



CATÓLICA

UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA
ESCOLA SUPERIOR DE BIOTECNOLOGIA

INFLUÊNCIA DE AGENTES ANTIMICROBIANOS E AMBIENTAIS NAS COMUNIDADES BACTERIANAS E NOS NÍVEIS DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS NUMA ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUAIS

Dissertação apresentada à Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa para obtenção do grau de mestre em Microbiologia Aplicada.

Por,

Ana Isabel Novo de Figueiredo

Junho de 2012



CATÓLICA

UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA
ESCOLA SUPERIOR DE BIOTECNOLOGIA

**INFLUÊNCIA DE AGENTES ANTIMICROBIANOS E AMBIENTAIS NAS
COMUNIDADES BACTERIANAS E NOS NÍVEIS DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS
NUMA ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUAIS**

Dissertação apresentada à Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa
para obtenção do grau de mestre em Microbiologia Aplicada.

**INFLUENCE OF ENVIRONMENTAL AND ANTIMICROBIAL AGENTS ON BACTERIAL
COMMUNITIES AND ANTIBIOTIC RESISTANCE PREVALENCE IN A WASTEWATER
TREATMENT PLANT**

Thesis presented to *Escola Superior de Biotecnologia* of the *Universidade Católica Portuguesa* to
achieve the Master of Science level in Applied Microbiology.

Por,

Ana Isabel Novo de Figueiredo

Sob orientação de Célia M. Manaia e co-orientação de Olga C. Nunes

Junho de 2012

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA TESE/TRABALHO, APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.”

Leonardo da Vinci

RESUMO

A variação da estrutura da comunidade bacteriana de águas residuais de uma estação municipal de tratamento (ETAR) foi avaliada em amostras colhidas antes e após o tratamento, através do método de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE). Os padrões de DGGE da comunidade correspondentes a catorze amostragens realizadas em diferentes estações do ano, foram analisados em função de variáveis bióticas e abióticas com recurso a análise estatística multivariada.

Com base na análise das sequências nucleotídicas das bandas de DGGE, foi possível concluir que as populações predominantes pertencem ao filo *Proteobacteria*, às classes *Beta*-, *Epsilon*- e *Gama*-, e ao filo *Bacteroidetes*. A análise de componentes principais (PCA) com base em padrões de DGGE mostrou que a composição e estrutura das comunidades bacterianas variaram ao longo do tempo e de forma diferente para cada tipo de águas residuais (água residual bruta ou efluente tratado).

A análise de correspondência canónica (CCA) dos padrões de DGGE em relação às variáveis ambientais sugere que alguns fatores, como a temperatura e humidade relativa do ar exercem uma influência significativa na composição do efluente tratado. A presença de alguns compostos químicos, tais como as tetraciclinas, ou a abundância de coliformes cultiváveis resistentes a ciprofloxacina ou a sulfametoxazol também mostraram estar relacionados com a estrutura da comunidade.

Segundo este estudo, a comunidade bacteriana presente no efluente tratado é influenciada por populações de bactérias cultiváveis resistentes a antibióticos, pela presença de agentes antimicrobianos e pelas condições físico-químicas. É possível concluir que a comunidade bacteriana pode sofrer rearranjos durante o tratamento, o que poderá contribuir para o desenvolvimento de resistência a antibióticos e eventual disseminação no meio ambiente.

Palavras-chave: Estação de Tratamento de Águas Residuais Urbanas; PCR-DGGE; comunidades bacterianas

ABSTRACT

The variation of the bacterial community structure in a municipal activated sludge wastewater treatment plant (WWTP) was assessed before and after treatment, through the method of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). The DGGE community patterns, corresponding to fourteen sampling campaigns over different seasons, were analysed as a function of different biotic and abiotic environmental variables through multivariate statistical analysis.

Based on the analysis of the nucleotide sequences of the excised DGGE bands, it was possible to conclude that the predominant populations were *Proteobacteria* of the classes *Beta*-, *Epsilon*- and *Gamma*-, and *Bacteroidetes*. A principal component analysis (PCA) based on DGGE patterns showed that the composition and structure of bacterial communities varied over time and differently for each type of wastewater (raw or treated).

The canonical correspondence analysis (CCA) of the DGGE patterns *versus* environmental variables suggested a significant influence of some factors, such as temperature and the relative humidity, in the treated effluent. The presence of some chemical compounds such as tetracyclines, and culturable coliforms resistant to ciprofloxacin or to sulfamethoxazole showed also to have a relationship with the structure of the community.

According to this study, the bacterial community of the treated effluent is influenced by culturable antibiotic resistant populations, the presence of antimicrobial agents and the physicochemical conditions. It is possible to conclude that the bacterial community may suffer rearrangements throughout the wastewater treatment, eventually leading to the development of antibiotic resistance in the environment.

Keywords: Municipal Wastewater Treatment Plant; PCR-DGGE; bacterial communities

AGRADECIMENTOS

Queria aproveitar esta oportunidade para agradecer às pessoas que mais colaboraram e tornaram possível a concretização deste projeto.

Agradeço especialmente à Doutora Célia Manaia, pessoa e pedagoga que muito admiro, pela orientação neste mestrado e toda a energia despendida comigo neste projeto. Obrigada por toda a paciência, dedicação e palavras amigas com que sempre me presenteou.

Agradeço também à Doutora Olga Nunes, coorientadora neste trabalho, por ter disponibilizado não só o equipamento mas também toda a atenção e ajuda, especialmente na análise multivariada. Gostaria também de lembrar e agradecer a toda a equipa da Doutora Olga, em particular à Luísa, à Cátia e à Rita por toda a colaboração e amizade.

A todo o pessoal da ETAR, muito obrigada, pela simpatia e o auxílio aquando das amostragens.

Aproveito para agradecer também à Agência Portuguesa do Ambiente, nas pessoas das Engenheiras Paula Viana e Sandra André, pela colaboração na determinação dos antimicrobianos.

A todos com quem partilhei as bancadas de laboratório durante o desenvolvimento deste projeto, em particular, Ivone, Vânia e Carlos, muito obrigada, por toda a ajuda, pela camaradagem e pela boa música. Foi um prazer conhecer-vos e trabalhar convosco!

Aos meus amigos, obrigada pelos momentos de descontração e pelo incentivo constante.

E àqueles sem os quais esta aventura nunca teria sido possível, aos meus pais, obrigada por mais esta oportunidade, amo-vos...

"O tempo faz tudo valer a pena, e nem o erro é desperdício."

Ana Carolina

LISTA DE ABREVIATURAS

Af.	Afluente
AML	Amoxicilina
CCA	Análise de Correspondência Canónica
CIP	Ciprofloxacina
DGGE	Electroforese em Gel com Gradiente Desnaturante
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Ef.	Efluente
ETAR	Estação de Tratamento de Águas Residuais
Fw	<i>Forward</i>
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosose
m-Ent	<i>Enterococcus</i> agar
m-FC	<i>Faecal</i> coliform agar
pb	Pares de bases
PCA	Plate count agar
PCA	Análise de Componentes Principais
rDNA 16S	Gene que codifica a subunidade pequena (16S) do ribossoma
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	RNA ribossomal
Rv	<i>Reverse</i>
SUL	Sulfametoxazol
TAE	Tris-acetato-EDTA
TET	Tetraciclina
tRNA	RNA de transferência
X-Gal	5-bromo-4-cloro-indol- β -D-galactopiranosose

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vista geral da ETAR municipal analisada no estudo.	9
Figura 2. Metodologia da preparação, montagem e corrida de um gel de DGGE.	12
Figura 3. Perfil electroforetico da mistura de DNA's usados nas pistas de referência, identificando as espécies presentes.	13
Figura 4. Gel de DGGE com as amostras de 16S rDNA das amostras de PI, extraídas e amplificadas em triplicado.	24
Figura 5. Gel de DGGE com as amostras de 16S rDNA das amostras de PII, extraídas e amplificadas em triplicado.	25
Figura 6. Gel de DGGE com as amostras de 16S rDNA das amostras de PIII, extraídas e amplificadas em triplicado.	25
Figura 7. Gel de DGGE com as amostras de 16S rDNA das amostras de PIV, extraídas e amplificadas em triplicado.	26
Figura 8. Gel de DGGE com as amostras de 16S rDNA de ambas as amostras colhidas em diferentes períodos.	26
Figura 9. Gel de DGGE com as amostras de 16S rDNA das comunidades presentes, no afluente ao tanque biológico e efluente final da ETAR, nos diferentes períodos de amostragem.	27
Figura 10. Gráfico de dispersão das comunidades bacterianas presentes nas amostras de afluente e efluente, ao longo dos períodos de amostragem, obtido após uma PCA.	29
Figura 11. Agrupamento das bandas identificadas, pela classe a que pertencem, nas amostras estudadas	35
Figura 12. Gráfico de dispersão que reflete a influência das condições meteorológicas na comunidade bacteriana das diferentes amostras, obtido após análise CCA.	37
Figura 13. Gráfico de dispersão que reflete a influência das condições operacionais da ETAR na comunidade bacteriana das diferentes amostras, obtido após análise CCA.	38
Figura 14. Gráfico de dispersão que reflete a influência da prevalência de cultiváveis resistentes a antibióticos enumerados no afluente, obtido após uma análise CCA.	39
Figura 15. Gráfico de dispersão que reflete a influência da prevalência de cultiváveis resistentes a antibióticos enumerados no efluente, obtido após uma análise CCA.	41
Figura 16. Gráfico de dispersão que reflete a influência da prevalência de antimicrobianos nas águas meteorológicas na comunidade bacteriana das diferentes amostras, obtido após análise CCA.	42
Figura 17. Gráfico de dispersão que reflete a influência da prevalência de antimicrobianos nas águas meteorológicas na comunidade cultivável resistente a antibióticos, obtido após análise CCA.	43

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização geral da ETAR em estudo.	10
Tabela 2. Registo das condições meteorológicas e dos parâmetros físico químicos verificados nos dias amostrados.	18
Tabela 3. Concentração de antimicrobianos quantificados nas diferentes amostras ao longo do estudo.	19
Tabela 4. Prevalência das resistências a antibióticos em bactérias cultiváveis, enumeradas no afluente e no efluente, em cada um dos períodos de amostragem.	23
Tabela 5. Índices usados na análise da diversidade, valores médios, em cada uma das amostras.	30
Tabela 6. Apresentação dos valores próprios de cada banda e para cada eixo, após a análise PCA dos perfis de DGGE de cada uma das amostras.	31
Tabela 7. Identificação das bandas com maior influência na distribuição das amostras	33

Resumo	V
<i>Abstract</i>	VII
Agradecimentos	IX
Lista de Abreviaturas	XI
Índice de Figuras	XIII
Índice de Tabelas	XV
Índice	XVII
INTRODUÇÃO	1
Águas Residuais	1
Estações de tratamento de águas residuais	1
Antibióticos no meio ambiente	2
Resistência a antibióticos	2
Análise de comunidades	4
Estudo de comunidades por DGGE do gene rRNA 16S	5
Análise multivariada e relação com parâmetros ambientais	5
TRABALHO PROPOSTO E OBJETIVO	7
MATERIAL E MÉTODOS	9
A ETAR e o Processo de Amostragem	9
Determinação de antimicrobianos e metais pesados	10
Enumeração de bactérias cultiváveis totais e resistentes	11
Extração de DNA total e amplificação do gene rRNA 16S	11
Electroforese por gradiente de desnaturação (DGGE)	12
Análise de Dados	12
Índices de diversidade e uniformidade das comunidades	13
Afiliação filogenética das bandas de DGGE	14
Análise Multivariada	15
RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
1. Determinação de Parâmetros Ambientais	17
1.1) Parâmetros Operacionais da ETAR e Condições Meteorológicas	17
1.2) Determinação de Agentes Antimicrobianos	18
1.3) Percentagem de Bactérias Cultiváveis Resistentes a Antibióticos	20

2. Análise dos Perfis 16S-DGGE	24
2.1) Distribuição das amostras ao longo do tempo e contribuição relativa de cada uma das espécies.	28
2.2) Índices de Diversidade	30
3. Identificação das Bandas dos Perfis de DGGE	31
3.1) Seleção das Bandas a Identificar	31
3.2) Composição das Comunidades	35
4. Relações entre a Diversidade e Fatores Ambientais	36
4.1) Influência das condições meteorológicas	36
4.2) Influência dos parâmetros operacionais da ETAR	37
4.3) Relação da comunidade bacteriana com as populações cultiváveis resistentes a antibióticos	39
4.4) Relação da comunidade bacteriana com as concentrações de agentes antimicrobianos	41
4.5) Relação entre as percentagens de resistência e as concentrações de agentes antimicrobianos	43
CONCLUSÕES E TRABALHO FUTURO	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

INTRODUÇÃO

Águas residuais

As águas que arrastam resíduos líquidos e sólidos de pequenas dimensões provenientes da atividade humana designam-se águas residuais. De acordo com a sua origem, podem ser classificadas como hospitalares, industriais ou domésticas. Estas são lançadas na rede de esgotos, com ou sem qualquer pré-tratamento, sendo conduzidas às estações de tratamento de águas residuais (ETAR) municipais (Tchobanoglous *et al.*, 2003).

A composição dos resíduos líquidos industriais é muito variável e depende essencialmente do tipo de indústria em questão. Estes requerem normalmente um tratamento dedicado para eliminar contaminantes específicos. As águas residuais originadas na produção animal e de géneros alimentícios apresentam elevada concentração de matéria orgânica, enquanto as destilarias e petroquímicas são ricas em substâncias tóxicas como os metais pesados (Pita, 2002).

As águas residuais domésticas apresentam uma composição relativamente constante, resultante de um conjunto de atividades característico, como seja a alimentação, a higiene pessoal e dos edifícios. O tipo de resíduos produzidos e rejeitados na água, como detergentes, resíduos orgânicos e matérias fecais é, assim, relativamente constante no que diz respeito ao volume de água usada por dia e por habitante, à sua carga orgânica e aos horários de rejeição (cerca de 70 a 80 gramas/pessoa/dia) (Pita, 2002). Estes resíduos caracterizam-se por um elevado potencial de putrefação, muitas vezes associado a um elevado número de bactérias e outros microrganismos que os acompanham.

Estações de tratamento de águas residuais

Na maioria das estações de tratamento de esgotos municipais o afluente bruto sofre um pré-tratamento que consiste na remoção de sólidos volumosos (gradagem) e de areias (decantador primário). Estes tratamentos preliminares têm como principal objetivo a remoção de partículas que possam desgastar os equipamentos mecânicos. Os tanques de decantação otimizam a separação de pequenas partículas sólidas em suspensão, que arrastam consigo cerca de 40% da matéria orgânica presente, antes do afluente seguir para o tratamento secundário (Tchobanoglous *et al.*, 2003).

Nas estações de tratamento, as maiores transformações acontecem durante o processo biológico do tratamento. O processo de lamas ativadas consiste numa complexa comunidade microbiana que metaboliza, num tanque arejado, substâncias orgânicas e inorgânicas. As águas residuais são tratadas de modo a originar efluentes com baixa carga de matéria orgânica, e de microrganismos, compatíveis com as recomendações legais. De uma forma geral, a biomassa num processo de lamas ativadas é constituída, aproximadamente, por 95% de bactérias e 5% de outros organismos, dos quais fazem parte os protozoários

(Tchobanoglous *et al.*, 2003). As bactérias aeróbias são as principais responsáveis pela oxidação da matéria orgânica e certos protozoários possuem características bioquímicas úteis na mineralização de compostos como o azoto e fósforo presentes nas águas residuais (Ziembinska *et al.*, 2009).

Ao fim do tempo de retenção conveniente, o efluente arrastando alguma biomassa é conduzido a um decantador secundário, onde se dá a deposição da biomassa, após a qual, na maioria das ETAR é lançado num curso de água ambiental.

Antibióticos no meio ambiente

A maior parte dos antibióticos comercializados hoje em dia são derivados de compostos naturais produzidos por bactérias ou fungos. Antes da sua aplicação na terapêutica humana, as concentrações destes compostos eram baixas e confinadas ao sítio onde eram produzidas. Pensa-se que na natureza esses metabolitos secundários podem atuar como armas de defesa microbiana, inibindo o crescimento de concorrentes (Davies & Davies, 2010). O equilíbrio natural, que se verificava entre bactérias totalmente suscetíveis e resistentes tem-se vindo a alterar nos últimos 70 anos devido à utilização massiva de antibióticos e outras substâncias com atividade antimicrobiana (Manaia *et al.*, 2012).

Os antibióticos são compostos químicos de origem natural (penicilinas e tetraciclinas) ou semissintéticos (sulfonamidas e quinolonas). Graças à sua atividade antimicrobiana são amplamente utilizados na medicina humana e veterinária (produção avícola, suína e aquicultura) (Kümmerer, 2003; Martinez, 2009). Estes fármacos são, em geral, quimicamente estáveis. Assim, 50 a 90% da dosagem de um antibiótico pode ser excretada inalterada e persistir no meio ambiente e grande parte destes resíduos de antibióticos têm como destino o esgoto doméstico (Radjenovic *et al.*, 2009).

Resistência a antibióticos

O aumento dos índices de resistência a uma ampla gama de antibióticos por uma grande variedade de organismos está a tornar-se uma preocupação prioritária para a medicina moderna (Wright, 2010). Há a ideia de que os ambientes aquáticos em geral e muito particularmente as ETAR, são locais propícios ao desenvolvimento e propagação de bactérias resistentes a antibióticos. Estas populações compreendem dois tipos de organismos, os intrinsecamente resistentes e as bactérias que adquiram determinantes genéticos capazes de conferir essa resistência (Baquero *et al.*, 2008; Kümmerer *et al.*, 2009; Jury *et al.*, 2011).

Um dos fatores chave para a aquisição e proliferação da resistência a antibióticos entre as bactérias parece ser a presença concomitante de elevadas doses de bactérias fecais e de antibióticos em concentrações subletais, como acontece nos tanques de tratamento de águas residuais (Jury *et al.*, 2011).

O tratamento biológico pode reduzir a quantidade de bactérias, como os coliformes e enterococos (entre uma a quatro unidades logarítmicas, dependendo da eficiência), presentes nos esgotos domésticos (Novo & Manaia, 2010). Contudo, há indícios de que, em algumas ETAR e para alguns antibióticos pode ocorrer um aumento na percentagem relativa de bactérias resistentes a antibióticos, após o tratamento (Ferreira da Silva *et al.*, 2006; Ferreira da Silva *et al.*, 2007; Jury *et al.*, 2011).

Alguns estudos têm mostrado variações significativas nos níveis de resistência bacteriana nas águas residuais antes e após o tratamento. Por exemplo, estudos realizados com populações de enterococos mostram que o tratamento por lamas ativadas não foi eficiente na sua eliminação, em particular de *E. faecium* resistentes a ciprofloxacina (Ferreira da Silva *et al.*, 2006). Na mesma ETAR, estudada mais tarde, observou-se uma remoção menos eficiente de enterococos resistentes a amoxicilina ($p < 0,001$) do que bactérias pertencentes a outros grupos (Novo & Manaia, 2010). Os resultados destes estudos apontam no sentido de que o efeito na prevalência de resistência após o tratamento varia consoante o método de tratamento usado, em particular com o tempo de retenção hidráulica a este associado, do antibiótico em questão e do tipo de bactérias em estudo (Manaia *et al.*, 2009; Novo & Manaia, 2010).

