTR*		-----		-----	0	-----	-----
		1	100	90	2	-----	-----	90	2	9000	200
		0,1	1000	11	0	-----	-----	11	0	11000	0
	MSA + Cu	100	1	NDTR*		-----	-----	-----	0	-----	-----
		10	10	NDTR*		-----	-----	-----	0	-----	-----
		5	20	NDTR*		-----	-----	-----	0	-----	-----
		1	100	NDTR*		-----	-----	-----	0	-----	-----
		0,1	1000	16	3	-----	-----	16	3	16000	3000

*NDTR - Não determinado

Tabela 10 (continuação): Número de colónias contabilizadas para cada dia de colheita e para cada meio.

Data	Meio	Volume	Fator	Nº Colónias contabilizadas						UFC / 100 mL	
				Réplica 1		Réplica 2		Média Típicas	Média Atípicas	Típicas	Atípicas
				Típicas	Atípicas	Típicas	Atípicas				
12/03/2015	MSA	0,1	1000	2	0	0	0	1	0	1000	0
	MSA + TET	100	1	5	2	7	5	6	3,5	6	4
	MSA + Zn	0,1	1000	0	0	1	0	0,5	0	500	0
	MSA + Cu	0,1	1000	2	0	0	0	1	0	1000	0
13/03/2015	MSA	0,1	1000	1	1	0	0	0,5	0,5	500	500
	MSA + TET	100	1	14	6	2	3	8	4,5	8	5
	MSA + Zn	0,1	1000	0	1	0	0	0	0,5	0	500
	MSA + Cu	0,1	1000	0	0	1	0	0,5	0	500	0
16/03/2015	MSA	1	100	2	1	2	0	2	0,5	200	50
		0,1	1000	0	0	0	0	0	0	0	0
	MSA + TET	100	1	8	5	7	2	7,5	3,5	8	4
	MSA + Zn	1	100	NDTR*		-----	-----	-----	-----	-----	-----
		0,1	1000	0	1	0	0	0	0,5	0	500
	MSA + Cu	1	100	1	4	0	0	0,5	2	50	200
		0,1	1000	0	0	0	0	0	0	0	0

*NDTR - Não determinado

Tabela 10 (continuação): Número de colónias contabilizadas para cada dia de colheita e para cada meio.

Data	Meio	Volume	Fator	Nº Colónias contabilizadas						UFC / 100 mL	
				Réplica 1		Réplica 2		Média Típicas	Média Atípicas	Típicas	Atípicas
				Típicas	Atípicas	Típicas	Atípicas				
17/03/2015	MSA	1	100	2	2	1	0	1,5	1	150	100
		0,1	1000	0	0	0	0	0	0	0	0
	MSA + TET	100	1	7	5	6	3	6,5	4	7	4
	MSA + Zn	1	100	1	3	0	0	0,5	1,5	50	150
		0,1	1000	0	0	0	0	0	0	0	0
	MSA + Cu	1	100	2	1	0	0	1	0,5	100	50
		0,1	1000	1	0	0	0	0,5	0	500	0
18/03/2015	MSA	1	100	76	0	84	0	80	0	8000	0
		0,1	1000	7	0	6	0	6,5	0	6500	0
	MSA + TET	100	1	5	0	3	0	4	0	4	0
	MSA + Cu	1	100	59	0	62	0	60,5	0	6050	0
		0,1	1000	4	0	5	0	4,5	0	4500	0
23/03/2015	MSA	1	100	1	2	0	0	0,5	1	50	100
		0,1	1000	2	0	1	0	1,5	0	1500	0
	MSA + TET	100	1	9	6	6	4	7,5	5	8	5
	MSA + Zn	1	100	2	1	0	0	1	0,5	100	50
		0,1	1000	1	0	0	0	0,5	0	500	0
	MSA + Cu	0,5	200	2	3	0	0	1	1,5	200	300
		0,1	1000	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabela 10 (continuação): Número de colônias contabilizadas para cada dia de colheita e para cada meio.

