

INSTITUTO POLITÉCNICO DO PORTO
INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DO PORTO



**Dissertação de Mestrado em Engenharia Química,
no ramo Tecnologias de Proteção Ambiental**

**AVALIAÇÃO DE FUNCIONAMENTO DE DUAS ESTAÇÕES
DE TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUAIS
DO INTERIOR DE VILA NOVA DE GAIA**



Orientadora na SIMDOURO, S.A.: Mestre Fátima Meireles

Orientadora no ISEP: Doutora Valentina Domingues

Co-Orientadora no ISEP: Doutora Sónia Figueiredo

Vera Alexandra Tavares Barbosa

Novembro de 2015

“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em
procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos.”

(Marcel Proust)

Agradecimentos

Não podia deixar de dar os meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que contribuíram de forma direta e/ou indireta para a realização deste trabalho, nomeadamente:

a Deus, acima de tudo;

ao Instituto Superior de Engenharia do Porto, por todo o conhecimento adquirido ao longo destes 5 anos de ensino;

à Simdouro, pela oportunidade e pelo apoio financeiro concedidos para a realização desta dissertação/estágio;

aos colaboradores da Simdouro, pela disponibilidade e ajuda na realização desta dissertação/estágio;

à Eng.^a Fátima Meireles, Eng.^a Sónia Figueiredo e à Dr.^a Valentina Domingues pela ajuda, orientação, disponibilidade que sempre me foram concedidas;

à Eng.^a Aurora Silva pela ajuda, orientação e disponibilidade que sempre me demonstrou;

ao Grupo de Reação e Análises Químicas (GRAQ) pelo apoio financeiro fornecido para a elaboração da dissertação

aos meus colegas e amigos, principalmente, Diana Caldeira, por todo o apoio e paciência; sem ela, a conclusão deste mestrado não tinha sido possível;

à minha família, avós, madrinha, pais e irmã por toda a ajuda e oportunidade nesta fase importante da minha vida;

ao meu namorado Pedro Santos, pela sua compreensão, ajuda, apoio, paciência e disponibilidade que sempre demonstrou.

Resumo

Esta dissertação descreve o trabalho desenvolvido ao longo de um ano e um mês desde a pesquisa teórica até à prática experimental no âmbito da unidade curricular de Dissertação/estágio do Mestrado em Engenharia Química, no ramo Tecnologias em Proteção Ambiental.

O tema desta dissertação consiste na avaliação do funcionamento de duas estações de tratamento de águas residuais (ETAR) do interior do município de Vila Nova de Gaia no que diz respeito ao possível aumento da resistência a antibióticos na ETAR de Febros e na ETAR de Lever. Os testes de sensibilidade a antibióticos (TSA) foram executados para ambas as ETAR, sendo as amostras de água recolhidas na entrada e na saída dos reatores biológicos (tratamento secundário). Além disso, foram realizados testes de avaliação da eficiência de desinfecção por radiação ultravioleta (UV) relativamente à *Escherichia coli* (*E. coli*) na ETAR de Lever.

Os antibióticos selecionados para a realização deste trabalho foram a Eritromicina, a Azitromicina, a Claritromicina, a Ofloxacina, a Ciprofloxacina, o Sulfametoxazol, o Trimetoprim e o Metronidazol. Esta seleção baseou-se no facto de estes serem alguns dos antibióticos mais consumidos e mais persistentes no meio ambiente. A bactéria *E. coli* (isolada a partir de amostras das águas residuais estudadas) foi escolhida para a realização deste estudo uma vez que está sempre presente nas águas residuais domésticas e está associada a fenómenos de multirresistência a antibióticos.

Os testes de TSA foram realizados seguindo a metodologia de difusão por discos.

No período do estudo (Março a Junho de 2015) identificaram-se situações quer de aumento de resistência quer de aumento de sensibilidade aos antibióticos testados. As situações mais graves de aumento de resistência, a que corresponderam a halos nulos, verificaram-se para os antibióticos Claritromicina, Trimetoprim e Metronidazol, ocorrendo com maior frequência para os dois últimos, que aliás são fármacos que são administrados em simultâneo. Os períodos mais problemáticos em termos de aumento das resistências foram ligeiramente diferentes nas duas ETAR. No caso da ETAR de Febros correspondeu ao mês Abril e na ETAR de Lever ocorreu entre o final de Abril e o início de Maio. Considera-se que estes períodos poderão coincidir com um aumento do consumo destes fármacos devido à sua utilização no combate a infeções respiratórias muito comuns nesta altura do ano.