A presença de antibióticos em baixas concentrações, como as detetadas nas ETAR, pode servir como uma pressão seletiva para a proliferação preferencial das bactérias resistentes. Segundo um estudo publicado em 2006, Davies e colaboradores descrevem diversos efeitos observados em células bacterianas expostas a baixas concentrações de antibióticos e referem o efeito de hormese. Este conceito foi primeiramente aplicado para descrever os efeitos de baixas doses de radiação (Calabrese *et al.*, 2002). No entanto, hoje em dia, este termo é geralmente usado para descrever respostas biológicas a sinais ambientais que são caracterizados por relações bifásicas de dose-resposta, apresentando sinais de estimulação celular, o aumento da taxa de mutação e da transferência horizontal de genes, o aumento ou diminuição da capacidade de formar biofilmes, bem como, alterações no invólucro celular, quando presentes em baixa concentração e de inibição em altas concentrações (Davies *et al.*, 2006; Yergeau *et al.*, 2010).

Outras substâncias, tais como metais pesados, desinfetantes e alguns produtos de cuidado pessoal, são também importantes poluentes que podem atuar na promoção da disseminação da resistência. Existem várias indicações da sobreposição entre mecanismos de resistência a metais e antibióticos, tais como aqueles para o cobre e as tetraciclinas, cobre e ciprofloxacina, e arsénio e β -lactâmicos (Baker-Austin *et al.*, 2006). Assim, embora ainda seja difícil estabelecer relações claras de causa-efeito, é amplamente aceite que a poluição química contribui para a disseminação da resistência aos antibióticos (Davies & Davies, 2010; Knapp *et al.*, 2011). Por vezes, esse efeito pode ser mediado por co seleção devido a ligação genética (Jury *et al.*, 2011) entre antibióticos e metais. Noutros casos, esta disseminação está associada com alterações celulares ao nível da transcrição proteica, induzida por outros produtos farmacêuticos que não os antibióticos (Baker-Austin *et al.*, 2006).

Análise de comunidades

Durante algum tempo, devido à falta de conhecimento detalhado sobre os organismos envolvidos no processo, as ETAR foram projetadas sobretudo com base em parâmetros físico-químicos. Mesmo assim, a engenharia processual tem permitido tirar bom proveito do potencial metabólico dos microrganismos (Gilbride *et al.*, 2006). O conhecimento detalhado das comunidades microbianas presentes nos sistemas de tratamento de águas residuais, bem como a análise da sua dinâmica ao longo do tempo, pode ajudar a compreender o funcionamento biótico do processo e portanto transformar-se numa ferramenta de gestão na operação do sistema, com vista à máxima eficiência.

A avaliação da diversidade das comunidades microbianas, em termos de riqueza e estrutura, é uma forma de tentar perceber como estas evoluem no seu ambiente e permite ainda inferir acerca da influência de parâmetros ambientais na modulação destas comunidades (Fromin *et al.*, 2002). Durante quase um século, a avaliação da qualidade microbiológica das águas foi baseada em métodos dependentes de cultivo em laboratório e muitas vezes de processamento de culturas puras. Ao longo dos anos estes métodos têm sido continuamente otimizados para detetar e quantificar a presença de organismos relevantes. Mais recentemente, os métodos de análise independentes de cultivo revelaram uma imensa diversidade de organismos, que geralmente não são recuperados nos meios e condições utilizados em laboratório e que portanto se designam de não-cultiváveis. Assim, tem vindo a salientar-se a necessidade de implementar abordagens alternativas para a análise da diversidade bacteriana em amostras ambientais. Estima-se que os organismos não-cultiváveis representem cerca de 99% da diversidade bacteriana em ambientes mesotróficos e entre 85-99% em lamas ativadas (Amann *et al.*, 1995). A incapacidade para crescer em condições laboratoriais inclui: *i*) os organismos que possuem requisitos de crescimento específicos (nutricionais, de arejamento e de temperatura, entre outros) e que não são conhecidos ou não estão disponíveis, *ii*) os organismos de crescimento lento que não são capazes de competir com outros, que mais rapidamente esgotam os nutrientes disponíveis e *iii*) os organismos injuriados, que não suportam as condições adversas impostas pelo cultivo. Estas categorias não estão diretamente relacionadas com grupos taxonómicos específicos (Vaz-Moreira *et al.*, 2011).

A construção de bibliotecas genómicas com base no gene para o rRNA 16S bem como a eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) são metodologias muito comuns atualmente usadas recorrentemente na análise da diversidade bacteriana em amostras de águas (Cébron *et al.*, 2004; de Figueiredo *et al.*, 2007; Moura *et al.*, 2007; Shen *et al.*, 2011). Para além desta, outras técnicas como a pirosequenciação, a hibridação *in situ* de ácidos nucleicos com uso de sondas fluorescentes (FISH) ou a microscopia de varrimento de laser confocal (CLSM) são exemplos de outras técnicas que facilitam o estudo das populações microbianas (Gilbride *et al.*, 2006).

Estudo de comunidades por electroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) do gene rRNA 16S

A aplicação da electroforese em gel desnaturante à Microbiologia tem já cerca de 20 anos. Os pioneiros (Muyzer *et al.*, 1993) analisaram comunidades bacterianas de sedimentos marinhos e de biofilmes isolados de reatores de tratamento de águas residuais. No mesmo estudo, eles analisaram comunidades simuladas a partir de culturas laboratoriais, e demonstraram que a sensibilidade desta técnica permite detetar organismos que representam apenas 1% da comunidade total.

O método baseia-se na extração de DNA genómico total diretamente da amostra e amplificação por PCR de uma zona variável do gene que codifica para o RNA da subunidade menor do ribossoma bacteriano (16S rRNA), recorrendo a primers para zonas conservadas deste gene. O passo da extração e a escolha dos primers podem ser determinantes pois podem de alguma forma enviesar a análise (extração e amplificação preferencial de certas moléculas de DNA).

A electroforese em gel desnaturante permite a separação de pequenos fragmentos de DNA (até 400-500 pb) de cadeia dupla, que são iguais em tamanho mas diferem na sequência nucleotídica. A concentração do agente desnaturante, gradualmente maior ao longo do gel, provoca a separação característica dos fragmentos de DNA que se realiza de acordo com o teor em guanina e citosina das sequências de DNA em estudo, permitindo a distribuição dos fragmentos e a formação de um perfil eletroforético. Assume-se que cada banda representa um grupo taxonómico distinto e os perfis resultantes podem ser comparados (Fromin *et al.*, 2002).

Análise multivariada e relação com parâmetros ambientais

A ecologia é a área da biologia que procura relacionar fatores geográficos, físicos e químicos, e perceber como estes influenciam as diferentes comunidades bióticas. No caso da microbiologia, permite avaliar por exemplo como é que as alterações ambientais e impactos das atividades humanas podem afetar as comunidades.

A análise de componentes principais (PCA) estabelece, a partir de uma matriz de semelhança (correlações, variâncias-covariâncias ou até mesmo de similaridades), um conjunto de eixos (ou componentes) perpendiculares. Cada componente corresponde a um vetor próprio dessa matriz. Assim, a partir de uma matriz de correlação entre m variáveis, serão calculados m vetores próprios, ou eixos fatoriais, de comprimento $\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_m$ decrescente, em função da sua contribuição à variância total dos dados. Esses comprimentos correspondem aos m valores próprios, ou raízes latentes, da matriz. Deste modo, o primeiro eixo da PCA representará sempre a maior parte da variação dos dados (Valentin, 1995). Esta técnica serve a análise descritiva da estrutura das comunidades bacterianas, isto é, a ordenação das bandas em subconjuntos. O recurso a um método que se baseia numa resposta linear é razoável para

a análise de dados quantitativos de abundância de espécies quando estas abrangem uma gama relativamente curta de variação ambiental (Ter Braak, 1986).

A análise de correspondência canônica (CCA) é um método multivariado de ordenação direta que usa de correlação e regressão entre duas matrizes e permite elucidar as relações entre a estrutura da comunidade biológica, as suas espécies e o ambiente. O método foi desenvolvido para extrair gradientes ambientais que sintetizam o conjunto de dados ecológicos. Os gradientes são a base para visualizar e descrever sucintamente as preferências diferenciais de *habitat* (nichos) das espécies através de um diagrama de ordenação (Ter Braak & Verdonschot, 1995). Através de um processo iterativo, o algoritmo seleciona a combinação linear de variáveis ambientais que explica a maior parte da variação dos valores próprios das matrizes obtidas para as espécies, em cada eixo. Na realidade, é uma ordenação que considera a restrição de que os eixos de ordenação sejam combinações lineares de variáveis ambientais. A CCA, ao contrário da PCA, assume, por se tratar de dados ambientais, uma curva de resposta do tipo unimodal. A maior vantagem da CCA sobre todos os outros métodos de análise multivariada é admitir um teste de significância das variáveis ambientais na determinação dos padrões. Através do teste de Monte Carlo, o algoritmo testa todos os eixos associados às variáveis, usando para tal os valores próprios de cada matriz, como teste estatístico (Ter Braak & Verdonschot, 1995). Este tipo de análise é útil pois fornece uma visão geral que permite identificar e direcionar esforços.

Os padrões de agrupamento e a relação com as espécies presentes em cada um dos grupos permitem, pelo menos em alguns casos, definir os tipos de ambiente preferencial de determinadas linhagens de bactérias.

Trabalho proposto e objetivo

Durante a última década têm vindo a acumular-se dados sobre a ocorrência de bactérias resistentes a antibióticos em águas residuais. No entanto, evidências sobre possíveis correlações entre a contaminação com antibióticos e a manutenção ou dispersão de resistência a antibióticos não são tão comuns na literatura disponível.

Este estudo foi planeado para contribuir com perspetivas que ajudem a compreender melhor a possível influência da presença de resíduos de antibióticos na disseminação de resistência durante o tratamento de águas residuais. Pretende-se avaliar a existência de correlações significativas entre diferentes agentes antimicrobianos e/ou classes de organismos, bem como, a influência de parâmetros ambientais nas variações populacionais, e até contribuir para o desenvolvimento de abordagens experimentais que otimizem este tipo de estudos.

Especificamente pretende-se estudar variações nas comunidades microbianas do afluente bruto e após o tratamento numa ETAR municipal e determinar a possível relação destas variações com fatores ambientais, bióticos (percentagem de cultiváveis resistentes) e abióticos (concentrações de antibióticos e metais, condições meteorológicas e condições operacionais).

MATERIAL E MÉTODOS

A ETAR e o processo de amostragem

Este estudo foi realizado numa estação municipal de tratamento de águas residuais, localizada perto de uma cidade, no norte de Portugal, onde o sector de serviços é a principal atividade (41° 13' 58.31" N, 8° 37' 17.63" W).

O afluente, constituído por esgotos domésticos e efluentes industriais pré-tratados (cerca de 30% do total), passa por um tratamento preliminar para remover sólidos volumosos e por um decantador primário para remover sólidos depositados. O esgoto é tratado biologicamente através de um processo de lamas ativadas. Sem qualquer tipo de tratamento terciário o efluente tratado é lançado numa ribeira que desagua no rio Leça.



Figura 1. Vista geral da ETAR, tanques de tratamento biológico, ribeira adjacente à ETAR onde é descarregado o efluente tratado e aspeto das amostras de águas antes e após o tratamento.

Realizaram-se catorze amostragens entre Novembro de 2008 e Abril de 2009, divididas por quatro períodos temporais: no final de Novembro (PI), início de Dezembro (PII), no início de Abril (PIII) e no final deste (PIV). As amostras foram compostas por colheitas efetuadas de hora a hora durante as 24 horas precedentes à recolha (das 9h às 9h). Foram colhidos 3,6 L de afluente ao tanque de tratamento secundário e 4 L de efluente final, de cada uma das misturas compostas, em dias consecutivos, entre terça e sexta-feira, com exceção do período de Dezembro para o qual apenas foi possível realizar amostragem na quinta e sexta-feira.

As amostras de afluente ao tanque biológico e do efluente final da ETAR foram colhidas em frascos estéreis e transportadas para o laboratório num tempo máximo de 30 minutos devidamente acondicionadas e refrigeradas, iniciando-se a análise dentro do prazo de 1 hora. Para cada dia e amostra, foram obtidos dados de carência biológica de oxigénio (CBO_5), carência química de oxigénio (CQO) e volume de água tratada (fornecidos pela ETAR e que serão mais à frente referidos como parâmetros operacionais da ETAR). Estes parâmetros traduzem a quantidade de oxigénio que é consumido, por processos biológicos (CBO) e químicos (CQO), durante a degradação da matéria orgânica presente na água e vem expresso em mgL^{-1} .

Foram também reunidos alguns dados meteorológicos, relativos a zona da ETAR e aos dias a que se referem as amostras colhidas (temperatura do ar, temperatura mínima do solo e humidade relativa do ar).

Tabela 1. Caracterização das condições operacionais da ETAR em estudo.

Tipo de Esgoto	Doméstico (~70%) e Industrial pré-tratado (~30%)	
Tratamento Biológico	Lamas Ativadas	
Caudal Diário Médio ($\text{m}^3\text{dia}^{-1}$)^a	18 500	
Tempo de Retenção Hidráulica (h)	12	
População Servida	≈100 000	
Equivalente Populacional	89 000	
Gama de Valores de CQO na Água	Afluente	490-621
Residual ($\text{mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$)^a	Efluente	55-125
Gama de Valores de CBO_5^{20} na Água	Afluente	206-355
Residual ($\text{mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$)^a	Efluente	11-29
Local de Descarga do Efluente Final	Rio Leça (Ribeira)	

CBO_5^{20} corresponde ao oxigénio consumido na degradação da matéria orgânica, a uma temperatura média de 20°C, durante 5 dias.

^a Dados fornecidos pela ETAR

^b Determinações efetuadas pela Agência Portuguesa do Ambiente, só para os períodos III e IV.

Determinação de agentes antimicrobianos e metais pesados

A quantificação de antimicrobianos e metais nas amostras de afluente ao tanque biológico e efluente final da ETAR foi realizada pela Agência Portuguesa do Ambiente. Os agentes pesquisados foram penicilinas (penicilina G e penicilina V), tetraciclina (oxitetraciclina, tetraciclina, doxiciclina e clorotetraciclina), sulfonamidas (sulfatiazol, sulfametoxazol e sulfametazina), quinolonas (enrofloxacina, ciprofloxacina, ofloxacina); metais: cádmio (Cd), crómio (Cr), mercúrio (Hg) e arsénio (As) e o agente antisséptico triclosan. A metodologia analítica aplicada baseou-se na cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS), para a preparação das amostras recorreu-se à extração por SPE (extração em fase sólida) e utilização do método do padrão interno.

Enumeração das bactérias cultiváveis totais e resistentes

A enumeração de bactérias cultiváveis foi realizada em Plate Count Agar (PCA, Pronadisa), para isolamento de heterotróficos totais, em m-Faecal Coliform agar (Difco), meio selectivo para coliformes e diferencial para coliformes fecais e em m-Enterococcus (Difco) para enterococos. As bactérias cultiváveis resistentes a antibióticos foram enumeradas nos mesmos meios, suplementados com amoxicilina, 32 mgL⁻¹, tetraciclina, 16 mgL⁻¹; sulfametoxazol, 350 mgL⁻¹ ou ciprofloxacina, 4 mgL⁻¹ (Manaia e Novo, 2010).

As percentagens de resistência foram calculadas através da relação do número de unidades formadoras de colónias por mililitro (UFC.mL⁻¹) em meio com antibiótico e no mesmo meio sem antibiótico, de acordo com o exemplo indicado abaixo.

$$\% \text{Heterotróficos resistentes a AML} = \frac{(\text{UFC.mL}^{-1}) \text{ enumerados em PCA com AML}}{(\text{UFC.mL}^{-1}) \text{ enumerados em PCA}} \times 100$$

Os dados das percentagem de cultiváveis resistentes a antibióticos enumerados no afluente e no efluente tratado, bem como a sua remoção após o tratamento, depois de agrupados por grupo bacteriano e por antibiótico foram comparados ao longo do tempo, entre os quatro períodos, por meio de análise de variância e do teste *post hoc* de Tukey (SPSS 16.0 for Windows).

Extração de DNA total e amplificação do gene rRNA 16S

Para a extração de DNA para o estudo de comunidades bacterianas, utilizaram-se volumes de 25 mL de amostra de afluente ao tanque biológico e de 150 mL de efluente tratado. As amostras foram filtradas, em triplicado, através de membranas de policarbonato (Whatman, Kent, UK) com o poro de 0,22 µm de diâmetro. O DNA total foi extraído com auxílio de sistema comercial (PowerSoil™ MO BIO Laboratories Inc., Carlsbad, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. A quantidade de DNA nos extratos foi avaliada por fluorometria (Qubit™ Fluorometer, Invitrogen, EUA).

Para posterior análise, amplificou-se um segmento de cerca de 200 pb do gene rRNA 16S, com recurso aos *primers* 338*Fw*, com uma sequência satélite de 40 pb rica em GC (5'-GC_(40pb) ACT ACG GGT CCC AGC AGA GG-3'), e 518*Rv* (5'- ATT ACC GCG GCT GCT GG-3') (Eurofins, MWG Biotech), conforme proposto por (Muyzer *et al.*, 1993). As reações de amplificação foram realizadas num volume final de 50 µL, contendo 3 mM de MgCl₂, 400 µM de cada dNTP (Fermentas), 0,5 x de tampão de PCR contendo (NH₄)₂SO₄ e 0,5 x de tampão de PCR contendo KCl, 5 % de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma), 600 µM de cada um dos *primers*, 1,5 U de polimerase Surf *Taq* (StabVida, Portugal) e 2-120 ng de DNA molde. As condições de PCR incluíram sempre um passo inicial de desnaturação a 94 °C durante 5 minutos, 35 ciclos (30 segundos a 92 °C, 30 segundos a 55 °C, 30 segundos a 72 °C), e um passo de extensão final de 20 minutos a 72 °C (Thermalcycler, Biometra).

Electroforese por gradiente de desnaturação (DGGE)

Os produtos de PCR foram analisados em géis de poliacrilamida a 8 % (p/v) com um gradiente de desnaturação de 30 a 52 % (onde 100 % corresponde a 7 M de ureia e 40 % de formamida), conforme (Barreiros *et al.*, 2008). Em cada poço, aplicou-se um volume de amostra contendo 1,8 µg de DNA. Cada gel permitia a análise de catorze amostras, sendo colocadas as referências necessárias para alinhamento dos géis na primeira e última posições. Estes géis foram submetidos a uma corrente de 20 V por 15 minutos e depois a 200 V durante 5,5 horas, mergulhados em TAE (1 x) aquecido a 60 °C.



Figura 2. a) Montagem dos vidros de suporte; b) preparação do gel de gradiente desnaturante (30-52%); c) polimerização do gel; d) corrida do gel em TAE (1x) a 220V e 60°C durante 5h30. Fotos cedidas por Ana Rita Lopes.

Análise de dados

Os perfis de DGGE obtidos foram comparados usando o programa BioNumerics (versão 6.0, Applied Maths, Bélgica). Os géis foram alinhados com auxílio de um marcador de DGGE, em uso no laboratório (Fig. 4), que era colocado nas extremidades de todos os géis. Os géis com amostras de afluente e efluente foram analisados separadamente. As bandas presentes em cada um dos perfis foram alinhadas automaticamente pelo programa BioNumerics não havendo lugar a alinhamento manual.

Com base nesta análise, para cada pista foi possível registrar cada uma das bandas e a sua intensidade. A análise de todas as amostras, de afluente e efluente, processadas e analisadas em triplicado deu origem a uma tabela com 42 perfis.