Data	Meio	Volume	Fator	N° Colônias contabilizadas						UFC / 100 mL	
				Réplica 1		Réplica 2		Média Típicas	Média Atípicas	Típicas	Atípicas
				Típicas	Atípicas	Típicas	Atípicas				
24/03/2015	MSA	1	100	7	0	5	0	6	0	600	0
		0,1	1000	3	0	1	0	2	0	2000	0
	MSA + TET	100	1	8	4	10	8	9	6	9	6
	MSA + Zn	1	100	4	1	2	0	3	0,5	300	50
		0,1	1000	0	0	0	0	0	0	0	0
	MSA + Cu	0,5	200	4	0	1	0	2,5	0	500	0
		0,1	1000	0	0	0	0	0	0	0	0
25/03/2015	MSA	1	100	2	0	1	0	1,5	0	150	0
		0,5	200	2	0	1	0	1,5	0	300	0
	MSA + TET	100	1	5	5	7	10	6	7,5	6	8
	MSA + Zn	5	20	24	4	18	2	21	3	420	60
		1	100	1	3	1	2	1	2,5	100	250
	MSA + Cu	1	100	1	2	1	1	1	1,5	100	150
		0,5	200	2	0	1	0	1,5	0	300	0
30/03/2015	MSA	1	100	NDTR*		NDTR*		-----	-----	-----	-----
		0,5	200	57	0	62	0	59,5	0	11900	0
	MSA + TET	100	1	2	8	2	3	2	5,5	2	6
	MSA + Zn	5	20	NDTR*		NDTR*		-----	-----	-----	-----
		1	100	115	1	120	2	117,5	1,5	11750	150
	MSA + Cu	1	100	94	0	91	0	92,5	0	9250	0
		0,5	200	64	0	77	0	70,5	0	14100	0

*NDTR - Não determinado

Tabela 10 (continuação): Número de colônias contabilizadas para cada dia de colheita e para cada meio.

Data	Meio	Volume	Fator	Nº Colônias contabilizadas						UFC / 100 mL	
				Réplica 1		Réplica 2		Média Típicas	Média Atípicas	Típicas	Atípicas
				Típicas	Atípicas	Típicas	Atípicas				
31/03/2015	MSA	1	100	12	2	12	1	12	1,5	1200	150
	MSA + TET	100	1	6	7	9	10	7,5	8,5	8	9
	MSA + Zn	5	20	63	2	110	3	86,5	2,5	1730	50
		1	100	91	1	124	0	107,5	0,5	10750	50
	MSA + Cu	1	100	115	0	126	0	120,5	0	12050	0
		0,5	200	15	0	15	0	15	0	3000	0
06/04/2015	MSA	1	100	3	3	2	1	2,5	2	250	200
		0,5	200	3	2	1	0	2	1	400	200
	MSA + TET	100	1	3	3	5	3	4	3	4	3
	MSA + Zn	5	20	7	4	2	3	4,5	3,5	90	70
		1	100	2	1	1	0	1,5	0,5	150	50
	MSA + Cu	1	100	0	1	0	0	0	0,5	0	50
		0,5	200	2	1	1	0	1,5	0,5	300	100
	07/04/2015	MSA	1	100	5	1	1	0	3	0,5	300
0,5			200	2	0	0	0	1	0	200	0
MSA + TET		100	1	7	3	7	3	7	3	7	3
MSA + Zn		5	20	6	2	7	1	6,5	1,5	130	30
		1	100	5	0	4	0	4,5	0	450	0
MSA + Cu		1	100	2	2	3	0	2,5	1	250	1
		0,5	200	1	0	2	0	1,5	0	300	0

Tabela 10 (continuação): Número de colônias contabilizadas para cada dia de colheita e para cada meio.

Data	Meio	Volume	Fator	Nº Colônias contabilizadas						UFC / 100 mL	
				Réplica 1		Réplica 2		Média Típicas	Média Atípicas	Típicas	Atípicas
				Típicas	Atípicas	Típicas	Atípicas				
08/04/2015	MSA	1	100	98	1	103	0	100,5	0,5	10050	50
		0,5	200	115	1	112	0	113,5	0,5	22700	100
	MSA + TET	100	1	9	4	11	5	10	4,5	10	5
	MSA + Zn	5	20	4	2	3	2	3,5	2	7	4
	MSA + Cu	1	100	7	3	5	1	6	2	600	200
		0,5	200	4	2	2	0	3	1	600	200

Anexo 5 Dados da caracterização fenotípica dos isolados

Tabela 11: Caracterização fenotípica dos isolados confirmados como *Staphylococcus*.