Não se observou qualquer sensibilidade da *E. coli* para o Metronidazol porque é um antibiótico com indicação para algumas bactérias anaeróbias, fungos e giardia, e que à partida não tem capacidade para eliminar a *E. coli*.

A eficiência da desinfecção na ETAR de Lever relativamente à remoção de *E. coli* foi satisfatória. Sendo de salientar a importância da manutenção, no que se refere à identificação de possíveis avarias nas lâmpadas e correspondente limpeza.

Os resultados deste trabalho provam a existência de estirpes da bactéria *E. coli* resistentes a alguns dos antibióticos estudados, o que reforça a importância da desinfecção no tratamento de águas residuais domésticas.

Palavras-chave: Antibióticos, Desinfecção por UV, ETAR, *Escherichia coli*, Resistência.

Abstract

This dissertation describes the work carried out over one year and a month since the theoretical research to experimental practice within the Master Science in Chemical Engineering, in Environmental Protection Technology.

The theme of this thesis is the evaluation of the operation of two wastewater treatment plants (WWTP) in the municipality of Vila Nova de Gaia with regard to the possible increase of antibiotic resistance in Febros' WWTP and Lever's WWTP. Susceptibility testing to antibiotics (STA) was performed for both wastewater treatment plants, using water samples collected at the entrance and exit of biological reactors (secondary treatment). Furthermore, evaluation tests of disinfection efficiency by ultraviolet radiation (UV) were carried out for the *Escherichia coli* (*E. coli*) in Lever's WWTP.

The selected antibiotics for this work were Erythromycin, Azithromycin, Clarithromycin, Ofloxacin, Ciprofloxacin, Sulfamethoxazole, Trimethoprim and Metronidazole. This selection was based on the fact that these are some of the most consumed antibiotics and more persistent in the environment. The bacterium *E. coli* (isolated from samples of the wastewaters in study) was chosen for this study since it is always present in domestic wastewater and is associated to multi-resistance phenomena to antibiotics.

STA tests were carried out following the methodology of diffusion disks.

During the study period (March to June 2015) situations of either resistance increase or increase of sensitivity to antibiotics tested were identified. The most serious situations of resistance increase, which corresponded to zero halos, were found for Clarithromycin, Trimethoprim and Metronidazole, being more frequent for the last two, which are drugs that are taken simultaneously. The most problematic periods in terms of resistance increase was slightly different in the two treatment plants. Regarding the Febros' WWTP it corresponded to the month of April and in Lever's WWTP it occurred between late April and early May. It is considered that these periods may coincide with an increase of consumption of these drugs due to their use in combating very common respiratory infections this time of year.

There was no susceptibility to Metronidazole because it is an antibiotic indicated for some anaerobic bacteria, fungi and giardia, and unable to eliminate *E. coli*.

The disinfection efficiency of Lever's WWTP in respect to the removal of *E. coli* was satisfactory. This emphasizes the importance of maintenance, in what concerns to the identification of possible malfunctions in lamps and corresponding cleaning.

These results prove the existence of strains of *E. coli* resistant to some antibiotics studied, which reinforces the importance of disinfection in the treatment of domestic wastewater.

Keywords: Antibiotics, UV disinfection, WWTP, *Escherichia coli*, Resistance.

Índice

1. Introdução	1
1.1 Enquadramento do tema	1
1.2 Objetivos da Tese	1
2. Descrição da Empresa e das Estações de Tratamento de Águas Residuais	3
2.1 SIMDOURO, S.A., atualmente integrada na Águas do Norte, S.A.....	3
2.2 ETAR de Febros.....	4
2.3 ETAR de Lever.....	5
3. Estado de Arte.....	7
3.1 Tratamento de águas residuais urbanas	7
3.2 Microrganismos presentes no tratamento secundário das ETAR	8
3.3 Bactéria Escherichia coli	12
3.4 Antibióticos.....	13
3.5 A resistência aos antibióticos	15
4. Parte Experimental.....	23
4.1 Meios de cultura e biodiscos	23
4.2 Confirmação da presença da bactéria E. coli	25
4.3 Planeamento laboral:.....	27
5. Resultados e Discussão.....	29
5.1 Curva de calibração e testes bioquímicos	29
5.2 Resultados de TSA referentes à ETAR de Febros	31
5.3 Resultados de TSA referentes à ETAR de Lever.....	38
5.4 Análise da evolução do afluente das ETAR ao longo do estudo.....	45
6. Conclusões e sugestões para trabalhos futuros	49
7. Bibliografia	51
Anexos	53
Anexo A: Planeamento semestral da dissertação	53