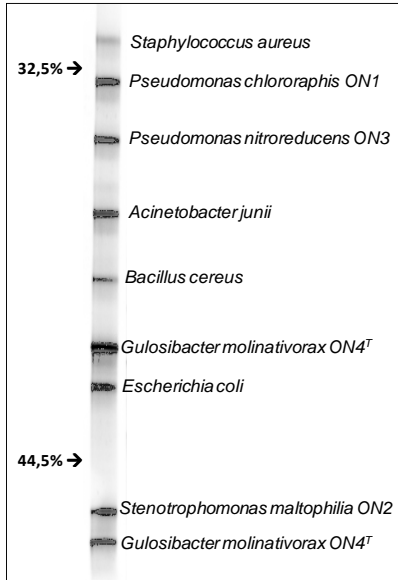


Figura 3. Perfil eletroforético das pistas de referência, ou marcador de DGGE, colocadas nas primeiras e últimas pistas de todos os géis e usadas para a normalização entre géis e para referência da posição relativa de cada banda. À direita do perfil, indica-se a identificação do organismo que corresponde a cada banda, os DNA destes foram extraídos de culturas puras, pelo método de fervura e o seu rDNA 16S (338Fw-GC/518R) amplificado da mesma forma que as amostras.

Índices de diversidade e uniformidade das comunidades

A diversidade e a uniformidade dos perfis obtidos para cada amostra foram medidas usando os índices de *Shannon* e de *Pielou*, respetivamente (Shannon & Weaver, 1963; Pielou, 1966). As bandas de PCR-DGGE foram a base para a realização destes cálculos, assumindo que cada banda corresponde a uma única espécie e que a sua intensidade reflete a abundância relativa da espécie na comunidade.

A vantagem da utilização do índice de diversidade de Shannon (H') é que este tem em consideração a riqueza (o número de espécies diferentes na amostra), e também a dominância (maior prevalência de determinada espécie) de certas espécies no perfil analisado. Será tanto maior quanto maior a riqueza, ou quanto mais uniformes forem as intensidades relativas das espécies presentes (Shannon & Weaver, 1963).

O índice de diversidade de Shannon (H') foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$H' = - \sum p_i \cdot \ln(p_i)$$

Sendo p_i a intensidade relativa de determinada banda/espécie no perfil em questão,

$$p_i = \frac{n_i}{N}$$

Em que, n_i representa a intensidade de determinada banda num perfil e N a soma das intensidades de todas as espécies presentes nesse mesmo perfil.

O índice de uniformidade de Pielou (E) varia entre 0 e 1. O valor mínimo indica a predominância acentuada de algumas espécies (maior intensidade relativa), até ao máximo o que nos assegura uma abundância relativa igual para todas as espécies presentes nesse perfil.

Este foi calculado segundo a fórmula abaixo apresentada:

$$E = \frac{H'}{\ln H_{m\acute{a}x}}$$

Como este índice foi calculado em função de H' , $H_{m\acute{a}x}$ é igual a N .

Afiliação filogenética das bandas de DGGE

As bandas de maior intensidade, mais frequentes nas amostras ou diferenciadoras de certos perfis de DGGE foram excisadas para posterior análise. Com este objetivo, bandas consideradas homólogas, foram analisadas a partir de vários perfis, com o intuito de validar a correspondência entre amostras. A correspondência de bandas foi proposta com base numa análise visual de géis que continham as amostras que se pretendia comparar e com referência às pistas de marcador, incluídas em todos os géis.

Cada fragmento excisado foi eluído em 20 μ L de água ultra pura e submetido a amplificação PCR com os *primers* usados anteriormente (338Fw-GC/518Rv). Os produtos de PCR foram clonados para garantir a qualidade e pureza dos fragmentos de DNA, antes da sequenciação. Os produtos de amplificação, depois de quantificado o DNA, foram ligados a um vetor pTZ57R/T, segundo o protocolo do InsTAclone™ PCR Cloning Kit (Fermentas). Este plasmídeo recombinante foi utilizado para a transformação de *Escherichia coli* JM109, competente por RbCl, após choque térmico (Sambrook *et al.*, 1989).

Para a transformação usaram-se 2,5 μ L de mistura de ligação para cada 50 μ L de células competentes, após 20 minutos em gelo, esta mistura incubou por 75 segundos a 42 °C, após os quais foi rapidamente recolocada em gelo. De seguida, adicionaram-se 850 μ L de meio SOC (*Super Optimal broth with Catabolite repression*) (Sambrook *et al.*, 1989) e incubou-se a 37 °C, com agitação a 100 r.p.m. durante 2,5 horas.

Ao fim deste tempo, espalharam-se 150 μL da suspensão celular em meio Luria-Bertani agar contendo ampicilina ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$), IPTG a 0,5 mM e X-Gal a $80 \mu\text{g mL}^{-1}$. A cultura incubou durante 24 h a 37 °C. O DNA das colônias brancas, presumivelmente positivas para a presença do segmento de interesse, foi extraído por fervura, e sujeito a amplificação com *primers* específicos para o vetor, M13pUC *Fw* (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3') e M13pUC *Rv* (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'). Os produtos de PCR, com 400 pb foram sujeitos a nova amplificação com os *primers* 338*Fw*-GC e 518*Rv*.

Estes produtos de PCR foram de novo comparados, por DGGE, lado a lado com o perfil de onde haviam sido excisados, para confirmar a autenticidade da banda em estudo. Quando se confirmava a presença da banda de interesse, o segmento inserido era amplificado com os *primers* do vetor e sequenciado com o *primer* M13pUC *Fw*. A sequência nucleotídica resultante foi analisada entre as regiões de ligação AGAT e ATCGG, com auxílio da aplicação BioEdit (Hall, 1999). As sequências foram comparadas com a base de dados do GenBank com auxílio da ferramenta *BLAST* incluída no sítio da internet do *National Centre of Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Análise Multivariada

A análise multivariada é a área da análise estatística que procura explorar as relações entre variáveis dependentes. Os métodos multivariados são poderosos, permitindo ao analista manipular diversas variáveis simultaneamente. São, porém, bastantes complexos, tanto na sua estrutura teórica como na metodologia operacional.

A escolha do método de análise multivariada mais adequado depende da precisão desejada, da facilidade da análise e da forma como os dados foram obtidos. Assim, nos métodos de componentes principais e de análise canônica, o objetivo é avaliar a similaridade entre os perfis por intermédio da análise visual da dispersão gráfica gerada, para a qual se consideram, em geral, os dois primeiros eixos cartesianos (Valentin, 1995).

A análise da estrutura das comunidades bacterianas das amostras de afluente e de efluente ao longo do tempo foi realizada pelo método de análise de componentes principais (PCA).

A análise de correspondência canônica (CCA) é um método multivariado de ordenação direta que usa de correlação e regressão entre duas matrizes. Recorreu-se a este método para comparar as variações nas estruturas das comunidades das amostras e os parâmetros ambientais bióticos (percentagem de cultiváveis resistentes a antibióticos) e abióticos (concentração de antimicrobianos, condições meteorológicas e alguns parâmetros operacionais).

Os dados usados na análise multivariada estavam organizados em tabelas de dupla entrada em que foram comparadas dados relativos a cada tipo de água separadamente. Assim, cada tabela, contendo as datas de amostragem contra bandas e suas intensidades ou datas de amostragem contra percentagens de cultiváveis resistentes a antibióticos consideradas na análise como espécies, foi confrontada com tabelas equivalentes contendo para cada dia de amostragem os parâmetros físico-químicos (condições meteorológicas, parâmetros operacionais e concentração de agentes químicos) e bióticos (percentagens de cultiváveis resistentes a antibióticos) que foram considerados as variáveis ambientais.

Toda a análise multivariada foi elaborada utilizando o programa Canoco para Windows (versão 4.5, EUA), (Ter Braak e Smilauer, 2002). Os gráficos de dispersão foram analisados visualmente com auxílio dos resultados gerados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Determinação dos Parâmetros Ambientais

Neste estudo, o termo parâmetro ou fator ambiental, refere-se a fatores característicos das amostras (CQO, concentração de determinado antibiótico, percentagem de bactérias resistentes a determinado antibiótico), do tratamento (caudal) ou do dia da colheita (temperatura do ar, humidade relativa). Estas variáveis ambientais foram analisadas de forma a verificar a existência de alguma relação entre estas e as populações bacterianas encontradas nas amostras.

1.1 Parâmetros Operacionais da ETAR e Condições Meteorológicas

A descrição dos parâmetros operacionais e das condições meteorológicas foi importante para qualificar a eficácia do tratamento e para posterior inclusão na análise multivariada.

A qualidade e a estabilidade do tratamento das águas residuais, durante o período de amostragem, foram sempre confirmadas pelas elevadas taxas de remoção de matéria orgânica em termos de Carência Biológica de Oxigénio (CBO) e Carência Química de Oxigénio (CQO). Os valores de remoção encontrados durante o período de amostragem, entre os 79 e 91% no que se refere à CQO e entre os 88 e 97% em relação à CBO₅ (tabela 2), comprovam o bom funcionamento da ETAR estudada, quanto à eliminação de matéria orgânica.

O caudal de afluente tratado foi aproximadamente constante durante toda a amostragem variando, entre ~14500 e ~19500 m³ por dia. Deste padrão, excetua-se o período II, correspondente ao início de dezembro, em que se verificou um caudal médio diário de 25011 m³dia⁻¹. Este valor, assim como a humidade relativa, deve-se às fortes chuvadas que aconteceram nesta altura e que foram captadas pela rede de esgotos, fazendo aumentar o caudal de afluente à ETAR.

Os valores de temperatura média do ar atingiram, como era esperado, valores mais baixos durante o período I, entre 7 e 12 °C (tabela 2) e mais altos no período IV, entre 13 e 17 °C. Mais especificamente, nos dias 27 e 28 de novembro, este parâmetro não foi além dos 7 °C enquanto nos dias 23 e 24 de abril os valores de temperatura média do ar chegaram aos 17 °C.

A temperatura mínima do solo variou muito no primeiro período de amostragem, período no qual se verificam o valor mínimo e máximo deste parâmetro, -1,1 °C e 9,6 °C, respetivamente. A humidade relativa do ar registou um máximo durante o período II, onde atingiu valores de cerca de 96 % e o seu mínimo verificou-se nos dias 1 e 2 de abril, durante o período III, para os quais este parâmetro rondou os 50%. O valor médio deste parâmetro durante os anos de 2008 e 2009 foi de 75,2%. Considerando o período em questão, o PII registou valores de humidade relativa do ar média (96%) bastante superiores aos valores normais médios de 30 anos (1961 a 1990) cujo valor foi de 86% (valores cedidos pelo Instituto Português do Mar e da Atmosfera).

Tabela 2. Registo das condições meteorológicas verificadas nos dias amostrados, caudal tratado e características das amostras em termos de CQO e CBO.

Data	Condições Meteorológicas					Caudal tratado (m ³ dia ⁻¹)	Amostra	Caraterísticas	
	Temperatura Mínima Ar (°C)	Temperatura Média Ar (°C)	Temperatura Máxima Ar (°C)	Humidade Relativa Ar (%)	Temperatura Mínima Solo (°C)			CQO (mgL ⁻¹)	CBO (mgL ⁻¹)
25.11.08	10,6	12,0	13,4	92,3	9,6	15 753	Afluente	603	288*
							Efluente	75	22*
26.11.08	3,9	8,6	13,3	70,3	1,8	15 066	Afluente	578*	288*
							Efluente	82*	22*
27.11.08	1,1	6,9	12,8	55,0	-1,1	14 747	Afluente	562	277
							Efluente	96	11
28.11.08	2,7	7,5	12,3	53,7	0,4	14 960	Afluente	551	295
							Efluente	67	25
04.12.08	6,6	9,9	13,2	94,0	5,1	24 417	Afluente	611	288*
							Efluente	93	22*
05.12.08	9,7	11,5	13,3	96,3	8	25 605	Afluente	490	206
							Efluente	79	25
31.03.09	3,4	8,9	14,5	68,7	-0,4	18 289	Afluente	578*	288*
							Efluente	82*	22*
01.04.09	7,2	11,9	16,6	49,7	2,0	18 868	Afluente	578*	288*
							Efluente	82*	22*
02.04.09	7,4	11,9	16,5	50,0	2,0	19 556	Afluente	595	308
							Efluente	125	29
03.04.09	6,7	10,9	15,2	79,0	2,8	19 337	Afluente	609	284
							Efluente	125	29
21.04.09	9,1	12,9	16,8	78,3	6,0	18 983	Afluente	553	288*
							Efluente	67	22*
22.04.09	7,7	13,3	19,0	67,0	4,9	18 320	Afluente	564	288*
							Efluente	60	22*
23.04.09	8,6	14,9	21,2	55,3	5,3	18 431	Afluente	596	355
							Efluente	55	12
24.04.09	10,9	17,1	23,3	58,0	7,0	17 779	Afluente	621	288*
							Efluente	63	22*

*, Sem dados. Optou-se por usar a média dos valores registados na mesma amostra, nas restantes amostragens.

1.2. Determinação de agentes antimicrobianos

As ETAR recebem diariamente quantidades consideráveis de antibióticos não metabolizados ou dos seus metabolitos, além de outros poluentes ambientais. As águas residuais domésticas recebem também uma mistura complexa de bactérias ambientais e comensais de humanos, que ao permanecerem durante o tempo do tratamento em contacto direto com uma quantidade considerável de agentes antimicrobianos e outras substâncias de efeitos desconhecidos que podem atuar sobre o metabolismo bacteriano e consequentemente nestas comunidades (Yergeau *et al.*, 2010; Kim & Aga, 2007; Schluter *et al.*, 2008).

Não foi possível determinar a concentração de alguns dos agentes químicos, pois esta encontrava-se abaixo do limite de quantificação. Foram os casos dos antibióticos estreptomicina (0,25 µgL⁻¹) e sulfametoxazol (0,125 µgL⁻¹) e dos metais cádmio (50 µgL⁻¹), chumbo (100 µgL⁻¹) e crómio (50 µgL⁻¹),

De todos os agentes antimicrobianos quantificados apenas os antibióticos: oxitetraciclina; tetraciclina; doxiciclina; clorotetraciclina; penicilina G; penicilina V; sulfatiazol; sulfametazina; enrofloxacina; ciprofloxacina e ofloxacina, o triclosan e o arsênio apresentaram a variabilidade, ao longo do tempo, necessária para serem consideradas na análise multivariada efetuada com recurso a estes parâmetros (tabela 3).

Nas amostras de afluente à ETAR as concentrações mais elevadas foram detetadas para tetraciclina ($12,8 \mu\text{gL}^{-1}$), oxitetraciclina ($10,5 \mu\text{gL}^{-1}$), penicilina G ($6,3 \mu\text{gL}^{-1}$) e ofloxacina ($6,7 \mu\text{gL}^{-1}$). Os valores médios estão de acordo com um estudo de revisão sobre esta temática e que contempla o mesmo tipo de amostras (Kümmerer, 2009). Apesar de haver outro estudo em que a determinação de tetraciclina, cerca de $1,1 \mu\text{gL}^{-1}$ ficou muito aquém dos valores aqui mencionados (Batt *et al.*, 2007). No efluente as quantificações indicam maior prevalência dos antibióticos sulfatiazol ($1,97 \mu\text{gL}^{-1}$), tetraciclina ($4,1 \mu\text{gL}^{-1}$) e penicilina G ($15,6 \mu\text{gL}^{-1}$), sendo que os dois primeiros estão de acordo com o referido na literatura.

Tabela 3. Determinação dos antimicrobianos: **OXT**, oxitetraciclina; **TET**, tetraciclina; **DOX**, doxiciclina; **CLT**, clorotetraciclina; **PNG**, penicilina G; **PNV**, penicilina V; **STZ**, sulfatiazol; **SMZ**, sulfametazina; **ENR**, enrofloxacina; **CIP**, ciprofloxacina; **OFL**, ofloxacina, nas amostras de afluente e efluente, durante os períodos III e IV.

Data	Amostra	Tetraciclinas (μgL^{-1})				Penicilinas (μgL^{-1})		Sulfonamidas (μgL^{-1})		Quinolonas (μgL^{-1})			Triclosan (μgL^{-1})	Arsénio (μgL^{-1})
		OXT	TET	DOX	CLT	PNG	PNV	STZI	SMZ	ENR	CIP	OFL		
31.03.09	Afluente	9,45 *	11,73 *	5,34*	0,20	0,52	1,12*	1,18	3,21	0,76	0,30	1,10	0,54	1,80
31.03.09	Efluente	<0,14	4,23*	<0,12	0,64*	15,57*	<0,13	1,12	0,24	0,34	1,31*	0,96*	0,68	1,70
01.04.09	Afluente	9,45 *	11,73 *	5,34*	0,68	0,67	1,12*	2,06	1,52	1,23*	0,71	1,67	0,55	2,50
01.04.09	Efluente	<0,14	4,23*	<0,12	0,40	15,57*	<0,13	0,61	0,21	0,63*	0,37	0,37	0,70	1,50
02.04.09	Afluente	6,22	13,65	1,36	0,92	7,50	0,41	6,90	1,08	1,61	1,49	12,35	0,62	2,20
02.04.09	Efluente	<0,14	3,51	1,31	0,64*	12,42	0,35	2,76	<0,13	1,19	1,45	1,78	0,60	1,90
03.04.09	Afluente	6,31	10,20	4,08	1,17	7,92	1,55	10,92	2,16	1,23*	1,07	1,49	0,60	2,20
03.04.09	Efluente	<0,14	2,32	<0,12	0,64*	13,87	<0,13	3,33	0,74	0,63*	1,23	0,39	0,60	1,50
21.04.09	Afluente	7,98	18,20	5,34*	4,11	8,62	2,72	4,79	2,59	1,14	2,54	2,49	0,58	2,20
21.04.09	Efluente	-	4,23*	-	0,64*	15,57*	-	2,17*	-	0,63*	1,31*	0,96*	0,61*	1,80
22.04.09	Afluente	11,40	9,89	5,51	1,12	5,81	0,56	7,29	2,70	1,35	2,47	6,12	0,59	2,00
22.04.09	Efluente	<0,14	3,77	2,12	1,12	13,76	<0,13	2,57	<0,13	0,63*	1,89	0,31	0,55	2,10
23.04.09	Afluente	14,70	11,09	6,93	1,02	12,02	0,16	2,67	4,54	1,25	2,58	6,05	0,56	2,15*
23.04.09	Efluente	<0,14	5,73	<0,12	0,74	18,84	<0,13	2,57	<0,13	0,28	1,83	1,23	0,56	2,10
24.04.09	Afluente	10,10	7,34	8,80	1,40	11,02	1,34	6,83	2,17	1,29	5,04	11,67	0,54	2,15*
24.04.09	Efluente	<0,14	5,80	<0,12	0,30	18,97	0,32	2,23	0,58	0,70	1,06	1,69	0,57	1,80*

-, Não foi possível analisar.

*, Sem dados. Optou-se por usar a média dos valores das determinações efetuadas à mesma amostra nas restantes amostragens.