Meio	Data	Volume Filtrado (mL)	Designação Isolado	Gram	Catalase	Tipo respiratório	Coagulase	Oxidase	Teste O/F		<i>Staphylococcus</i>
									Oxidação	Fermentação	
MSA	13/03/2015	0,1	PcMSA1	Positivo -> Forma: cocos	+	+	-	-	+	+	Sim
	23/03/2015	0,1	PgMSA2	Positivo -> Forma: cocos	+	+	-	-	+	+	Sim
	06/04/2015	0,5	PmMSA6	Positivo -> Forma: cocos	+	+	-	-	+	+	Sim
	07/04/2015	0,5	PnMSA7	Positivo -> Forma: cocos	+	+	+	-	+	+	Sim
	08/04/2015	1	PoMSA1	Positivo -> Forma: cocos	+	+	-	-	+	+	Sim
	08/04/2015	1	PoMSA2	Positivo -> Forma: cocos	+	+	-	-	+	+	Sim
	08/04/2015	1	PoMSA4	Positivo -> Forma: cocos	+	+	-	-	+	+	Sim
	08/04/2015	1	PoMSA5	Positivo -> Forma: cocos	+	+	-	-	+	+	Sim
MSA + TET	10/03/2015	100	PaTET1	Positivo -> Forma: cocos	+	-	-	-	+	+	Sim
	13/03/2015	100	PcTET1	Positivo -> Forma: cocos	+	+	-	-	+	+	Sim
	13/03/2015	100	PcTET2	Positivo -> Forma: cocos	+	+	-	-	+	+	Sim
	13/03/2015	100	PcTET5	Positivo -> Forma: cocos	+	-	-	-	+	+	Sim
	16/03/2015	100	PdTET2	Positivo -> Forma: cocos	+	-	-	-	+	+	Sim
	17/03/2015	100	PeTET3	Positivo -> Forma: cocos	+	+	-	-	+	+	Sim
	18/03/2015	100	PfTET1	Positivo -> Forma: cocos	+	-	-	-	+	+	Sim
	18/03/2015	100	PfTET4	Positivo -> Forma: cocos	+	+	-	-	+	+	Sim
	18/03/2015	100	PfTET5	Positivo -> Forma: cocos	+	+	-	-	+	+	Sim
	23/03/2015	100	PgTET1	Positivo -> Forma: cocos	+	+	-	-	+	+	Sim
	24/03/2015	100	PhTET1	Positivo -> Forma: cocos	+	+	-	-	+	+	Sim
	24/03/2015	100	PhTET2	Positivo -> Forma: cocos	+	+	-	-	+	+	Sim

Tabela 11 (continuação): Caracterização fenotípica dos isolados confirmados como *Staphylococcus*.

Meio	Data	Volume Filtrado (mL)	Designação Isolado	Gram	Catalase	Tipo respiratório	Coagulase	Oxidase	Teste O/F		<i>Staphylococcus</i>
									Oxidação	Fermentação	
MSA + TET	25/03/2015	100	PiTET1	Positivo -> Forma: cocos	+	+	-	-	+	+	Sim
	25/03/2015	100	PiTET2	Positivo -> Forma: cocos	+	+	-	-	+	+	Sim
	31/03/2015	100	PlTET1	Positivo -> Forma: cocos	+	-	-	-	+	+	Sim
	31/03/2015	100	PlTET5	Positivo -> Forma: cocos	+	+	-	-	+	+	Sim
	07/04/2015	100	PnTET4	Positivo -> Forma: cocos	+	+	-	-	+	+	Sim
	08/04/2015	100	PoTET2	Positivo -> Forma: cocos	+	+	-	-	+	+	Sim
MSA + Zn	25/03/2015	1	PiZn6	Positivo -> Forma: cocos	+	+	-	-	+	+	Sim
	25/03/2015	1	PiZn7	Positivo -> Forma: cocos	+	+	-	-	+	+	Sim
	31/03/2015	5	PlZn1	Positivo -> Forma: cocos	+	-	-	-	-	+	Sim
	07/04/2015	5	PnZn1	Positivo -> Forma: cocos	+	+	-	-	+	+	Sim
	07/04/2015	5	PnZn5	Positivo -> Forma: cocos	+	+	-	-	+	+	Sim
MSA + Cu	10/03/2015	0,1	PaCu3	Positivo -> Forma: cocos	+	-	-	-	+	+	Sim
	12/03/2015	0,1	PbCu1	Positivo -> Forma: cocos	+	+	-	-	+	+	Sim
	30/03/2015	1	PjCu1	Positivo -> Forma: cocos	+	+	-	-	+	+	Sim
	31/03/2015	0,5	PlCu6	Positivo -> Forma: cocos	+	+	-	-	+	+	Sim
	08/04/2015	1	PoCu6	Positivo -> Forma: cocos	+	+	-	-	+	+	Sim
	08/04/2015	1	PoCu7	Positivo -> Forma: cocos	+	+	-	-	+	+	Sim
	08/04/2015	1	PoCu10	Positivo -> Forma: cocos	+	+	-	-	+	+	Sim
	08/04/2015	0,5	PoCu12	Positivo -> Forma: cocos	+	+	-	-	+	+	Sim