Anexo B: Curva de calibração da Escala McFarland num espectrofotómetro UV	55
Anexo C: Exemplo de cálculo.....	57
Anexo D: Resultados experimentais obtidos da ETAR de Febros	59
Anexo E: Exemplo dos Antibiogramas realizados ao efluente da ETAR de Febros no dia 24 de Março de 2015.....	71
Anexo F: Resultados experimentais obtidos da ETAR de Lever.....	73

Índice de Figuras

Figura 1.1 - Área abrangida pela Empresa SIMDOURO, S.A. [1]	3
Figura 1.2 - ETAR existentes no concelho de Vila Nova de Gaia [1].	4
Figura 3.1 - Esquema dos processos realizados numa ETAR	7
Figura 3.2 - Microrganismo classificado como fungo: bolor [4]	9
Figura 3.3 - Microrganismo classificado como Protozoário [5]	9
Figura 3.4 - Microrganismo classificado como alga [6]	10
Figura 3.5 - Microrganismo classificado como rotífero [7]	10
Figura 3.6 - Classificação das bactérias conforme a forma e agrupamento [8]	11
Figura 3.7 - Composição da parede celular para Gram-negativo e Gram-positivo [9]	11
Figura 3.8 - Bactéria <i>Escherichia coli</i> [10].....	12
Figura 3.9 - Mecanismos de resistência aos agentes antimicrobianos beta-lactâmicos em microrganismos Gram-negativo como membros da família Enterobacteriaceae [24].....	16
Figura 3.10 - TSA por método de macrodiluição em tubos [27]	18
Figura 3.11 - TSA por método de teste em microplacas [27]	19
Figura 3.12 - TSA por método de Agar-Diluição [27]	20
Figura 3.13 - TSA por método de Etest® [27]	20
Figura 3.14 - TSA por método de difusão por disco [27].....	22
Figura 4.1 - Amostras de uma ETAR: 1 - Afluente; 2 - Efluente	27
Figura 4.2 - Elaboração de um isolamento de um microrganismo [28].....	27
Figura 4.3 - Crescimento de <i>E. coli</i> em tubos de ensaios após inoculação a 37 °C.....	28
Figura 4.4 - Recolha de resultados com o paquímetro	28
Figura 5.1 - Calibração do equipamento UV em utilização	29
Figura 5.2 – Eficiência de remoção (%) das lâmpadas UV na ETAR de Lever	30
Figura 5.3 - Teste Presuntivo: Crescimento da bactéria em meio de cultura TBX.	30
Figura 5.4 - Teste Presuntivo: Visualização das bactérias no microscópio ótico após coloração de Gram: 1 – Bactéria de coloração verde no TBX; 2 – bactéria de coloração branca no TBX.	31
Figura 5.5 - Testes confirmativos: 1 - Crescimento da bactéria em meio de cultura Fluorocult (<i>E. coli</i> presente na tonalidade azul); 2 – Obtenção de fluorescência	