A concentração de penicilina G está bastante acima da mencionada no artigo referenciado antes, mas o curioso é que em ambos se verificou um ligeiro aumento na concentração deste antibiótico após o tratamento. A ciprofloxacina foi detetada, em ambas as amostras, a concentrações ($2,67 \mu\text{gL}^{-1}$ e $1,1 \mu\text{gL}^{-1}$, no afluente e no efluente respetivamente) ligeiramente superiores à mencionada na literatura disponível que menciona valores médios de $1,1 \mu\text{gL}^{-1}$

para o afluente e $0,45 \mu\text{gL}^{-1}$ após o tratamento, por lamas ativadas (Batt *et al.*, 2007), mas em ambos os casos o valor de remoção média ronda os 41%

O metal pesado encontrado em maior quantidade foi o arsénio para o qual se verificaram concentrações médias de $2,2 \mu\text{gL}^{-1}$ no afluente e $1,8 \mu\text{gL}^{-1}$ no efluente. O desinfetante triclosan foi detetado em concentrações médias de $0,59 \mu\text{gL}^{-1}$ em ambos os tipos de amostras não se verificando qualquer remoção deste agente após o tratamento. Este resultado não corresponde ao esperado, pois segundo a bibliografia, este agente é removido com taxas entre os 58% e os 98% (Thompson *et al.*, 2005), em ETAR com o mesmo tipo de tratamento biológico, devido à sua adsorção às lamas e à degradação, designadamente de origem biológica.

1.3. Percentagem de bactérias cultiváveis resistentes a antibióticos

Neste estudo, o termo resistente refere-se a bactérias que foram capazes de crescer em meio sólido suplementado com antibiótico. A análise das percentagens de bactérias cultiváveis (heterotróficas, coliformes e enterococos) resistentes a antibióticos (amoxicilina, tetraciclina, sulfametoxazol e ciprofloxacina) antes e após o tratamento durante este estudo (tabela 4), revelou que os valores mais elevados de prevalência de resistência foram observados para enterococos resistentes a sulfametoxazol (72,1 % no afluente e 75,6 %, no efluente) e as menores para amoxicilina (0,6 % e 0,9 %, média dos 4 períodos, no afluente e efluente, respetivamente). Os valores encontrados encontram-se na mesma gama dos detetados anteriormente para a mesma estação de tratamento (Novo & Manaia, 2010). No estudo anterior compararam-se três tratamentos biológicos diferentes e duas das amostragens da ETAR de lamas ativadas são comuns a este estudo (31.03.09 e 21.04.09).

De acordo com dados não publicados, mas disponíveis no grupo onde foi realizado o trabalho, os heterotróficos presentes em águas residuais compreendem essencialmente espécies de *Pseudomonas*, *P. aeruginosa* em particular, *Acinetobacter* spp., *Aeromonas* spp., entre outras, como as enterobactérias não *Echerichia coli* (Novo & Manaia, 2010). Em relação a este grupo bacteriano os valores de resistência médios, para afluente e efluente, foram mais elevados no que respeita a amoxicilina, 38,4 % e 35,1 %, e as menores foram observadas para o antibiótico tetraciclina, 1,6% e 2,1 %, respetivamente. O valor de resistência verificado para amoxicilina poderá justificar-se pelo facto de as penicilinas, e a amoxicilina em particular, serem os antibióticos mais vulgarmente prescritos.

As enterobactérias, assim como as bactérias heterotróficas totais apresentavam percentagens de resistência ao β -lactâmico amoxicilina de 43,6 % e 38,5 %, à entrada e saída do tratamento, respetivamente. Neste estudo, e devido ao meio de cultivo utilizado, a espécie predominante entre as enterobactérias será *E. coli*, um indicador de contaminação fecal e um dos vetores de disseminação de resistências mais estudado (Ferreira da Silva *et al.*, 2007).

Comparando com os heterotróficos, as enterobactérias cultiváveis foram eliminadas após o tratamento de forma mais extensa. De facto, as taxas de remoção deste grupo foi sempre

superior à dos heterotróficos (tabela 4) em todos os períodos e antibióticos em estudo, exceto nos resistentes a CIP. Estes resultados sugerem que os heterotróficos, mais do que as enterobactérias, podem ser relevantes vetores na resistência aos antibióticos em estações de tratamento de águas residuais.

De acordo com estudos anteriores, as principais espécies de enterococos encontradas em ETAR's são *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* e *Enterococcus hirae* (Ferreira da Silva *et al.*, 2006), estas bactérias crescem lentamente e talvez por esse motivo são menos prevalentes do que os restantes grupos em estudo. Estes evidenciam taxas muito baixas de resistência β -lactâmicos, a percentagem de resistentes a amoxicilina variou entre 0,1 e 1,5 % no afluente e entre 0,3 e 1,6 % no efluente. A prevalência de resistentes a tetraciclina e sulfametoxazol foi bastante mais elevada neste grupo bacteriano. Os valores médios de resistência no afluente e no efluente ao longo dos quatro períodos, foram 16,6 % e 20,4 % para a tetraciclina, e 72,1 % e 75,6 % para sulfametoxazol.

Em relação à ciprofloxacina e para os três grupos bacterianos, a percentagem de bactérias resistentes encontradas no efluente foi significativamente maior ($p \leq 0,05$) no PII em relação aos restantes períodos. Esta diferença significativa pode dever-se ao facto do caudal tratado ser maior e por isso o processo tornar-se de alguma forma menos eficaz, este efeito verifica-se também para os heterotróficos resistentes a tetraciclina e para os coliformes resistentes a sulfametoxazol.

Tabela 4. Prevalência das resistências a antibióticos em diferentes grupos de bactérias cultiváveis, enumeradas em afluente e efluente, para cada um dos períodos de amostragem (*n* indica o número de amostras analisadas por período; **a, b, c e d**, grupos de homogeneidade, para cada período, com base no teste de *Tukey*; $p \leq 0,05$).

Grupos cultivados	Período	% Resistentes a AML			% Resistentes a TET			% Resistentes a SUL			% Resistentes a CIP		
		Afluente	Efluente	Remoção*	Afluente	Efluente	Remoção*	Afluente	Efluente	Remoção*	Afluente	Efluente	Remoção*
Heterotróficos	PI (<i>n</i> =12)	39,0 ^(a) (25-51)	36,9 ^(a) (18-63)	86,3 ^(a,b)	1,2 ^(a) (0,4-1,7)	1,5 ^(a) (0,8-2,7)	85,5 ^(b,c)	0,6 ^(a) (0,2-1,1)	0,6 ^(a) (0,1-1,2)	86,4 ^(b)	3,1 ^(b) (1,3-6,0)	1,4 ^(a) (0,8-2,3)	93,1 ^(b,c)
	PII (<i>n</i> =6)	36,1 ^(a) (18-63)	34,8 ^(a) (22-52)	96,1 ^(b)	0,9 ^(a) (0,8-1,1)	3,5 ^(b) (1,5-5,0)	65,6 ^(a)	ND	0,7 ^(a) (0,4-1,0)	ND	1,2 ^(a) (0,8-2,3)	3,2 ^(b) (2,2-3,7)	77,1 ^(a)
	PIII (<i>n</i> =12)	37,4 ^(a) (22-57)	42,0 ^(a) (23-63)	77,5 ^(a)	1,7 ^(a,b) (0,9-2,4)	1,9 ^(a) (1,4-3,2)	77,8 ^(a,b)	10,0 ^(b) (1,2-22)	11,7 ^(b) (2,5-19)	52,3 ^(a)	2,6 ^(b) (1,6-4,3)	1,8 ^(a) (0,9-3,0)	87,9 ^(d)
	PIV (<i>n</i> =12)	39,7 ^(a) (23-55)	29,0 ^(a) (19-43)	96,3 ^(b)	2,3 ^(b) (1,0-5,2)	2,0 ^(a) (0,5-4,8)	92,4 ^(c)	14,9 ^(b) (5,8-25)	12,9 ^(b) (6,5-19)	79,3 ^(a,b)	2,2 ^(a,b) (1,3-4,1)	1,3 ^(a) (0,9-2,5)	96,1 ^(c)
	Média	38,4	35,1	87,5	1,6	2,0	82,4	9,2	7,3	71,4	2,5	1,7	90,2
Coliformes	PI (<i>n</i> =12)	33,3 ^(a) (18-50)	41,1 ^(b) (27-59)	91,9 ^(b)	2,4 ^(a) (1,0-4,3)	2,2 ^(a) (1,6-3,1)	92,4 ^(a)	1,7 ^(a) (0,8-2,8)	4,7 ^(a) (2,4-6,8)	86,5 ^(a)	1,1 ^(a) (0,8-1,5)	2,7 ^(b) (1,7-4,9)	85,1 ^(a,b)
	PII (<i>n</i> =6)	46,3 ^(a) (37-66)	65,1 ^(c) (52-80)	85,3 ^(a)	2,8 ^(a) (2,2-3,4)	3,4 ^(a) (2,9-4,7)	91,9 ^(a)	5,6 ^(b) (1,1-10)	7,5 ^(a) (5,9-9,8)	88,6 ^(a,b)	1,5 ^(a) (1,3-2,0)	2,8 ^(b) (1,8-4,0)	84,5 ^(a,b)
	PIII (<i>n</i> =12)	38,7 ^(a) (19-83)	22,6 ^(a) (14-28)	90,3 ^(a,b)	3,9 ^(a) (2,3-8,4)	3,7 ^(a) (1,2-7,9)	83,7 ^(a)	6,9 ^(b) (2,8-11)	7,3 ^(a) (2,1-13)	81,2 ^(a)	2,4 ^(b) (0,7-4,8)	2,0 ^(a,b) (0,9-5,4)	81,2 ^(a)
	PIV (<i>n</i> =12)	60,9 ^(a) (24-92)	38,3 ^(a,b) (18-77)	97,7 ^(c)	3,2 ^(a) (1,8-5,6)	4,0 ^(a) (2,2-5,9)	93,9 ^(a)	12,3 ^(c) (8,2-17)	13,6 ^(b) (2,2-32)	96,5 ^(b)	1,2 ^(a) (0,7-1,7)	1,0 ^(a) (0,3-2,1)	97,3 ^(b)
	Média	43,6	38,5	92,5	3,1	3,3	89,5	7,2	8,4	88,3	1,6	2,1	87,2
Enterococos	PI (<i>n</i> =12)	0,1 ^(a) (0,1-0,2)	1,3 ^(b) (0,9-1,6)	50,0 ^(a)	14,1 ^(a) (8,1-27)	19,7 ^(a) (13-26)	85,6 ^(b,c)	66,5 ^(a) (49-98)	73,4 ^(a,b) (55-97)	86,0 ^(c)	1,7 ^(a) (0,2-2,9)	2,6 ^(a,b) (1,5-3,1)	82,5 ^(b)
	PII (<i>n</i> =6)	0,7 ^(b) (0,4-0,8)	1,2 ^(a,b) (1,0-1,5)	50,0 ^(a)	17,4 ^(a) (13-21)	17,6 ^(a) (14-21)	72,9 ^(a)	66,4 ^(a) (42-91)	80,0 ^(a,b) (70-89)	66,3 ^(a)	2,7 ^(a) (1,0-4,0)	3,3 ^(b) (2,1-4,9)	61,6 ^(a)
	PIII (<i>n</i> =12)	0,8 ^(b) (0,2-1,5)	0,8 ^(a,b) (0,3-1,4)	73,7 ^(b)	17,8 ^(a) (11-31)	20,4 ^(a) (15-37)	79,2 ^(a,b)	78,0 ^(a) (62-97)	85,9 ^(b) (71-97)	76,0 ^(b)	2,5 ^(a) (1,9-3,2)	1,9 ^(a) (0,7-3,1)	87,3 ^(b)
	PIV (<i>n</i> =12)	ND	0,6 ^(a) (0,1-1,2)	ND	17,5 ^(a) (12-27)	22,6 ^(a) (12-32)	91,7 ^(c)	75,6 ^(a) (68-85)	64,8 ^(a) (35-98)	95,4 ^(d)	2,2 ^(a) (0,5-4,5)	2,0 ^(a) (0,9-3,3)	93,2 ^(c)
	Média	0,6	0,9	66,4	16,6	20,4	83,7	72,1	75,6	82,7	2,2	2,3	84,0

* A remoção foi calculada em função de CFU/(dia.HabEquiv) como descrito em Novo & Manaia, 2010.

2. Análise dos perfis de 16S- DGGE

Os perfis de DGGE foram obtidos a partir de extratos contendo em média $2,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ de DNA para amostras de afluente e $51,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ de DNA do efluente tratado. O volume de efluente final da ETAR filtrado para cada uma das membranas foi, seis vezes superior ao volume de afluente. Após a amplificação (338F-GC/518R do rDNA 16S) obtiveram-se produtos de PCR das amostras de afluente e efluente com concentrações médias de $53,0$ e $52,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de DNA, respetivamente.

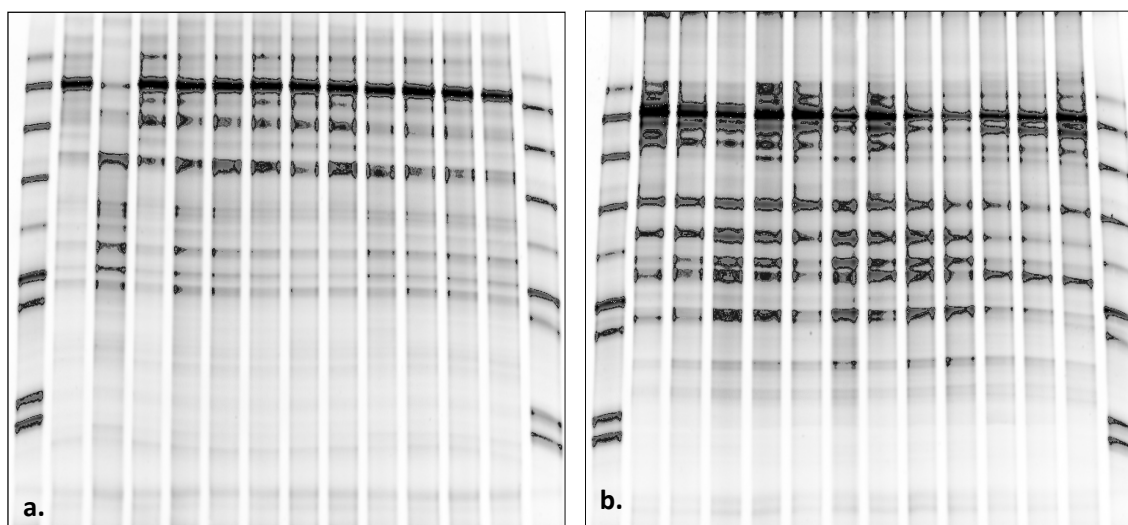


Figura 4. Gel de DGGE (30-52% de Ureia/Acrilamida) com as amostras de 16S rRNA das comunidades presentes nas amostras de afluente (a.) e efluente (b.) durante o **período I**. Da esquerda para a direita: Marcador; 25.11.08 (a, b, c); 26.11.08 (a, b, c); 27.11.08 (a, b, c); 28.11.08 (a, b, c); Marcador.

Para a electroforese aplicou-se sempre $1,8 \mu\text{g}$ de DNA e o seu perfil de desnaturação foi registado e analisado. Todas as amostras foram processadas (desde a extração à análise) em triplicado. Foram corridas em poços lado a lado, em oito géis de DGGE. Cada um dos géis continha as amostras de um período e de uma das duas amostras (figuras 4 a 7).

Na análise dos géis de DGGE obtidos verificou-se elevada reprodutibilidade de processamento, indicada pela homogeneidade dos triplicados e de géis de DGGE. Nos triplicados apenas se verificaram pequenas variações na intensidade de algumas bandas mas eram iguais em termos de posição.

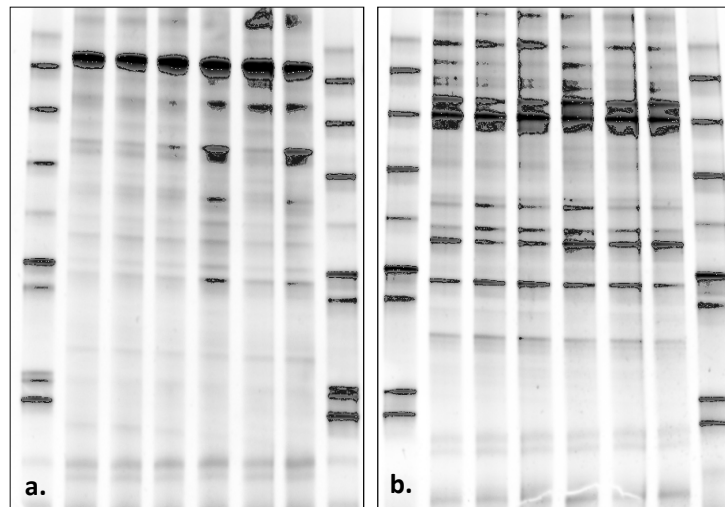


Figura 5. Géis de DGGE (30-52% de Ureia/Acrilamida) com as amostras de 16S rDNA das comunidades presentes nas amostras de afluente (á esquerda) e efluente (á direita) durante o **período II**. Da esquerda para a direita: Marcador; 04.12.08 (a, b, c); 05.12.08 (a, b, c); Marcador.

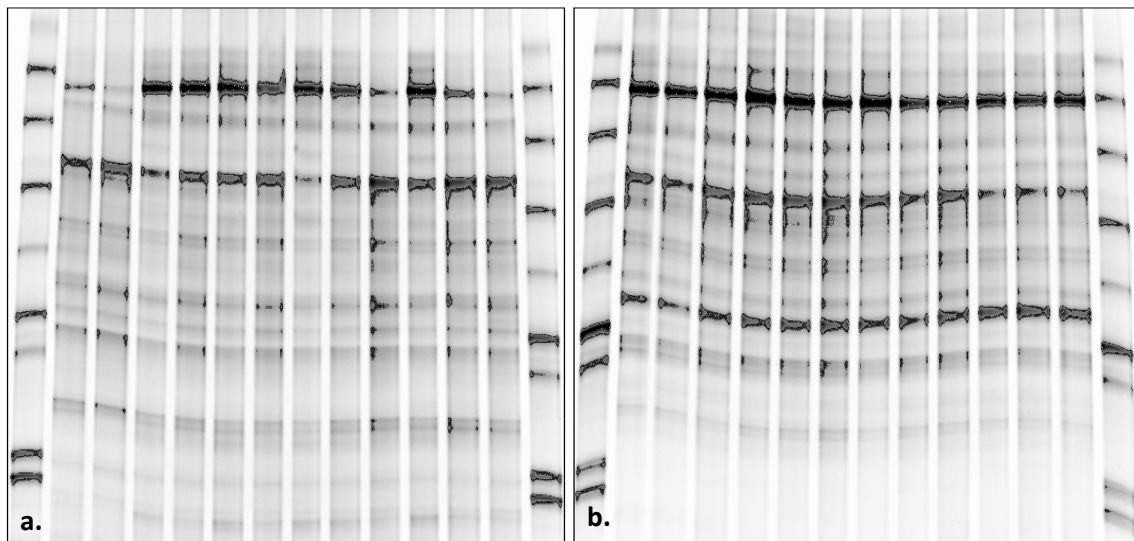


Figura 6. Géis de DGGE (30-52% de Ureia/Acrilamida) com as amostras de 16S rDNA das comunidades presentes nas amostras de afluente (á esquerda) e efluente (á direita) durante o **período III**. Da esquerda para a direita: Marcador; 31.03.09 (a, b, c); 01.04.09 (a, b, c); 02.04.09 (a, b, c); 03.04.09 (a, b, c); Marcador.

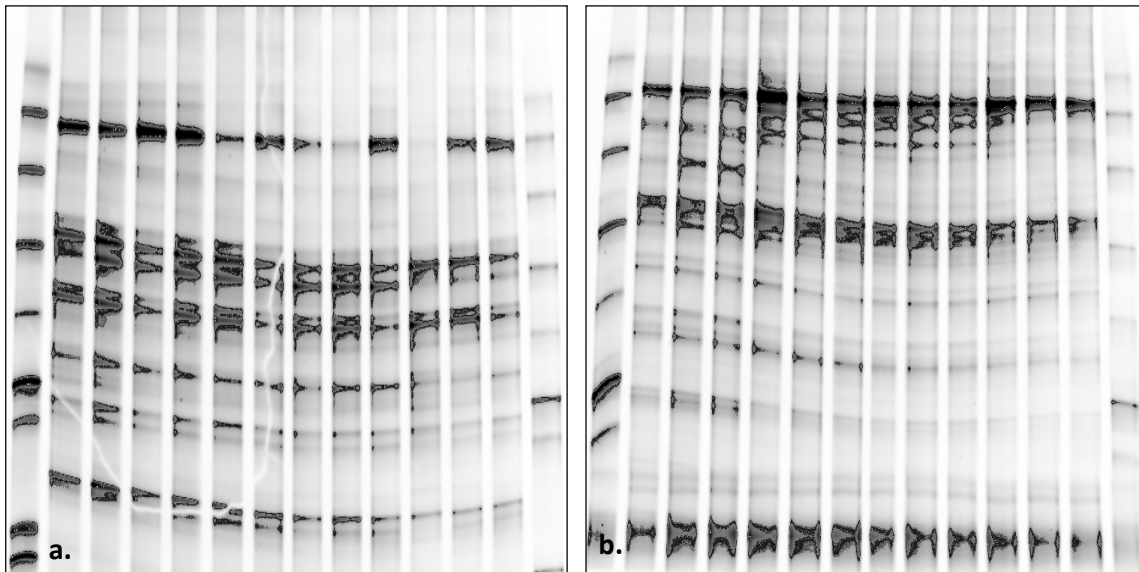


Figura 7. Géis de DGGE (30-52% de Ureia/Acrilamida) com as amostras de 16S rRNA das comunidades presentes nas amostras de afluente (à esquerda) e efluente (à direita) durante o **período IV**. Da esquerda para a direita: Marcador; 21.04.09 (a, b, c); 22.04.09 (a, b, c); 23.04.09 (a, b, c); 24.04.09 (a, b, c); Marcador.

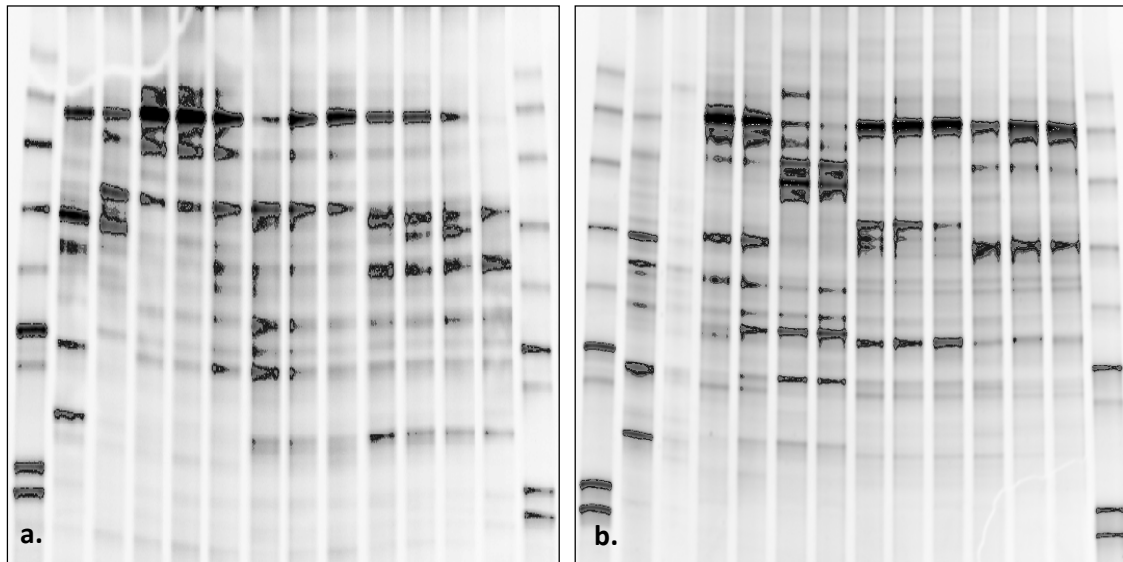


Figura 8. Perfis de 16S-DGGE das comunidades presentes em amostras de vários períodos; **a.** amostras de **afluente** (da esquerda para a direita: Marcador; 11.03.09*; 13.05.09*; 25.11.08a); 04.12.08a); 05.12.08a); 31.03.09a); 01.04.09a); 03.04.09a); 21.04.09a); 22.04.09a); 23.04.09a); 24.04.09a); Marcador; **b.** amostras de **efluente** (da esquerda para a direita: Marcador; 11.03.09*; 13.05.09*; 25.11.08a); 27.11.08a); 04.12.08a); 05.12.08a); 31.03.09a); 02.04.09a); 03.04.09a); 21.04.09a); 22.04.09a); 24.04.09a); Marcador). *amostras de DNA referentes à mesmas amostras cedidas de outro estudo, aplicadas aqui para verificação da extração e amplificação do DNA.

As maiores vantagens do método de amplificação do gene do 16S do rRNA seguido de DGGE para análise da dinâmica de populações são a sua reprodutibilidade e capacidade de

comparar várias amostras simultaneamente, no mesmo gel (Fromin *et al.*, 2002). Neste tipo de análise parte-se do princípio que as variações entre intensidade das bandas no DGGE refletem a abundância relativa das diferentes espécies nas comunidades bacterianas.

Para a comparação dos perfis considerou-se a zona do gel situada entre o equivalente a 32,5 e 44,5% do gradiente em ureia/acrilamida (figura 9). Nos perfis das amostras de afluente detetou-se um total de 22 bandas e nos de amostras de efluente registaram-se 31 bandas. Algumas destas bandas não foram incluídas na análise multivariada por serem pouco intensas nas amostras em que apareciam (Af 9, Af 28, Ef 21, Ef 27, Ef 158,57, Ef 28 e Ef 31). Assim, contabilizam-se, para posterior análise comparativa, 19 bandas de afluente e 17 de efluente.

A partir do momento em que se analisaram as amostras de afluente e efluente no mesmo gel (figuras 8 e 9) e após o processo de comparação visual de bandas, adotou-se uma notação de bandas uniforme para ambos os tipos de água (figura 9).

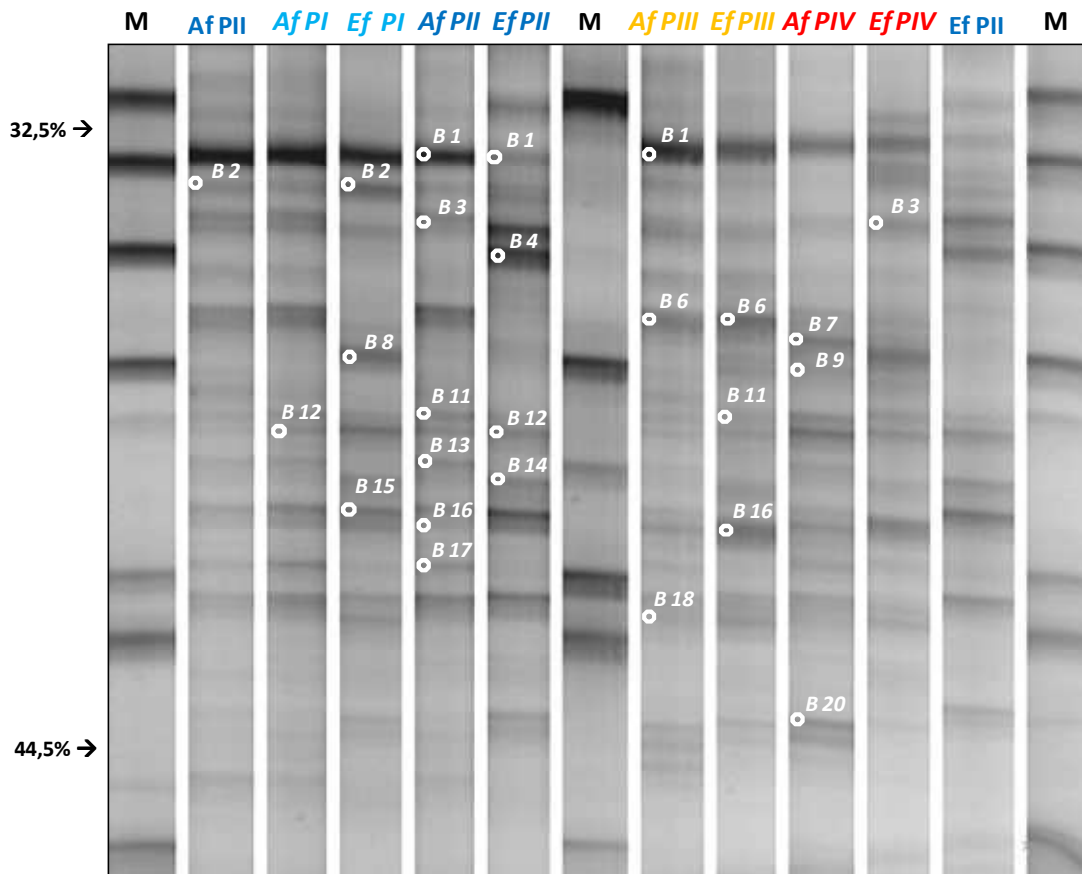


Figura 9. Gel de gene do rDNA 16S PCR-DGGE com as amostras das comunidades presentes, em diferentes datas de amostragem, no afluente ao tanque biológico e efluente final da ETAR. (Da esquerda para a direita: Marcador (Fig. A1); Af 04.12.08a); Af 26.22.08a); Ef 27.11.08a); Af 05.12.08a); Ef 04.12.08a); Marcador; Af 02.04.09a); Ef 02.04.09a); Af 21.04.09a); Ef 22.04.09a); Ef 05.12.08a); Marcador). As bandas assinaladas no gel foram excisadas dos perfis indicados e identificadas.

Algumas bandas foram designadas de residentes, por estarem sempre presentes nas duas amostras e em todos os períodos (B1, B3 e B12). Da mesma forma encontram-se bandas

residentes nas amostras de afluente (B6, B11, B16, B17 e B18) e outras sempre presentes no efluente (B8, B14 e B20). Verificou-se também que certas bandas apareceram exclusivamente numa das amostras, B7 e B13 são características do afluente e B4, B8 e B14 só apareceram nas amostras de água tratada.

Verificou-se ainda que certas bandas não apareceram em alguns períodos, e por isso foram classificadas como diferenciadoras. Observou-se que, no afluente, a banda B7 não aparece em PI e B9 está ausente em PI e PII, ambas aparecem intensas durante PIV. Nas águas tratadas as bandas B4, B6 e B16 não surgiram em nenhuma das amostras de PI, aliás, B16 está ausente durante PI e PII. A banda B15 está ausente de PIII e PIV e B19 não aparece em nenhuma amostra deste último período.

Algumas das bandas, se bem que residentes, apareceram de uma forma claramente mais predominante em certos períodos, daí serem consideradas como diferenciadoras pela intensidade. Assim, a forte intensidade de B8 e B12 em PI e de B4, B15 e B17 durante PII (Figuras 4, 5, 8 e 9) também contribuiu para a diferenciação das amostras ao longo do tempo.

2.1. Distribuição das amostras ao longo do tempo e contribuição relativa de cada uma das espécies

A análise de componentes principais é um dos métodos de ordenação mais usado em ecologia (Valentin, 1995). Com base nas tabelas posição *versus* intensidade de banda, efetuou-se PCA aos perfis de amostras de afluente e de efluente, com o intuito de avaliar a distribuição temporal do perfil de espécies/bandas. De acordo com as análises de PCA, há uma separação significativa dos perfis para os diferentes períodos de amostragem ao longo dos dois primeiros eixos fatoriais ($p=0,002$).

No caso das amostras de afluente os eixos fatoriais explicam, cumulativamente, 83% da variação encontrada nas amostras. As bandas responsáveis pela variação observada foram indicadas pelo valor próprio do respetivo vetor ao longo de cada um dos eixos (tabela 6). Segundo a distribuição obtida, as amostras do período IV, final de Abril, separam-se nitidamente das restantes (figura 10a.), sobretudo devido à presença das bandas B7, B9, B11, B12, B13, B20, com forte relação com o eixo 1. Por outro lado, os perfis de PI e PII eram indistinguíveis entre si, embora contrastassem com os de PIII, sobretudo devido à maior intensidade de B1.

Nas amostras de efluente a distribuição observada seguiu padrões diferentes, ou seja, agruparam-se de forma diferente da verificada no afluente. Neste caso, os dois primeiros eixos canónicos juntos explicaram 79% da variação observada, formando-se quatro grupos correspondentes aos diferentes períodos de amostragem (figura 10b), sugerindo o fator sazonal como importante na estrutura destas amostras.

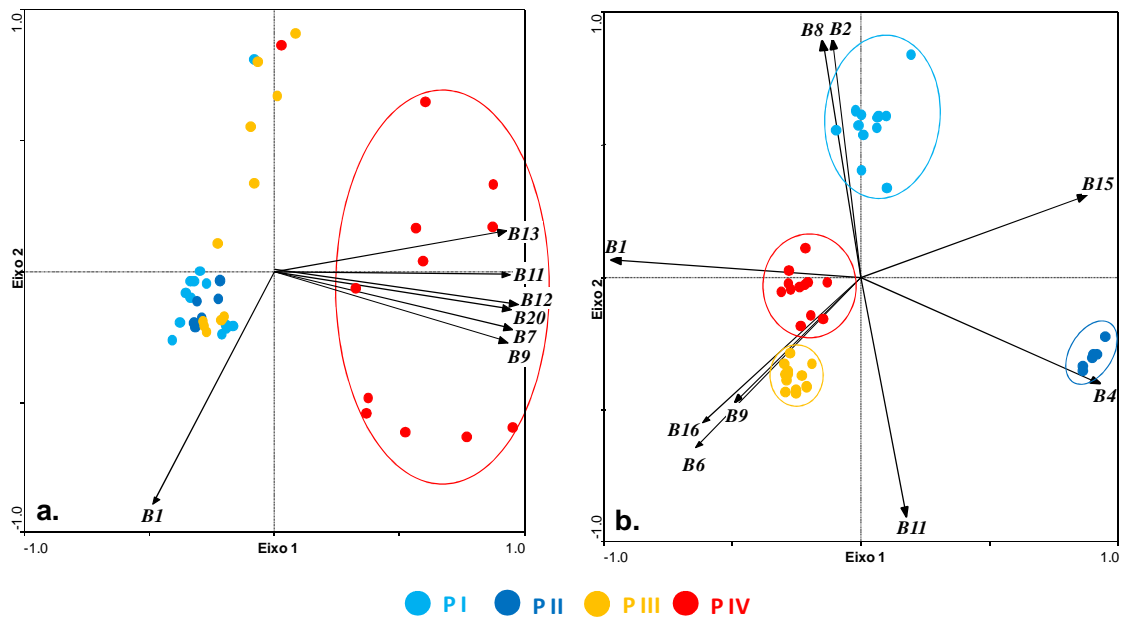


Figura 10. Gráfico da distribuição das amostras de **afluente (a.)** e **efluente (b.)**, segundo cada um dos seus perfis de bandas de 16S (338F-GC/518R) e a influência das principais espécies nestas distribuições após uma análise de componentes principais (PCA, Canoco para Windows 4.5).

A distribuição das amostras de efluente varia então, ao longo do tempo, PI caracteriza-se pela ausência de B4 e B11 e forte intensidade de B2, B8 e B12, PII pela fraca intensidade de B1 e predominância de B4, B15 e B17 e durante PIII e PIV, períodos mais quentes, verifica-se forte presença de B6, B9, B16 e B20.

As bandas B1, B9 e B11 foram as únicas que sendo relevantes para explicar a variação observada no afluente, tiveram papel idêntico no efluente. E, bandas que não eram particularmente influentes nas variações detetadas nas amostras de afluente, encontram-se fortemente relacionadas com a variação observada no efluente (figura 10).

2.2. Índices de Diversidade

Os índices de diversidade foram calculados com base em todas as bandas encontradas nos diferentes géis, ou seja nas 22 bandas detetadas nas amostras de afluente e 31 de efluente (tabela 5). A diversidade foi avaliada em termos de riqueza, número de bandas/espécies diferentes presentes em cada amostra. Esta é a medida mais comumente utilizada no cálculo da diversidade, por ser simples e intuitiva. O principal problema reside no facto de este parâmetro não fornecer informação sobre a forma como cada uma das espécies está representada na comunidade. Idealmente, a diversidade deverá medir tanto o número de diferentes espécies como a contribuição relativa de cada uma dessas espécies na comunidade (uniformidade). Os valores médios de diversidade em ambientes naturais variam entre 1,5, para sistemas com baixa riqueza e uniformidade até 3,5 em sistemas de elevada riqueza e elevada uniformidade (McDonald, 2003).

Tabela 5. Resumo dos Índices de Diversidade (H'), de Equidade ou Uniformidade (E) e de riqueza média dos perfis (S), para cada uma das amostras (média dos quatro períodos \pm desvio padrão).

	Afluente	Efluente
Número total de bandas	22	31
Diversidade (H', Índice de Shannon)	2,29 \pm 0,20	2,42 \pm 0,18
Equidade (E, Índice de Pielou)	0,36 \pm 0,03	0,36 \pm 0,02
Riqueza do perfil (S)	15,17 \pm 1,4 (11-18)	17,29 \pm 2,4 (13-22)

Neste estudo, a estrutura de uma comunidade, relaciona-se apenas com a presença e abundância relativa de cada uma das espécies da comunidade a cada momento. Observou-se que a riqueza das amostras não sofre grande variação ao longo do tempo. Ainda assim, as maiores taxas de riqueza e de diversidade acontecem para ambas as amostras durante o PIV, o que está de acordo com a literatura disponível. Moura *et al.* (2007), que estudaram águas residuais tratadas em lagoas, referem que a maior riqueza em termos de quantidades de espécies diferentes, é encontrada nos meses mais quentes.

A análise dos géis recorrendo ao índice de equidade, que varia entre 0 e 1, evidencia a baixa uniformidade destas amostras, em termos de abundância relativa, das espécies presentes ($E=0,36$, em ambas). De facto, em ambos os casos há espécies que predominam claramente em relação a outras. Por exemplo a banda B1 apresenta uma intensidade muito superior às restantes bandas, em quase todos os perfis, exceto nas amostras de água tratada durante o período II (figuras 4 a 9). Os valores de equidade, entre 0,28 - 0,42 e 0,32 - 0,41, no afluente e no efluente, respetivamente, foram similares, sugerindo um perfil idêntico de distribuição de espécies.

3. Identificação das bandas dos perfis de DGGE

3.1. Seleção das Bandas a Identificar

De acordo com a análise visual dos géis de DGGE e através da análise de componentes principais (PCA) efetuada com base na intensidade de cada banda, foram selecionadas vinte bandas para análise da sequência nucleotídica. Como principal critério de seleção, usaram-se os valores próprios dos vetores representativos de cada banda, ao longo dos primeiros dois eixos fatoriais.

Foram considerados para análise, as bandas cujos valores próprios eram superiores a 0,60, em valor absoluto, no primeiro e/ou segundo eixos, estatisticamente significativos ($p \leq 0,002$). Apesar de não possuir valores elevadas, a banda B3, foi também considerada por ser residente em ambas as amostras.