(<i>E. coli</i> presente na emissão de fluorescência); 3 – Obtenção do anel com adição de reagente Kovacs (<i>E. coli</i> presente em Indol (+)).	31
Figura 5.6 - Variação dos diâmetros dos halos em milímetros para cada antibiótico conforme a data de execução do ensaio na ETAR de Febros	33
Figura 5.7 - Diâmetro dos halos da <i>E. coli</i> no Afluente e Efluente da ETAR de Febros para o antibiótico Eritromicina	34
Figura 5.8 - Diâmetro dos halos da <i>E.coli</i> no Afluente e Efluente da ETAR de Febros para o antibiótico Azitromicina	35
Figura 5.9 - Diâmetro dos halos da <i>E.coli</i> no Afluente e Efluente da ETAR de Febros para o antibiótico Claritromicina	35
Figura 5.10 - Diâmetro dos halos da <i>E. coli</i> no Afluente e Efluente da ETAR de Febros para o antibiótico Ofloxacina	36
Figura 5.11 - Diâmetro dos halos da <i>E.coli</i> no Afluente e Efluente da ETAR de Febros para o antibiótico Ciprofloxacina	36
Figura 5.12 - Diâmetro dos halos da <i>E.coli</i> no Afluente e Efluente da ETAR de Febros para o antibiótico Sulfametoxazol	37
Figura 5.13 - Diâmetro dos halos da <i>E.coli</i> no Afluente e Efluente da ETAR de Febros para o antibiótico Trimetoprim	37
Figura 5.14 - Variação dos diâmetros dos halos em milímetros para cada antibiótico conforme a data de execução do ensaio para a ETAR de Lever	40
Figura 5.15 - Diâmetro dos halos da <i>E. coli</i> no Afluente e Efluente da ETAR de Lever para o antibiótico Eritromicina	41
Figura 5.16 - Diâmetro dos halos da <i>E. coli</i> no Afluente e Efluente da ETAR de Lever para o antibiótico Azitromicina	42
Figura 5.17 - Diâmetro dos halos da <i>E.coli</i> no Afluente e Efluente da ETAR de Lever para o antibiótico Claritromicina	42
Figura 5.18 - Diâmetro dos halos da <i>E.coli</i> no Afluente e Efluente da ETAR de Lever para o antibiótico Ofloxacina	43
Figura 5.19 - Diâmetro dos halos da <i>E.coli</i> no Afluente e Efluente da ETAR de Lever para o antibiótico Ciprofloxacina	43
Figura 5.20 - Diâmetro dos halos da <i>E.coli</i> no Afluente e Efluente da ETAR de Lever para o antibiótico Sulfametoxazol	44
Figura 5.21 - Diâmetro dos halos da <i>E.coli</i> no Afluente e Efluente da ETAR de Lever para o antibiótico Trimetoprim	44
Figura 5.22 - Variação do diâmetro do halo do afluente ao longo do tempo na ETAR de Febros	46

Figura 5.23 - Variação do diâmetro do halo do afluente ao longo do tempo na ETAR de Lever	47
Figura E1 - Exemplo dos Antibiogramas realizados ao efluente da ETAR de Febros no dia 24 de Março de 2015	71

Índice de Tabelas

Tabela 3.1 - Antibiótico e respetiva doença a tratar	15
Tabela 4.1 - Listagem de antibióticos com a respetiva massa	25
Tabela 4.2 - Leitura dos resultados do teste confirmativo	26
Tabela 5.1 - Média dos diâmetros dos halos de inibição obtidos com estirpes de <i>E. coli</i> isoladas no afluente e efluente da ETAR de Febros.....	32
Tabela 5.2 - Média dos diâmetros dos halos de inibição obtidos com estirpes de <i>E. coli</i> isoladas no afluente e efluente da ETAR de Lever	39
Tabela A1 - Planeamento semestral da dissertação.....	53
Tabela B1 - Indicações da preparação dos padrões da escala de McFarland e absorvâncias obtidas	55
Tabela D1 - Resultados experimentais no dia 24 de Março para a ETAR de Febros	59
Tabela D2 - Resultados experimentais no dia 7 de Abril para a ETAR de Febros	60
Tabela D3 - Resultados experimentais no dia 10 de Abril para a ETAR de Febros	61
Tabela D4 - Resultados experimentais no dia 20 de Abril para a ETAR de Febros	62
Tabela D5 - Resultados experimentais no dia 27 de Abril para a ETAR de Febros	63
Tabela D6 - Resultados experimentais no dia 4 de Maio para a ETAR de Febros	64
Tabela D7 - Resultados experimentais no dia 11 de Maio para a ETAR de Febros	65
Tabela D8 - Resultados experimentais no dia 18 de Maio para a ETAR de Febros	66
Tabela D9 - Resultados experimentais no dia 25 de Maio para a ETAR de Febros	67
Tabela D10 - Resultados experimentais no dia 1 de Junho para a ETAR de Febros	68
Tabela D11 - Resultados experimentais no dia 8 de Junho para a ETAR de Febros	69
Tabela D12 - Resultados experimentais no dia 15 de Junho para a ETAR de Febros	70

Tabela F1 - Resultados experimentais no dia 10 de Abril para a ETAR de Lever	73
Tabela F2 - Resultados experimentais no dia 20 de Abril para a ETAR de Lever	74
Tabela F3 - Resultados experimentais no dia 27 de Abril para a ETAR de Lever	75
Tabela F4 - Resultados experimentais no dia 4 de Maio para a ETAR de Lever	76
Tabela F5 - Resultados experimentais no dia 11 de Maio para a ETAR de Lever	77
Tabela F6 - Resultados experimentais no dia 18 de Maio para a ETAR de Lever	78
Tabela F7 - Resultados experimentais no dia 25 de Maio para a ETAR de Lever	79
Tabela F8 - Resultados experimentais no dia 1 de Junho para a ETAR de Lever	80
Tabela F9 - Resultados experimentais no dia 8 de Junho para a ETAR de Lever	81
Tabela F10 - Resultados experimentais no dia 15 de Junho para a ETAR de Lever	82

Nomenclatura

E - Eritromicina

AZM - Azitromicina

CLR - Claritromicina

OFX - Ofloxacina

CIP - Ciprofloxacina

SMX - Sulfametoxazol

TM - Trimetoprim

MTZ – Metronidazol

ETAR – Estação de tratamento de águas residuais

DL – Decreto-lei

E. coli - *Escherichia coli*

TSA – Teste de sensibilidade a antibióticos

UV – Ultravioleta

POVT – Programa operacional temático valorização do território

ADN – Ácido desoxirribonucleico

CMI – Concentração mínima de inibição

TBX – Tryptone Bile X-glucuronide

APT – Água peptonada tamponada

MH – Mueller Hinton

UFC – Unidade formadora de colónia

GRAQ – Grupo de Reação e Análises Químicas

Af. – Afluente

Ef. – Efluente

1. Introdução

1.1 Enquadramento do tema

A problemática da resistência das bactérias aos antibióticos é preocupante, visto que a ocorrência deste fenómeno tem vindo a aumentar de modo expressivo. As enterobactérias, nomeadamente a *Escherichia coli*, são bactérias importantes na análise das resistências a antibióticos devido à possibilidade de transferência genética.

Como as ETAR podem ser um local favorável para a propagação das resistências das bactérias aos antibióticos, por causa da concentração significativa de antibióticos presentes nas águas residuais e estas mesmas conterem microrganismos resistentes. Esta situação torna-se mais preocupante em estações de tratamento de águas residuais de maior dimensão. No entanto, este efeito pode ser minimizado caso a desinfeção dos efluentes tratados seja eficaz.

1.2 Objetivos da Tese

Os objetivos desta dissertação são a realização de um estudo de sensibilidade a antibióticos em duas estações de tratamento de águas residuais do interior do concelho de Vila Nova de Gaia. Para a realização desta avaliação, foram feitos testes à sensibilidade da bactéria *E. coli* aos antibióticos selecionados, à entrada e saída dos reatores biológicos das estações de tratamento de águas residuais de Febros e de Lever. A seleção dos antibióticos testados teve em conta ao seu uso pela população em geral e pela sua permanência no ambiente. A avaliação da resistência dos antibióticos selecionados permitirá otimizar o funcionamento das estações de tratamento de águas residuais em estudo, nomeadamente a nível microbiológico.

2. Descrição da Empresa e das Estações de Tratamento de Águas Residuais

2.1 SIMDOURO, S.A., atualmente integrada na Águas do Norte, S.A.

A Empresa SIMDOURO, S.A., sociedade anónima de capitais públicos e foi fundada no dia 27 de Outubro de 2009 pelo DL 312/2009. É responsável pela construção, gestão e concessão do sistema multimunicipal de saneamento do grande Porto, nomeadamente, pela recolha, tratamento e rejeição dos efluentes “em alta” dos Municípios de Arouca, Baião, Castelo de Paiva, Cinfães, Paredes, Penafiel e Vila Nova de Gaia (Figura 1.1)., abrangendo uma área de 1300 km² e cerca de 519000 habitantes equivalentes [1].



Figura 1.1 - Área abrangida pela Empresa SIMDOURO, S.A. [1]

Para atingir os seus objetivos, a SIMDOURO organizou um plano de investimentos no montante total aproximado 59,5 milhões de euros para executar de 2010 a 2015, financiado pelo Programa Operacional Temático Valorização do Território (Programa Operacional Temático Valorização do Território) em cerca de 40,8 milhões de euros. Este acontecimento vai permitir a construção de 22 estações de tratamento de águas residuais, 113 km de intercetores, 15 km de condutas elevatórias e 12 estações elevatórias. Ainda está prevista a reabilitação de 13 estações de tratamento de águas residuais já existentes [1].