Após esta seleção, analisaram-se dois géis (figuras 8 e 9), em que se compararam amostras de afluente e efluente dos vários períodos. Este tipo de comparação facilita a observação de variações dos perfis em cada tipo de amostra ao longo do tempo, e realça as diferenças dos perfis antes e depois do tratamento.

Tabela 6. Valores próprios, obtidos para cada um dos vetores, que representam as bandas, em cada um dos eixos fatoriais, após a PCA efetuada aos perfis de DGGE, de cada uma das amostras, separadamente.

Banda DGGE	Afluente	Eixo 1	Eixo 2	Efluente	Eixo1	Eixo 2
B 1	Af 1	-0,412	-0,289	Ef 1	0,789	0,473
B 2				Ef 3	-0,217	0,817
B 3	Af 3	0,578	0,574	Ef 4	-0,581	-0,448
B 4				Ef 6	-0,610	-0,755
B 6	Af 6	-0,261	0,778	Ef 10	0,832	-0,249
B 7	Af 7	0,917	-0,205			
B 8				Ef 12	-0,2748	0,8811
B 9	Af 8	0,912	-0,083	Ef 13	0,6542	-0,2706
B 11	Af 10	0,916	-0,035	Ef 15	0,1955	-0,8766
B 12	Af 11	0,9455	-0,1499	Ef 16	-0,7616	0,4810
B 13	Af 12	0,9186	0,0645			
B 15	Af 14	-0,1315	0,7185	Ef 19	-0,8196	-0,1660
B 16	Af 15	0,8197	0,2280	Ef 20	0,6987	-0,1452
B 20	Af 22	0,9375	0,1408	Ef 29	-0,8547	-0,1970

Devido ao facto destes valores não constarem dos resultados disponibilizados pelo programa Canoco, apresentam-se aqui os valores próprios gerados por igual análise, realizada em PC_ORD, versão 5.32 (<http://home.centurytel.net/~mjm/pc5fixes.htm>).

Com o intuito de validar a correspondência de bandas entre amostras de afluente e efluente, que havia sido considerada previamente, algumas bandas (B1, B2, B3, B6, B11, B12 e B16) foram analisadas de perfis de diferentes períodos e/ou de tipo de amostra (figura 8 e 9) de modo a validar a identidade das sequências obtidas. Após transformação, de cada uma das bandas excisadas foram selecionados entre 3 e 5 clones, cujo DNA obteve o mesmo perfil eletroforético da banda em questão, para posterior sequenciação. A afiliação de cada banda foi considerada quando se obtiveram pelo menos dois clones cuja sequência levou à mesma afiliação (mesmo número de acesso NCBI).

Optou-se por mostrar os resultados das afiliações obtidas para bandas B3, B13, B14 e B18, (tabela 7) para as quais apenas se obtiveram bons resultados para um clone de cada, por as percentagens de homologia obtidas serem superiores ou iguais a 99% ao nível do género. Assim, e considerando também estas quatro bandas, foi possível determinar a afiliação de dezassete bandas (tabela 7).

Verificou-se algumas das bandas, como a, B1, B2, B6 e B11 consideradas como a mesma em amostras de água diferentes eram realmente afiliadas ao mesmo género ou espécie, o que confirma e fortalece a análise visual de correspondência de bandas entre amostras e entre géis.

Considerando o fragmento de DNA utilizado, com cerca de 200 nucleótidos, esperava-se poder estabelecer a afiliação das bandas ao nível de filo, classe ou muito raramente família ou género. Nas referências da base de dados, pode ver-se que grande parte das sequências analisadas está relacionada com amostras de águas residuais (B2, B9, B11, B20) e de lamas ativadas (B6, B18). Algumas estão relacionadas com organismos da microflora humana da pele (B3 e B7) ou do intestino (B12, B17), resultados não surpreendentes atendendo à origem das amostras estudadas.

Além disso verificou-se que grande parte das sequências eram altamente similares (homologia $\geq 99\%$) com organismos não cultiváveis ou com estado taxonómico incerto (tabela 7). Estes resultados evidenciam a falta de conhecimento acerca das comunidades presentes nestes ambientes e são consistentes com alguns estudos de caracterização molecular de comunidades microbianas em ecossistemas de tratamento de águas residuais. Estes têm revelado que, em reatores de lamas ativadas convencionais, a maioria das bactérias responsáveis pelos processos chave do tratamento são ainda desconhecidas ou pelo menos nunca isoladas *in vitro* (Wagner & Loy, 2002).

Tabela 7. Resumo da afiliação das bandas de DGGE obtida a partir das respectivas seqüências de rDNA de 16S e a correspondência mais próxima do GenBank.

Banda	Número de acesso BLAST¹ NCBI	Identificação¹	Número de acesso BLAST² NCBI	Identificação²	Classe²
B 1 Af 1= Ef 1	JF497853.1 (99%)	<i>Uncultured bacterium</i> clone SL-181 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	JF915357.1 (99%)	<i>Arcobacter cryaerophilus</i> strain NW94 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	<i>ε-Proteobacteria</i>
B 2 Af 2 = Ef 3	HQ440072.1 (100%)	<i>Uncultured bacterium</i> clone BF1-28 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	HQ115597.1 (100%)	<i>Arcobacter defluvii</i> strain SW28-7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	<i>ε-Proteobacteria</i>
B 3 Ef 4	JF218193.1 (100%)	<i>Uncultured bacterium</i> clone ncd2541e10c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	JN228272.1 (99%)	<i>Acinetobacter sp.</i> AB1(2011) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	<i>γ-Proteobacteria</i>
B 4 Ef 6	DQ469231.1 (99%)	<i>Uncultured bacterium</i> clone SX3-31 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	AB362308.1 (94%)	<i>γ-Proteobacterium</i> JAM-GA1201 gene for 16S rRNA, partial sequence.	<i>γ-Proteobacteria</i>
B 6 Af 6=Ef 10	CU918702.1 (99%)	<i>Uncultured Fusobacteria bacterium</i> 16S rRNA gene from clone QEEA3DG11.	AB330760.1 (98%)	<i>Streptobacillus moniliformis</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: KWG24.	<i>Fusobacteriia</i>
B 7 Af 7	FJ365454.1 (98%)	<i>Uncultured bacterium</i> clone TS20_a03b01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	EU869280.1 (98%)	<i>Comamonas sp.</i> BF1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	<i>β-Proteobacteria</i>
B 8 Ef 12	HQ190490.1 (99%)	<i>Uncultured bacterium</i> clone BP1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	CP002205.1 (98%)	<i>Sulfurimonas autotrophica</i> DSM 16294, complete genome.	<i>ε-Proteobacteria</i>
B 9 Af 8	HQ327062.1 (100%)	<i>Uncultured bacterium</i> clone MedPSep07RW42 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	AB623230.1 (92%)	<i>Bacteroidetes bacterium</i> 4F6B gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence.	<i>Bacteroidia</i>
B 11 Af 10=Ef 15	JF697520.1 (100%)	<i>Uncultured bacterium</i> clone reservoir-139 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	FN821843.1 (100%)	<i>Acidovorax sp.</i> M5-31 partial 16S rRNA gene, strain M5-31.	<i>β-Proteobacteria</i>
B 12 Af 11	GU939568.1 (100%)	<i>Uncultured Lachnospiraceae bacterium</i> clone R_301.58-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	EU728741.1 (100%)	<i>Clostridiaceae bacterium</i> DJF_LS13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	<i>Clostridia</i>

B 13 Af 12	JN377675.1 (100%)	<i>Rheinheimera soli</i> strain B29 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	JN377675.1 (100%)	<i>Rheinheimera soli</i> strain B29 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	<i>γ-Proteobacteria</i>
B 14 Ef 18	JN191825.1 (100%)	<i>Uncultured bacterium</i> clone RBMU-B4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	AY780904.1 (100%)	<i>Simplicispira metamorpha</i> strain D-416 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	<i>β-Proteobacteria</i>
B 15 Ef 19	JF700250.1 (99%)	<i>Leadbetterella sp.</i> HME7103 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	JF700250.1 (99%)	<i>Leadbetterella sp.</i> HME7103 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	<i>Bacteroidia</i>
B 16 Af 15	JF497796.1 (100%)	<i>Uncultured bacterium</i> clone SL-53 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	EF585284.1 (100%)	<i>Comamonas sp.</i> N8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	<i>β-Proteobacteria</i>
B 17 Af 16	HQ536018.1 (100%)	<i>Uncultured bacterium</i> clone BBNGA4317 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	X72866.1 (100%)	<i>Phascolarctobacterium faecium</i> (ACM3681) gene for 16S rRNA.	<i>Negativicutes</i>
B 18 Af 18	CU923002.1 (100%)	<i>Uncultured unclassified bacterium</i> 16S rRNA gene from clone QEDQ3DC02.	AB277850.1 (100%)	<i>Comamonas sp.</i> PG6-4 gene for 16S rRNA, partial sequence.	<i>β-Proteobacteria</i>
B 20 Af 22	GQ406151.1 (99%)	<i>Uncultured β-Proteobacterium</i> clone AM-20-17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	HQ167731.1 (97%)	<i>Curvibacter sp.</i> HME6821 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	<i>β-Proteobacteria</i>

Identificação e números de acesso do organismo com maior similaridade para com a sequência de ≈170bp amplificada a partir da banda de DGGE, após análise BLAST efetuada na base de dados do NCBI (*National Centre of Biotechnology Information website*: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

BLAST¹ : Análise efetuada a toda a coleção de sequências nucleotídicas.

BLAST² : Análise efetuada a toda a coleção de sequências nucleotídicas, excluindo os organismos não cultiváveis (acessos efetuados entre outubro de 2010 e dezembro 2012).

Aquando da análise da estrutura das comunidades ao longo do tempo (figura 10) verificou-se que as bandas afiliadas com a família *Comamonadaceae* (B7, B11, B16 e B20) aparecem em maior abundância durante o período de final de Abril, o que estará relacionado com as temperaturas ótimas de crescimento destes organismos, entre os 28 e 30°C (Willems *et al.*, 1991). Este grupo inclui organismos Gram-negativos, aeróbios, comuns em amostras de solos, águas naturais e industriais mas também isolados clínicos e fitopatogénicos. Em geral estes organismos degradam uma vasta variedade de ácidos orgânicos incluindo aminoácidos e muitos deles oxidam H₂ e CO o que ilustra o seu papel neste tipo de ambiente.

3.2. Composição das comunidades

No total dos dois tipos de água, a maioria das bandas analisadas possuíam sequências nucleotídicas afiliadas a membros do filo *Proteobacteria*. A classe β -*Proteobacteria* foi a mais prevalente representando 35 % das bandas, seguida pelas classes ϵ -*Proteobacteria* e γ -*Proteobacteria* (18 %) e *Bacteroidia* (12%). Na figura 11, representa-se esta distribuição dos grupos encontrados por classes e por tipo de amostra. Estes resultados vão de encontro ao esperado pois esta distribuição é similar á encontrada noutros estudos de ETAR municipal por lamas ativadas. Cerca de 4% das sequências de membros desta classe eram relacionadas com o género *Arcobacter*, quer em e água residual bruta como após o tratamento.

A análise da diversidade bacteriana, com base na análise do gene para o rRNA 16S, contribui para entendimento de comunidades bacterianas complexas, por permitir a identificação das populações que as constituem, proporcionando um quadro mais completo da composição da comunidade (Amann *et al.*, 1995).

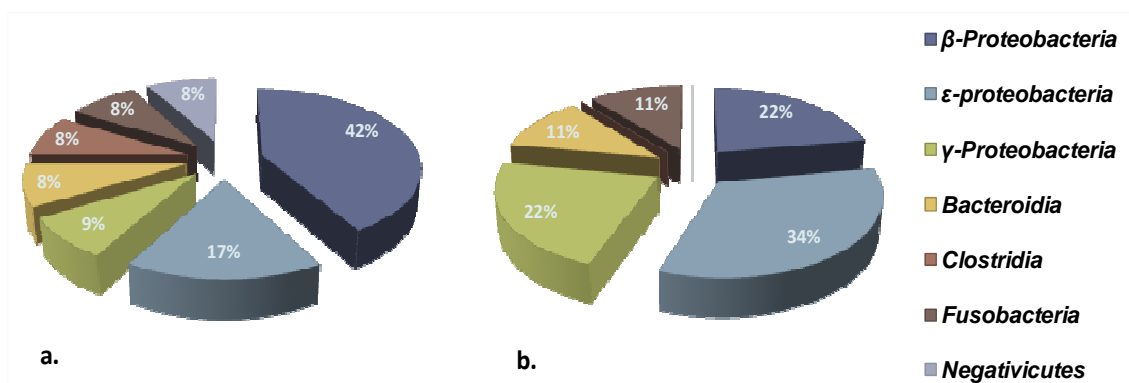


Figura 11. Agrupamento das bandas identificadas, pela classe a que pertencem, nas amostras estudadas. **a.** afluyente; **b.** efluente

Membros das classes β -*Proteobacteria* e *Bacteroidia* foram anteriormente reportadas em esgotos municipais (Wagner *et al.*, 2002; Moura *et al.*, 2007; Su *et al.*, 2011) e relacionados com a produção animal (Arroyo *et al.*, 2010). Quando se analisaram os dados por amostra, verificou-se que no efluente, não foi identificada nenhuma espécie incluída nas classes *Clostridia* ou *Negativicutes*. Para além disso, a percentagem em termos de sequências distintas relacionadas com ϵ -*Proteobacteria* aumentou de 17 para 33 %, com o tratamento. Nas amostras de efluente esta classe estava representada por sequências relacionadas com *Sulfurimonas autotrophica* além de outras relacionadas com *Arcobacter* também encontradas no afluyente.

4. Relações entre a diversidade bacteriana e fatores ambientais

Para melhor estudar as comunidades bacterianas e formular hipóteses sobre os fatores que podem influenciar a sua estrutura, é possível analisar a influência de potenciais fatores de perturbação. Assim, com o objetivo de determinar possíveis relações entre a estrutura das comunidades e fatores ambientais (bióticos e abióticos), monitorizados durante o tratamento de águas residuais recorreu-se uma análise de correspondência canónica. A análise de correspondência canónica tem como objetivo principal explicar a relação entre dois conjuntos de variáveis, procurando combinações lineares para cada um dos conjuntos de variáveis, de modo a maximizar as possíveis correlações entre os grupos. As análises pretenderam verificar as variações dentro da mesma amostra, isto é, foram sempre comparados dados de espécies presentes no afluente com fatores ambientais referentes ao afluente e procedeu-se de igual forma para os dados referentes ao efluente de água tratada, nunca cruzando dados entre amostras.

4.1. Influência das condições meteorológicas

Na análise canónica efetuada comparando os dados de prevalência das diferentes espécies na água residual antes e depois do tratamento com as condições meteorológicas observadas nos respetivos dias de amostragem, verifica-se que, as populações de uma e de outra amostra se distribuem de forma diferente. As amostras de afluente distribuem-se ao longo do eixo 1, único eixo com significado estatístico nesta análise, de acordo com o vetor da temperatura máxima do ar que explica 100% da variância das espécies. Verifica-se a diferenciação clara dos períodos ao longo do tempo de amostragem. PI e PII (meses de frio), com a presença de B5 e B24, ambas não identificadas, e PIV (período mais quente) onde B9 (*Bacteroides bacterium*), B19 (não identificada) e B20 (*Curvibacter* sp.) estão fortemente presentes; B9 e B20 aparecem desde PIII mas tornam-se mais intensas em PIV; B19 apesar de não ser muito intensa só aparece no PIV (figura 12a).

Na distribuição do efluente para além do primeiro eixo também o segundo possui relevância estatística para a análise, a soma dos dois primeiros eixos canónicos explica 51% da variação das espécies e a temperatura máxima do ar (eixo 1) juntamente com a humidade relativa do ar (eixo 2), explicam 90% desta variação. Assim as amostras separam-se em dois grandes grupos ao longo do eixo 1, PI+PII mais à esquerda, períodos menos quentes e PIII+PIV, períodos mais quentes, localizam-se mais à direita (figura 12b).

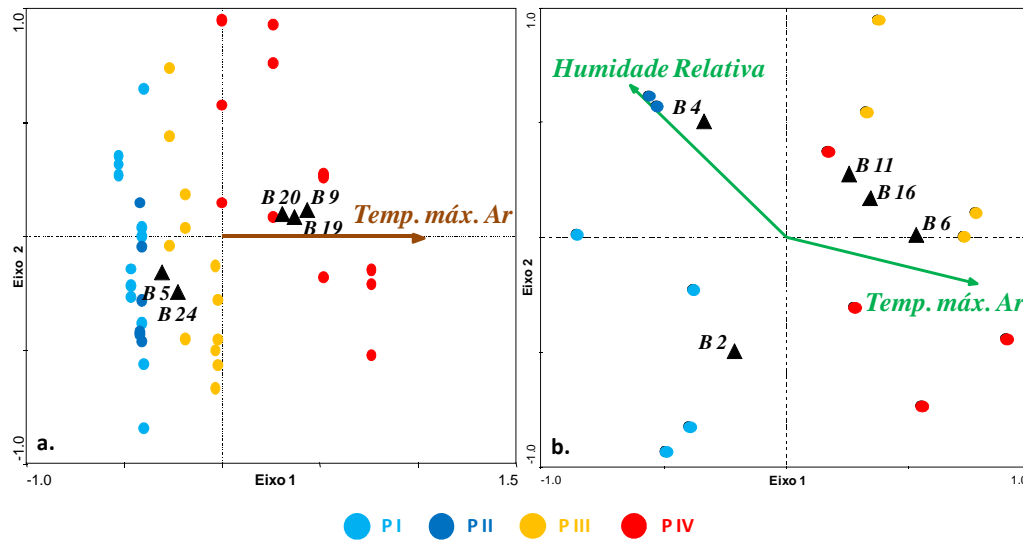


Figura 12. Gráfico da distribuição das Espécies em função das Condições Meteorológicas ($n_{\text{amostras}}=42$; $n_{\text{meteorológicos}}=5$); **a. Afluente** ($n_{\text{espécies}}=19$); **b. Efluente** ($n_{\text{espécies}}=17$).

Para esta separação contribuem maioritariamente as bandas B6 (*Streptobacillus moniliformis*), B16 (*Comamonas* sp.) que são prevalentes durante os períodos III e IV e ausentes nos períodos mais frios. *Streptobacillus moniliformis* está caracterizado como agente etiológico da febre da picada de rato e a sua temperatura ótima de crescimento ronda os 37 °C. Trata-se de um organismo fastidioso que até 2009, nunca havia sido isolado de amostras ambientais. As bactérias do género *Comamonas* são ubíquas que crescem numa vasta gama de temperaturas (15-35 °C) havendo espécies, *C. aquatica*, cuja temperatura ótima de crescimento ronda os 40°C (Wauters *et al.*, 2003).

As amostras separam-se também ao longo do eixo 2, verifica-se que a humidade relativa está relacionada com esta separação sendo máxima durante o PII. Para esta separação contribui a abundância de B4 (*γ-Proteobacteria*) em PII quando choveu mais, e a ausência de B2 (*Arcobacter defluvii*) que aparece com bastante intensidade em PI e PIV, períodos menos húmidos.

4.2. Influência dos parâmetros operacionais da ETAR

Após se efetuar a CCA das bandas em função destes parâmetros verificou-se que no caso do afluente apenas o primeiro eixo é significativo para esta análise, e só explica 12% da variação das amostras, enquanto no efluente são necessários os dois primeiros eixos para explicar 38% da distribuição apresentada.