As estações de tratamento de águas residuais existentes no concelho de Vila Nova de Gaia são: a ETAR do Areinho, a ETAR de Crestuma, a ETAR de Febros, a ETAR de Gaia Litoral e a ETAR de Lever, como se pode verificar na Figura 1.2. As

O tratamento preliminar é constituído por uma tamisagem em dois canais paralelos para remoção de sólidos de maiores dimensões dos efluentes.

O tratamento primário inclui uma unidade de desarenamento e desengorduramento para remoção de areias e de óleos e gorduras.

O tratamento secundário, ou seja, o tratamento biológico é realizado através de lamas ativadas em regime de baixa carga, ou seja, arejamento prolongado. O arejamento é assegurado por escovas de arejamento de eixo horizontal, apoiadas por um conjunto de agitadores de eixo horizontal do tipo “banana” para garantir o deslocamento da massa de água no interior dos tanques de arejamento. A decantação secundária é efetuada com o apoio de três decantadores circulares, estando 2 ou 3 em funcionamento, dependendo do volume de efluentes recebidos pela ETAR. As lamas extraídas do fundo dos decantadores secundários são bombeadas para um poço de lamas, de onde são recirculadas para a entrada dos tanques de arejamento ou removidas, como lamas em excesso.

O tratamento terciário é inexistente na ETAR de Febros, visto não ser necessário. O efluente final é descarregado no rio Febros, afluente do rio Douro, em condições ambientalmente adequadas.

Processo de tratamento das lamas

O tratamento das lamas resultantes do tratamento secundário da ETAR de Febros é composto pelas seguintes etapas:

- Espessamento das lamas por ação da gravidade num espessador circular;
- Desidratação das lamas espessadas com recurso a centrífugas;
- Armazenamento em silo, com 50 m³ de capacidade, das lamas desidratadas.

As lamas armazenadas são removidas constantemente tendo como destino a valorização agrícola.

2.3 ETAR de Lever

A ETAR de Lever está situada na Vila de Lever pertencente à União de freguesias de Sandim, Olival, Lever e Crestuma do concelho de Vila Nova de Gaia. O seu funcionamento teve início em Agosto de 2005 e está apta a receber efluentes de uma população de 25000 habitantes. A sua capacidade máxima de tratamento de

efluentes corresponde a um caudal médio de 7000 m³/d e um caudal de ponta é 0,182 m³/s [1].

Processo do tratamento dos efluentes

O processo de tratamento de efluentes na ETAR de Lever é composto pelas etapas que se descrevem resumidamente de seguida.

O tratamento preliminar é constituído por tamisador rotativo do tipo Huber para remoção dos sólidos de maiores dimensões presentes nos efluentes.

O tratamento primário contém um desarenador do tipo “vortex” para a remoção de areias.

O tratamento secundário, ou seja, o tratamento biológico é realizado através de lamas ativadas em regime de baixa carga, ou seja, arejamento prolongado. O arejamento é assegurado por três escovas de arejamento de eixo horizontal, apoiadas por dois agitadores de eixo horizontal do tipo “banana” para garantir o deslocamento da massa de água no interior dos tanques de arejamento. A decantação secundária é efetuada em dois decantadores circulares. As lamas extraídas do fundo dos decantadores secundários são bombeadas para um poço de lamas, de onde são recirculadas para a entrada dos tanques de arejamento ou removidas, como lamas em excesso.

O Tratamento terciário é constituído por um microtamisador e um sistema de desinfecção por radiação ultravioleta, para garantir uma melhor qualidade do efluente tratado a nível microbiológico, visto que a ETAR está próxima de uma praia fluvial. O efluente final é descarregado no rio Uíma, afluente do rio Douro, em condições ambientalmente adequadas.

Processo do tratamento das lamas

O tratamento das lamas resultantes do tratamento secundário da ETAR de Febros é composto pelas seguintes etapas:

- Espessamento das lamas por ação da gravidade;
- Desidratação das lamas espessadas com recurso a centrífuga;
- Armazenamento das lamas desidratadas em silo com 20 m³ de capacidade.

As lamas armazenadas são removidas constantemente tendo como destino a valorização agrícola.