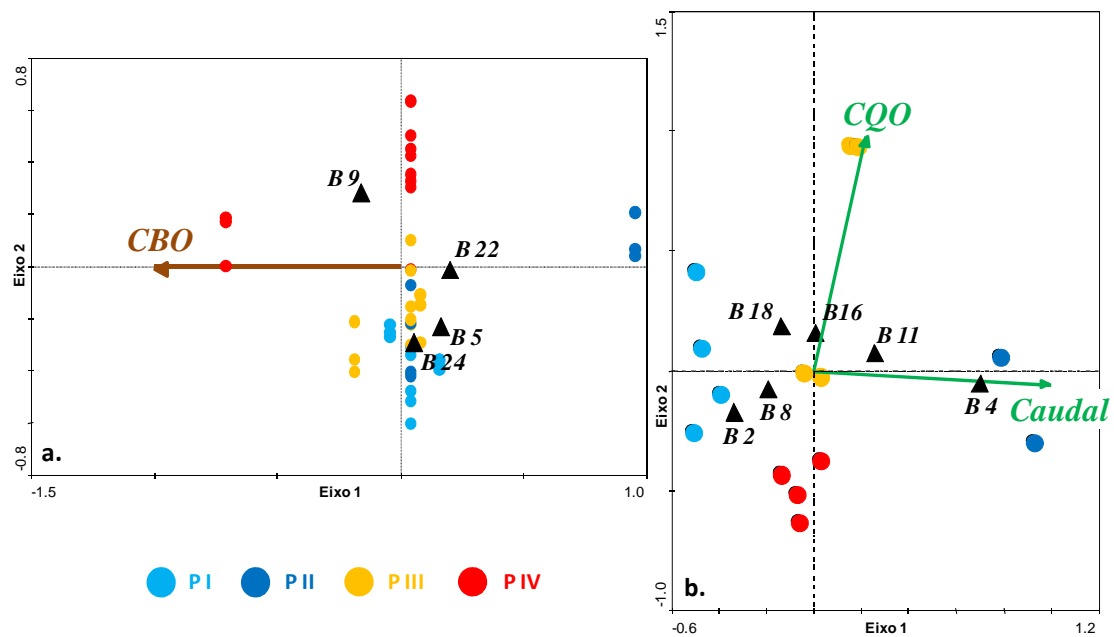


Figura 13. Gráfico da distribuição das Espécies em função das Condições Operacionais da ETAR ($n_{amostras}=42$; $n_{condições\ operacionais}=3$); **a. Afluente** ($n_{espécies}=19$); **b. Efluente** ($n_{espécies}=17$).

No afluente a CBO, única variável ambiental com significado estatístico, atinge o valor máximo num dos dias de PIV (22.04.09). A separação das amostras está relacionada com as bandas B9 (*Bacteroides bacterium*), ausente em PI e PII e muito intensa em PIV, e no sentido oposto as bandas B5 e B24, ambas não identificadas e ausentes em PIV. Estes resultados sugerem que a predominância de certos grupos filogenéticos depende do tipo matéria orgânica dissolvida, ou seja, as variações temporais no consumo de matéria orgânica pode ser explicada pelas presença/ausência de determinadas famílias ou géneros bacterianos (Cottrell & Kirchman, 2000). As bactérias pertencentes à classe *Bacteroidetes* são consideradas especialistas na degradação de matéria orgânica de elevado peso molecular como proteínas e hidratos de carbono (Thomas et al, 2011)

No efluente tanto o caudal como o valor de CQO influenciam a distribuição das amostras, sendo que o primeiro é máximo durante PII e o segundo é mínimo em PIV. As bandas mais fortemente relacionadas com esta distribuição são B2 (*Arcobacter defluvii*) e B8 (*Sulfurimonas autotrophica*) mais intensas em PI e B11 (*Acidovorax* sp.) que não está presente em nenhuma amostra de PI, foi neste período que se verificou o menor caudal e a remoção de CQO após o tratamento foi relativamente baixa. Preponderante para a separação de PII foi a forte presença de B4 (*γ-Proteobacteria*) fortemente associada a dias de elevado caudal, humidade relativa e CQO. Foi também durante este período que se observou a menor remoção de CBO (tabela 2).

4.3. Relação da comunidade bacteriana com as populações cultiváveis resistentes a antibióticos

a) Afluente

Nesta análise o primeiro e o segundo eixo canônico explicam cerca de 46% da variação encontrada ($p=0,002$), isto reflete-se na baixa separação das amostras, mesmo assim e de acordo com a análise efetuada, foi nos períodos PIII e principalmente PIV que houve uma relação mais clara entre a prevalência de resistentes e a estrutura da comunidade.

No período PIII, verificou-se uma relação intensa entre a estrutura da comunidade e a presença de enterobactérias resistentes a ciprofloxacina. De facto, tem-se vindo a verificar uma crescente preocupação com este antibiótico, devido ao facto de as evidências apontarem no sentido de um aumento da prevalência de resistentes no ciclo da água e mais particularmente em efluentes de ETAR (Reinthal *et al.*, 2003; Kümmerer, 2004; Ferreira da Silva *et al.*, 2007; Manaia *et al.*, 2010; Galvin *et al.*, 2010).

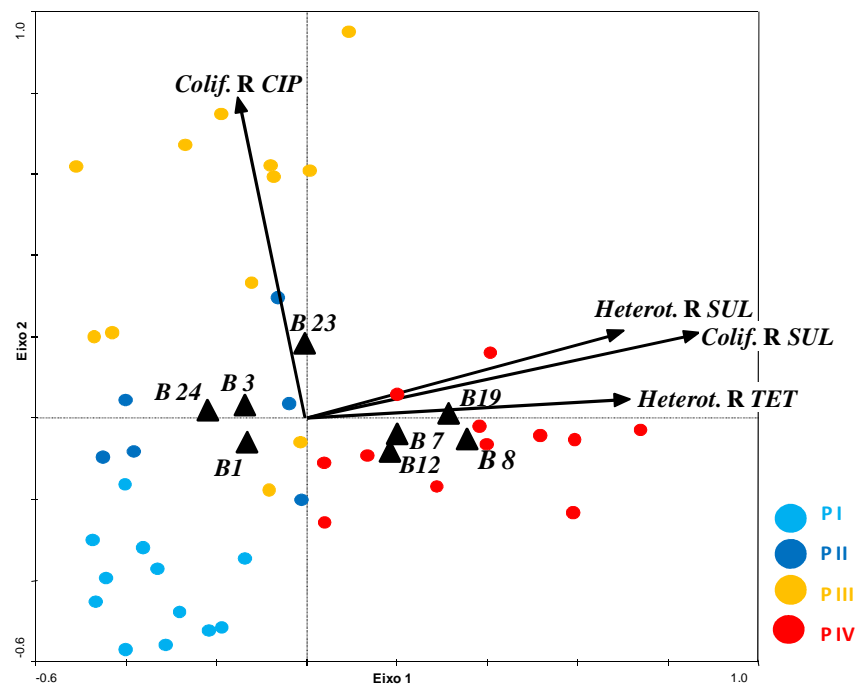


Figura 14. Diagrama de ordenação nos dois primeiros eixos da análise de correspondência canónica (CCA) das espécies em relação à percentagem de cultiváveis resistentes a antibióticos isolados de amostras de afluente ($n_{amostras}=42$; $n_{espécies}=19$; $n_{\%resistentes}=12$).

Durante o período PIV, foram sobretudo as populações de heterotróficos e enterobactérias resistentes a sulfametoxazol e os heterotróficos resistentes a tetraciclina que pareceram influenciar a estrutura da comunidade. De facto, durante este período, a resistência a sulfametoxazol foi significativamente mais elevada nestes grupos bacterianos, do que em períodos anteriores (tabela 4). Estas variações foram acompanhadas por elevada prevalência/intensidade de bandas de DGGE relacionadas com *Comamonas* (B7), *Sulfurimonas* (B8), *Clostridia* (B12) e B19 (sequência não analisada). As bandas B1 (*Arcobacter* sp.), B3 (*Acinetobacter* sp.) e B24 (não identificada) têm uma relação negativa para com o eixo 1, que se manifesta no facto de serem mais prevalentes durante o PI e PII.

b) Efluente

Nesta distribuição, os eixos 1 e 2 em conjunto, explicam 58% da variação encontrada na distribuição obtida e a variação das percentagens de resistência verificadas como significativas (as representadas com vetores na figura 15) contribui em 82% para a variação verificada na estrutura da comunidade de efluente tratado.

O padrão de variação e relação com as percentagens de resistência observada no efluente foi distinta do que se verificou para o afluente (figura 14). No período II observou-se uma forte relação com as populações de heterotróficos resistentes a tetraciclina e ciprofloxacina e coliformes resistentes a amoxicilina. As bandas B3 (*Acinetobacter* sp.), B4 (*γ-Proteobacteria*), B15 (*Leadbetterella* sp.), muito intensas em PII e fracas em PIV e fraca intensidade de B1 (*Arcobacter* sp.) em PII, foram também notados durante estes períodos e podem ter relação com as variações observadas. É de notar que foi durante este período, que se registaram as maiores taxas de resistência a ciprofloxacina, entre todos os grupos bacterianos cultivados. Neste período verifica-se também a forte presença de B15 (*Leadbetterella* sp.) que se encontra fortemente associada à taxa de coliformes resistentes a amoxicilina determinada neste período.

A separação das amostras de PIII e PIV pode ser explicada pela influência da prevalência de B6 (*Streptobacillus* sp.) e B16 (*Comamonas* sp.) em PIII e/ou PIV e a ausência de B9 (*Bacteroidetes bacterium*) em PI e PII. A separação destes períodos está fortemente relacionada com a elevada percentagem de bactérias heterotróficas resistentes a sulfametoxazol verificada.

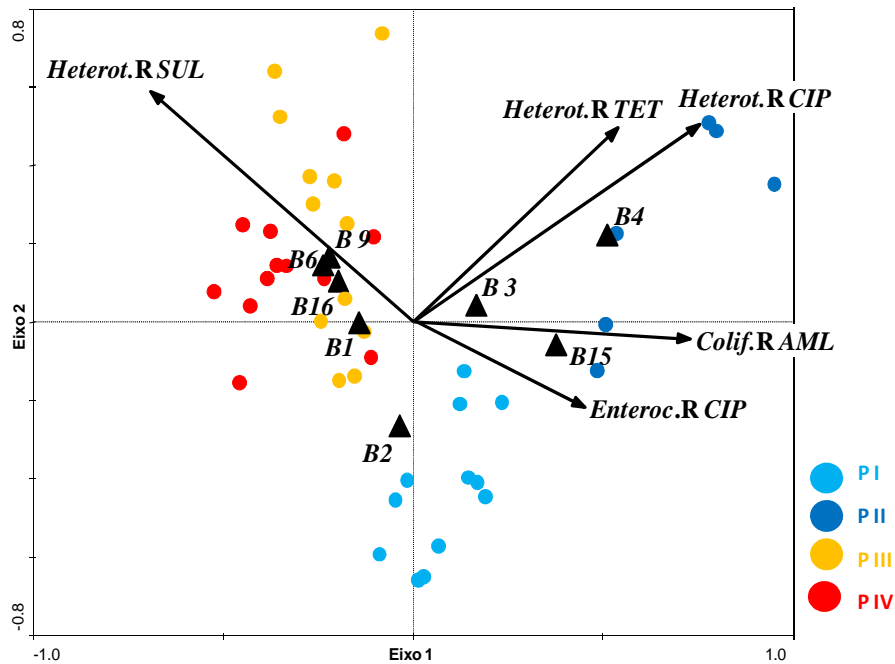


Figura 15. Gráfico da distribuição CCA de Espécies em função da Percentagem Cultiváveis Resistentes isoladas de **Efluente**, ($n_{amostras}=42$; $n_{espécies}=17$; $n_{%resistentes}=12$).

Ao longo do eixo 2 verificou-se a separação de PI das restantes amostras, a banda mais relacionada com esta separação é a banda B2 (*Arcobacter* sp.), fortemente representada em PI e praticamente ausente de PII e PIII. Esta separação poderá ser explicada pela percentagem de enterococos resistentes a ciprofloxacina que foi significativamente ($p \leq 0,05$) maior neste período (tabela 6) em relação aos restantes.

4.4. Relação da comunidade bacteriana com a concentração de agentes antimicrobianos

Os dados da prevalência das espécies em afluente ou efluente foram confrontados com as concentrações de diferentes agentes antimicrobianos detetadas nas mesmas amostras. Nas distribuições obtidas, as concentrações de antimicrobianos detetados (tabela 3), justificam a dispersão das espécies observada na figura 16.

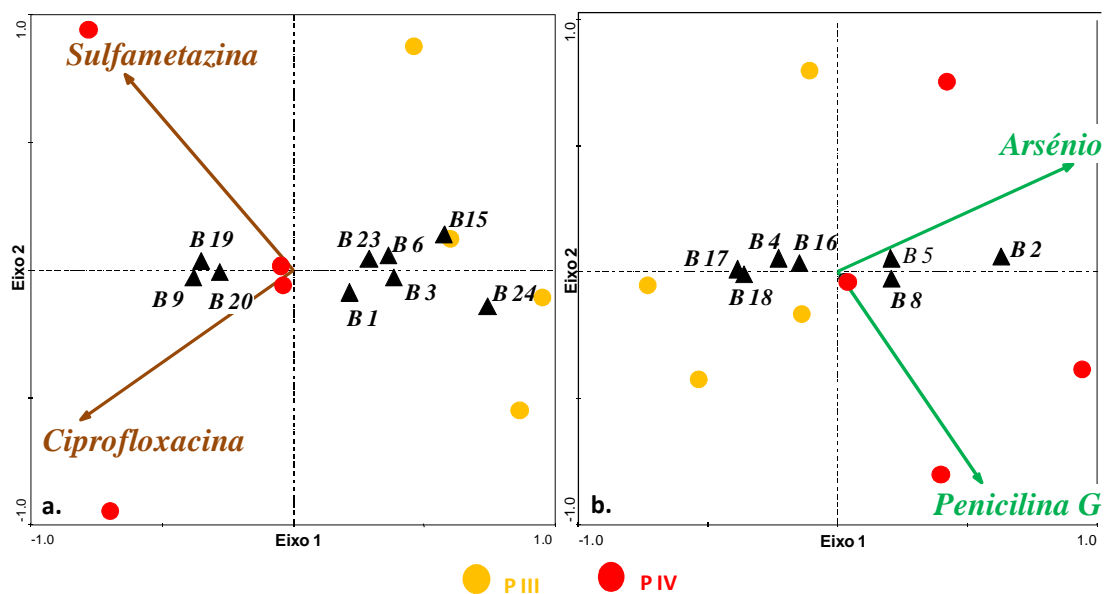


Figura 16. Gráfico da distribuição das Espécies em função da Concentração de antimicrobianos, para os períodos III e IV ($n_{\text{amostras}}=24$); **a. Afluente** ($n_{\text{espécies}}=19$; $n_{\text{antimicrobianos}}=13$); **b. Efluente** ($n_{\text{espécies}}=17$; $n_{\text{antimicrobianos}}=9$).

No afluente, as amostras de PIII diferenciam-se das de PIV ao longo do eixo 1. A variação observada nas amostras é explicada pelas elevadas concentrações de ciprofloxacina e de sulfametazina, cujos valores médios detetados durante o PIV foram, respetivamente, de $3,2$ e $3,0 \mu\text{gL}^{-1}$.

As bandas relacionadas com *Bacteroidetes* (B9) e *Curvibacter* (B20) mais abundantes em PIV estão diretamente relacionadas com as concentrações destes antibióticos enquanto B3 (*Acinetobacter* sp.), B6 (*Streptobacillus moniliformis*) e B15 (*Leadbetterella* sp.) se comportam de maneira inversa.

No caso do efluente, as amostras PIII são distintas de PIV devido à maior abundância das bandas B4 (*γ -Proteobacterium*) e B16 (*Comamonas* sp.) no período III e pela presença das bandas B17 (*Phascolarctobacterium* sp.) e B18 (*Comamonas* sp.) completamente ausentes durante PIV. As amostras de PIV diferenciam-se ainda pela maior abundância de B8 (*Sulfurimonas autotrophica*) e pelo aparecimento de B2 (*Arcobacter defluvii*) ausente durante PIII, ambas pertencentes à classe das *ϵ -Proteobacteria*. Pelo facto de em PIV se terem detetado concentrações médias de penicilina G ($16,79 \mu\text{gL}^{-1}$) e de arsénio ($1,95 \mu\text{gL}^{-1}$), superiores aos encontrados em PIII sugere que, a presença destes agentes químicos estejam relacionados com a diferente estrutura das amostras. Esta relação poderá ser direta, no caso de estas espécies serem de alguma forma resistentes a estes agentes químicos e assim possuírem vantagem competitiva, ou indireta pelo facto de outras espécies serem muito sensíveis o que poderá favorecer a proliferação destas.

4.5. Relação entre percentagens de resistência e concentrações de agentes antimicrobianos

Os diagramas da figura 17 apresentam os resultados da análise CCA considerando como espécies as percentagens de bactérias cultiváveis resistentes a antibióticos analisadas e, como variáveis ambientais, a concentração de antimicrobianos detetadas nas amostras, de afluente e efluente tratado, para os períodos III e IV da amostragem. Em ambas as distribuições a variação dos eixos 1 e 2 são estatisticamente significativos ($p=0,002$).

Nas amostras de afluente, os parâmetros ambientais explicam 90% da dispersão das amostras. Destes, os mais influentes foram a sulfametazina e o arsénio. A sulfametazina cujos valores médios ($2,0 \mu\text{gL}^{-1}$ em PIII e $3,0 \mu\text{gL}^{-1}$ em PIV) foram superiores durante o último período, estará mais fortemente relacionada com estas amostras. Simultaneamente verifica-se durante este período uma maior prevalência de heterotróficos resistentes a sulfametoxazol (14,9% em comparação com os 10,0% determinados em PIII), o antibiótico da mesma família, usado na enumeração dos cultiváveis resistentes.

O valor de arsénio mais elevado, $2,5 \mu\text{gL}^{-1}$, foi registado durante PIII período para o qual também se verificaram valores mais elevados na percentagem de coliformes resistentes a ciprofloxacina, 2,4% em comparação com a média de 1,2%, verificada durante PIV. A concentração de enrofloxacina também influencia a dispersão, mas esta deve-se à variação diária registada entre cada período. Os valores de concentração detetados foram estáveis em PIV e mais oscilantes durante PIII.

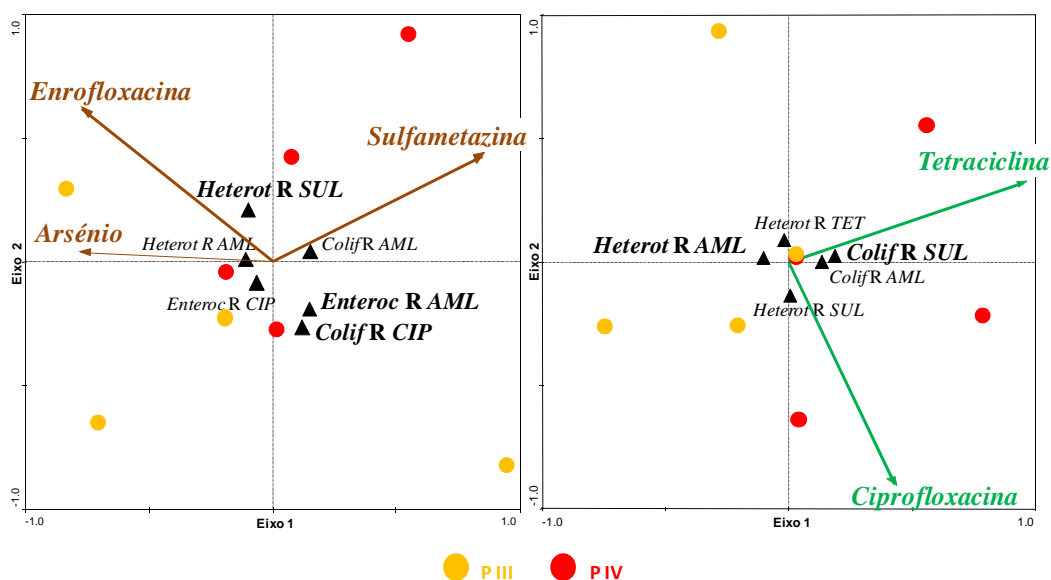


Figura 17. Gráfico da distribuição das bactérias cultiváveis resistentes a antibióticos sob a influência da prevalência de antimicrobianos nas águas residuais, após uma análise de correspondência canónica ($n_{\text{amostras}}=24$); **a. Afluente** ($n_{\text{espécies}}=12$; $n_{\text{antimicrobianos}}=13$); **b. Efluente** ($n_{\text{espécies}}=12$; $n_{\text{antimicrobianos}}=9$).

No caso do efluente, as concentrações de tetraciclina e ciprofloxacina detetadas explicam a dispersão encontrada. A separação dos dois períodos deve-se essencialmente ao facto de ambos os antibióticos terem sido detetados em concentrações superiores em PIV. Assim, as concentrações de tetraciclina registaram valores de 3,6 e 4,9 μgL^{-1} enquanto as de ciprofloxacina rondaram os 1,1 e 1,5 μgL^{-1} , em PIII e PIV, respetivamente.

Em termos das prevalências de bactérias cultiváveis resistentes, nota-se que os coliformes resistentes a sulfametoxazol são mais prevalentes em PIV, (7,3 % em PIII contra 13,6% em PIV) período onde se detetaram maiores concentrações de tetraciclina e ciprofloxacina, enquanto os heterotróficos resistentes a amoxicilina (42 % em PIII e 29 % em PIV) e os enterococos resistentes a sulfametoxazol (86 % em PIII e 65 % em PIV) seguiram a tendência contrária, tornando-se menos prevalentes com o aumento da concentração dos antibióticos tetraciclina e ciprofloxacina na água tratada. Aqui não se verifica relação direta entre a concentração de um antibiótico e aumento da prevalência de resistentes a esse tipo de antibiótico, como foi verificado para as sulfonamidas no caso do afluente.

CONCLUSÃO E TRABALHO FUTURO

O trabalho aqui apresentado fornece informações sobre a composição, estrutura e dinâmica das comunidades bacterianas presentes num esgoto municipal bruto e após o seu tratamento por lamas ativadas. O estudo contou com amostragens efetuadas em diferentes estações do ano. Assim, permitiu perceber que as alterações meteorológicas, especialmente a temperatura, podem afetar a estrutura da comunidade e, conseqüentemente, a eficiência do tratamento.

As amostras de esgoto municipal desta ETAR caracterizam-se essencialmente pela presença de bactérias da classe β -Proteobacteria: relacionadas com os géneros *Comamonas*, *Acidovorax* e *Curvibacter*, mas também γ -Proteobacteria (*Rheinheimera soli*), *Clostridia* e *Bacteroidia*. Enquanto a dinâmica da estrutura das amostras de efluente tratado variou em função de espécies pertencentes às ϵ -Proteobacteria (*Arcobacter cryaerophilus* e *Sulfurimonas autotrophica*) influentes em PI, γ -Proteobacteria é a classe prevalente em PII e para a diferenciação dos períodos PIII e PIV contribuem fundamentalmente as espécies *Acidovorax* sp. (β -Proteobacteria), *Streptobacillus moniliformis* (*Fusobacteria*) e *Bacteroidetes*.

Quando se cruzaram os dados de presença e intensidade das linhagens existentes em cada uma das amostras com outros parâmetros ambientais bióticos (percentagens de cultiváveis resistentes) e abióticos (concentração de antimicrobianos, condições meteorológicas e de parâmetros operacionais da ETAR) por CCA, verificou-se que os parâmetros que mais afetaram as comunidades bacterianas do afluente foram as concentrações de ciprofloxacina e sulfametazina com correlação com os heterotróficos e os coliformes cultiváveis resistentes a sulfametoxazol. Verifica-se ainda forte relação com a temperatura máxima do ar e a carência biológica de oxigénio de cada amostra.

As comunidades presentes no efluente tratado encontram-se mais dependentes das concentrações de arsénio e Penicilina G e relacionam-se fortemente com os heterotróficos cultiváveis resistentes a ciprofloxacina e sulfametoxazol e também com os coliformes resistentes a amoxicilina. A separação destas amostras ao longo do tempo relaciona-se fortemente com a temperatura máxima e a humidade relativa do ar e ainda com o caudal de água residual.

Embora este estudo não permita tirar conclusões muito robustas, dada a quantidade de amostras e outras limitações metodológicas, sugere que há de facto uma relação entre fatores ambientais, incluindo a concentração de antibióticos e a estrutura das comunidades. Por esse motivo, serve como incentivo a trabalhos futuros nesta área. De facto, todo este trabalho é sustentado pelo tratamento estatístico realizado e pelas ilações que este permite retirar. Assim,

e para que toda a análise se torne mais robusta será necessário efetuar mais amostragens, ao longo de mais tempo, registrando o maior número de parâmetros que caracterizem as amostras. No futuro dever-se-á ter em atenção a determinação de parâmetros como o pH e os níveis de nitratos e enxofre nas águas, por exemplo, pois são parâmetros importantes na engenharia da ETAR. Além disso, pode-se também enveredar por abordagens de PCR-DGGE mais particulares, recorrendo a primers específicos para determinados grupos bacterianos e/ou genes de resistência conhecidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amann** RI, Ludwig W, Schleifer K-H (1995) Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. *Microbial Reviews* **59**(1):143-169
- Arroyo** P, Ansola G, Blanco I, Molleda P, Calabuig EL & Miera LES (2010) Comparative analysis of the composition of bacterial communities from two constructed wetlands for municipal and swine wastewater treatment. *Journal of Water and Health* **8**(1):147-157
- Baker-Austin** C, Wright MS, Stepanauskas R, McArthur JV (2006) Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends in Microbiology, Cell Press* **14**(4):176-182
- Baquero** F, Martinez J-L, Canton R (2008) Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion Biotechnology* **19**:260-265
- Barreiros** L, Fernandes A, Ferreira ACS, Pereira H, Bastos MMSM, Manaia CM, Nunes OC (2008) New insights into a bacterial metabolic and detoxifying association responsible for the mineralization of the thiocarbamate herbicide molinate. *Microbiology* **154**:1038-1046
- Barreiros** L, Manaia CM, Nunes OC (2011) Bacterial diversity and bioaugmentation in floodwater of a paddy field in the presence of the herbicide molinate. *Biodegradation* **22**(2):445-461
- Batt** AL, Kim S, Aga DS (2007) Comparison of the occurrence of antibiotics in four full-scale wastewater treatment plants with varying designs and operations. *Chemosphere* **68**:428-435
- Boon** N, Windt WD, Verstraete W, Top EM (2002) Evaluation of nested PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) with group-specific 16S rRNA primers for the analysis of bacterial communities from different wastewater treatment plants. *FEMS Microbiology Ecology* **39**:101-112
- Calabrese** EJ & Baldwin LA (2002) Defining hormesis. *Human & Experimental Toxicology* **21**:91-97
- Cébron** A, Coci M, Garnier J, Laanbroek HJ (2004) Denaturing Gradient Gel Electrophoretic analysis of ammonia-oxidizing bacterial community structure in the lower Seine river: impact of Paris wastewater effluents. *Applied Environmental Microbiology* **70**(11):6726-6737
- Christensen** AM, Markussen B, Baun A, Halling-Sørensen B (2009) Probabilistic environmental risk characterization of pharmaceuticals in sewage treatment plant discharges. *Chemosphere* **77**:351-358
- Cottrell** MT & Kirchman DL (2000) Natural assemblages of marine *Proteobacteria* and members of the *Cytophaga-Flavobacter* cluster consuming low- and high-molecular-weight dissolved organic matter. *Applied and Environmental Microbiology* **66**(4):1692-1697
- D'Costa** VM, McGrann KM, Hughes DW, Wright GD (2006) Sampling the antibiotic resistome. *Science Magazine Reports* **311**:374-377

- Davies J & Davies D (2010)** Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **74**(3): 417-433
- de Figueiredo DR, Pereira MJ, Moura A, Silva L, Bárrios S, Fonseca F, Henriques I, Correia A (2007)** Bacterial community composition over a dry winter in meso- and eutrophic Portuguese water bodies. *FEMS Microbiology Ecology* **59**:638-650
- Du C, Wu Z, Xiao E, Zhou Q, Cheng S, Liang W, He F (2008)** Bacterial diversity in activated sludge from a consecutively aerated submerged membrane bioreactor treating domestic wastewater. *Journal of Environmental Sciences* **20**:1210-1217
- Ferreira da Silva M, Tiago I, Veríssimo A, Boaventura RAR, Nunes OC, Manaia CM (2006)** Antibiotic resistance of enterococci and related bacteria in an urban wastewater treatment plant. *FEMS Microbiology Ecology* **55**:322-329
- Ferreira da Silva M, Vaz-Moreira I, Gonzalez-Pajuelo M, Nunes OC, Manaia CM (2007)** Antimicrobial resistance patterns in *Enterobacteriaceae* isolated from an urban wastewater treatment plant. *FEMS Microbiology Ecology* **60**:166-176
- Figueira V, Serra E, Manaia CM (2011)** Differential patterns of antimicrobial resistance in population subsets of *Escherichia coli* isolated from waste- and surface waters. *Science of the Total Environment* **409**(6):1017-1023
- Fromin N, Hamelin J, Tarnawski S, Roesti D, Jourdain-Miserez K, Forestier N, Teyssier-Cuvelle S, Gillet F, Aragno M, Rossi P (2002)** Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. *Environmental Microbiology* **4**(11):634-643
- Galvin S, Boyle F, Hickey P, Vellinga A, Morris D, Cormican M (2010)** Enumeration and characterization of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* bacteria in effluent from municipal, hospital, and secondary treatment facility sources. *Applied and Environmental Microbiology* **76**(14):4772-4779
- Gilbride KA, Lee D-Y, Beaudette LA (2006)** Molecular techniques in wastewater: Understanding microbial communities, detecting pathogens, and real-time process control. *Journal of Microbiological Methods* **66**: 1-20
- He Z, Xie X, Xiao S, Liu J, Qiu G. (2007)** Microbial diversity of mine water at Zhong Tiaoshan copper mine, China. *Journal Basic Microbiology* **47**(6):485-95
- Jury KL, Vancov T, Stuetz RM, Khan SJ (2010)** Antibiotic resistance dissemination and sewage treatment plants. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology* - A. Méndez-Vilas Ed. Formatex p.509-519
- Kim S & Aga DS (2007)** Potential ecological and human health impacts of antibiotics and antibiotic-resistant bacteria from waste water treatment plants. *Journal of Toxicology Environmental Health* **10**(8):559–573
- Knapp CW, McCluskey SM, Singh BK, Campbell CD, Hudson G, Graham DW (2011)** Antibiotic resistance gene abundances correlate with metal and geochemical conditions in archived Scottish soils. *PLoS ONE* **6**(11):e27300. doi:10.1371/journal.pone.0027300E
- Kümmerer K (2003)** Significance of antibiotics in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **52**:5–7

- Kümmerer K (2004)** Resistance in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **54**:311-320
- Kümmerer K (2009)** Antibiotics in the aquatic environment – A review, Part I. *Chemosphere* **75**:417–434
- Li P, Wang Y, Wang Y, Liu K, Tong L (2010)** Bacterial community structure and diversity during establishment of an anaerobic bioreactor to treat swine wastewater. *Water Science & Technology* **61**(1):243-252
- Lozupone CA & Knight R (2007)** Global patterns in bacterial diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**(27):11436-11440
- MacDonald GM (2003)** Biogeography: Space, Time and Life. John Wiley & Sons inc., NY, USA (página 409)
- Manaia CM, Novo A, Coelho B, Nunes OC (2009)** Ciprofloxacin resistance in domestic wastewater treatment plants. *Water, Air and Soil Pollution* **208**:335–343
- Martinez JL (2009)** Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environmental Pollution* **157**:2893-2902
- Moura A, Tação M, Henriques I, Dias J, Ferreira P, Correia A (2007)** Characterization of bacterial diversity in two aerated lagoons of a wastewater treatment plant using PCR–DGGE analysis. *Microbiological Research* **164**:560-569
- Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG (1993)** Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied Microbiology and Biotechnology* **59**:695-700
- Nolan M, Gronow S, Lapidus A, Klenk H-P, Chain P et al., (2009)** Complete genome sequence of *Streptobacillus moniliformis* type strain (9901^T) *Standard in Genomic Sciences* **1**(3):300-307
- Novo A & Manaia CM (2010)** Factors influencing antibiotic resistance burden in municipal wastewater treatment plants. *Applied Microbiology and Biotechnology* **87**:1157-1166
- Pielou EC (1966)** The measurement of diversity in different types of biological collections. *Journal of Theoretical Biology* **13**:131-144
- Pita, FAG (2002)** Manual da disciplina de armazenamento e tratamento de resíduos, Volume II: Tratamento de águas residuais domésticas. *Departamento de Ciências da Terra, da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra*. Documento disponível em <https://woc.uc.pt/dct/getFile.do?tipo=2&id=136>
- Radjenovic J, Petrovic M, Barceló D (2009)** Fate and distribution of pharmaceuticals in wastewater and sewage sludge of the conventional activated sludge (CAS) and advanced membrane bioreactor (MBR) treatment. *Water Research* **43**:831-841
- Reinthaler FF, Posch J, Feierl G, Wüst G, Haas D, Ruckebauer G, Mascher F, Marth E (2003)** Antibiotic resistance of *E. coli* in sewage and sludge. *Water Research* **37**:1685-1690

- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989)** Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd Edition. Cold Spring Harbor, N.Y.: *Cold Spring Harbor Laboratory Press*
- Schluter A, Krause L, Szczepanowski RD, Goesmann A, Pühler A (2008)** Genetic diversity and composition of a plasmid metagenome from a waste water treatment plant. *Journal of Biotechnology* **136**:65–76
- Shannon CE & Weaver W (1963)** The mathematical theory of communication. University of Illinois Press, Urbana
- Shartau SL, Yurkiw M, Lin S, Grigoryan AA, Lambo A, Park HS, Lomans BP, van der Biezen E, Jetten MS, Voordouw G (2010)** Ammonium concentrations in produced waters from a mesothermic oil field subjected to nitrate injection decrease through formation of denitrifying biomass and anammox activity. *Applied and Environmental Microbiology* **76**(15):4977-4987
- Shen L, Xu H, Liu Y (2011)** Microbial characterization of the biofilms developed for treating ampicillin-bearing wastewater. *Journal of Environmental Science and Health*, **46**(3):314-322
- Snaird J, Amann R, Hubber I, Ludwig W, Schleifer K-H (1997)** Phylogenetic analysis and *in situ* identification of bacteria in activated sludge. *Applied and Environmental Microbiology* **63**(7):2884-2896
- Tchobanoglous G, Burton FL, Stensel HD (2003)** Wastewater Engineering: treatment and reuse, 4th Ed. Metcalf & Eddy, Inc., McGraw-Hill, New York
- Ter Braak CFJ (1986)** Canonical Correspondence Analysis: A new eigenvector technique for multivariate direct gradient analysis. *Ecology* **67**(5):1167-1179
- Ter Braak CJE & Verdonschot PEM (1995)** Canonical correspondence analysis and related multivariate methods in aquatic ecology. *Aquatic Sciences* **57**(3):255-289
- Ter Braak CJF & Smilauer P (2002)** CANOCO Reference manual and CanoDraw for Windows user's guide: software for canonical community ordination (version 4.5). Ithaca, NY: *Microcomputer Power*, 500 pp
- Thomas F, Hehemann J-H, Rebuffet E, Czjzek M, Michel G (2011)** Environmental and gut *Bacteroidetes*: the food connection. *Frontiers in Microbiology - Cellular and Infection Microbiology* **2**(93):1-16
- Thompson A, Griffin P, Stuetz R, Cartmell E (2005)** The fate and removal of triclosan during wastewater treatment. *Water Environment Research* **77**(1):63-67
- Valentin JL (1995)** Agrupamento e ordenação. *Oecologia Brasiliensis* Volume.II: Tópicos em Tratamento de Dados Biológicos. Editores: Peres-Neto PR, Valentin JL & Fernandez FAZ. Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Instituto Biologia, UFRJ, Rio de Janeiro. p. 27-55 (disponível em www.dialnet.unirioja.es/servlet/fichero_articulo?codigo=2887009)
- Vaz-Moreira I, Egas C, Nunes OC, Manaia CM (2011)** Culture-dependent and culture-independent diversity surveys target different bacteria: a case study in a freshwater sample. *Antonie van Leeuwenhoek* **100**:245–257

- Wagner M, Loy A, Nogueira R, Purkhold U, Lee N, Daims H (2002)** Microbial community composition and function in wastewater treatment plants. *Antonie van Leeuwenhoek* **81**:665-680
- Wan C-Y, De Wever H, Diels L, Thoeye C, Liang J-B, Huang L-N (2011)** Biodiversity and population dynamics of microorganisms in a full-scale membrane bioreactor for municipal wastewater treatment. *Water Research* **45**:1129-1138
- Wauters G, De Baere T, Willems A, Falsen E, Mario Vaneechoutte M (2003)** Description of *Comamonas aquatica* comb. nov. and *Comamonas kerstersii* sp. nov. for two subgroups of *Comamonas terrigena* and emended description of *Comamonas terrigena*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**:859-862
- Weon H-Y, Kim B-Y, Kwon S-W, Park I-C, Cha I-B, Tindall BJ, Stackebrandt E, Trüper HG, Go S-J (2005)** *Leadbetterella byssophila* gen. nov., sp. nov., isolated from cotton-waste composts for the cultivation of oyster mushroom. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **55**:2297-2302
- Willems A, De Ley J, Gillis M, Kersters K (1991)** *Comamonadaceae*, a new family encompassing the *Acidovorans* rRNA complex, including *Variovorax paradoxus* gen. nov., comb. nov. for *Alcaligenes paradoxus* (Davis 1969) *International Journal of Systematic Bacteriology* **41**(3):445-450
- Wright GD (2010)** Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic? *Current Opinion in Microbiology* **13**:589–594
- Yergeau E, Arbour M, Brousseau R, Juck D, John R, Lawrence JR, Masson L, Whyte LG, Greer CW (2010)** Microarray and Real-Time PCR analyses of the responses of high-arctic soil bacteria to hydrocarbon pollution and bioremediation treatments. *Applied and Environmental Microbiology* **75**(19):6258–6267
- Ziembinska A, Ciesielski S, Miksch K (2009)** Ammonia oxidizing bacteria community in activated sludge monitored by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *The Journal of General and Applied Microbiology* **55**:373-380