3. Estado de Arte

3.1 Tratamento de águas residuais urbanas

Uma ETAR recebe águas residuais provenientes de instalações domésticas e industriais tendo como objetivo tratar estas águas, de forma que apresentem qualidade para a sua descarga na natureza [2,3].

Por norma, as ETAR recebem águas residuais urbanas, sendo estas uma mistura das águas residuais domésticas com industriais e ou pluviais [2].

Geralmente as ETAR contêm vários níveis de tratamento: preliminar, primário, secundário e terciário (Figura 3.1) [2,3].

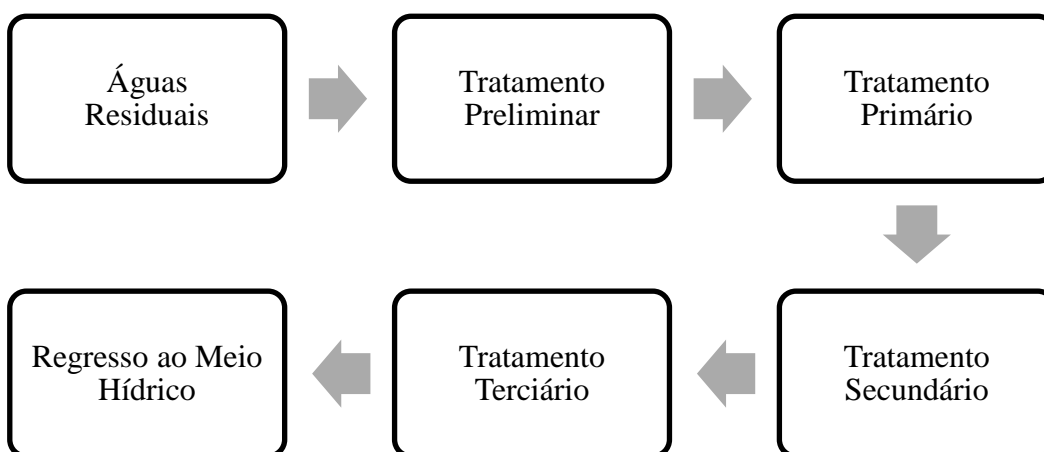


Figura 3.1 - Esquema dos processos realizados numa ETAR

O tratamento preliminar consiste num tratamento físico em que ocorre a remoção, por processos físicos, de sólidos (de maiores dimensões) e gorduras dos efluentes [3].

O tratamento primário consiste num tratamento físico-químico, que consiste na remoção de sólidos presentes nas águas residuais urbanas, de menor dimensão, podendo estes ser retirados por sedimentação com ou sem recurso à adição de reagentes químicos (coagulantes e floculantes). Este tratamento promove geralmente uma redução superior a 20% para a CBO_5 e a 50% para o total de partículas sólidas em suspensão [2,3].

O tratamento secundário consiste num tratamento biológico em que ocorre a remoção da matéria orgânica presente nas águas residuais urbanas, tendo nesta fase

uma grande importância a ação dos microrganismos. Também pode ser realizada uma decantação secundária com o intuito de cumprir os valores exigidos por lei. Os diversos tipos de tratamentos secundários incluem as lamas ativadas, filtros ou leitos percoladores, discos biológicos, lagunagem e digestão anaeróbia [2,3].

Atualmente os tratamentos primário e secundário, anteriormente referidos, são obrigatórios no tratamento de efluentes [3].

O tratamento terciário é facultativo, depende das exigências impostas de qualidade do efluente final por causa do local de descarga e consiste num tratamento dedicado especificamente à remoção de um poluente ou conjunto de poluentes, podendo ser um tratamento físico, químico ou biológico, de acordo com o tipo de poluente/poluentes a remover [3].

3.2 Microrganismos presentes no tratamento secundário das ETAR

A microbiologia é um ramo da Biologia que estuda os microrganismos, isto é, organismos que não são visíveis a “olho nu”. É necessário um equipamento designado por microscópio para poderem ser observados [2].

Os diversos microrganismos presentes na natureza são fungos, bactérias, protozoários, algas e rotíferos. Os microrganismos são também classificados de acordo com a sua tolerância ao oxigénio, sendo aeróbios, aeróbios-anaeróbios facultativos e anaeróbios [2].

Os fungos são seres vivos com características eucarióticas e pertencem ao reino Fungi. Existem diversos tipos de fungos, dependendo da sua dimensão e toxicidade para o ser humano. Neste grupo estão incluídos os cogumelos e microrganismos como bolores (Figura 3.2) e levedura. Podem ser responsáveis por diversas doenças como intoxicações alimentares, micoses entre outras.



Figura 3.2 - Microrganismo classificado como fungo: bolor [4]

Os protozoários são seres vivos unicelulares e eucarióticas e seres heterotróficos e pertencem ao reino Protista. Conseguem ter uma vivência isolada ou em colônia. Também podem possuir uma vida em liberdade, ou seja, uma única espécie ou conviver com outros organismos. O tipo de habitat pode ser variado. Alguns protozoários são considerados parasitas de diversos seres, incluindo o ser humano. A distinção entre as várias espécies de protozoários está relacionada com o tipo de locomoção. Os diversos tipos de protozoários são sarcodíneos (Figura 3.3), flagelados, ciliados, esporozoários.

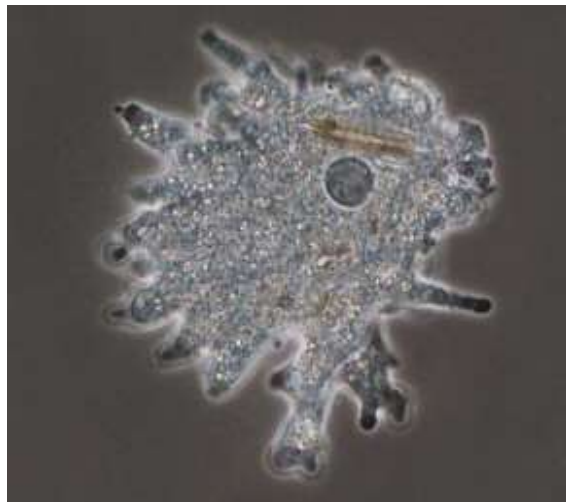


Figura 3.3 - Microrganismo classificado como Protozoário [5]

As algas são seres vivos eucariontes que contêm clorofila, por isso, são capazes de produzir o próprio alimento através da fotossíntese. A maior parte das algas são marinhas, ou seja, de água salgada. Também é possível encontrar espécies de algas na água doce e fora da água. As algas são seres vivos independentes de

outras espécies e são de grande importância pela sua capacidade de produzir oxigênio através da fotossíntese. Existem diversos tipos de algas desde as visíveis ao olho humano, as macroalgas, até às microscópicas, as microalgas (Figura 3.4).



Figura 3.4 - Microorganismo classificado como alga [6]

Os rotíferos são seres vivos microscópicos pertencentes ao filo rotífera do reino Animal. Por norma, estes microrganismos habitam em águas doces. Estes microrganismos são bioindicadores de qualidade de água (Figura 3.5).

Os rotíferos têm como principais características:

- Corpo com formato longo e cilíndrico;
- Contêm uma coroa de cílios à volta da boca;
- Presença de simetria;
- Não possuem cefalização;
- Possuem três tipos de tecidos (triblastia): ectoderme, mesoderme e endoderme;
- O sistema digestivo é completo, composto por boca, intestino, reto e ânus;
- Não possuem sistema cardiovascular nem respiratório.

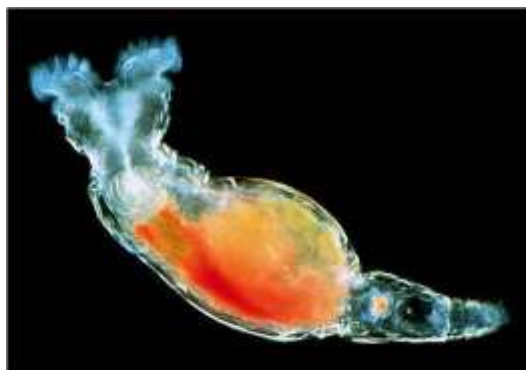


Figura 3.5 - Microorganismo classificado como rotífero [7]

As bactérias são seres vivos com características procariontes e unicelulares, possuem uma estrutura celular. Conseguem ter uma vivência isolada ou em colônia.

Ao contrário que acontece às células animais e vegetais, as bactérias apresentam variações consoante a sua forma, tamanho e outras características.

Cada forma tem um nome específico (Figura 3.6). Também é possível possuir estruturas extracelulares como flagelos, esporos e entre outros.

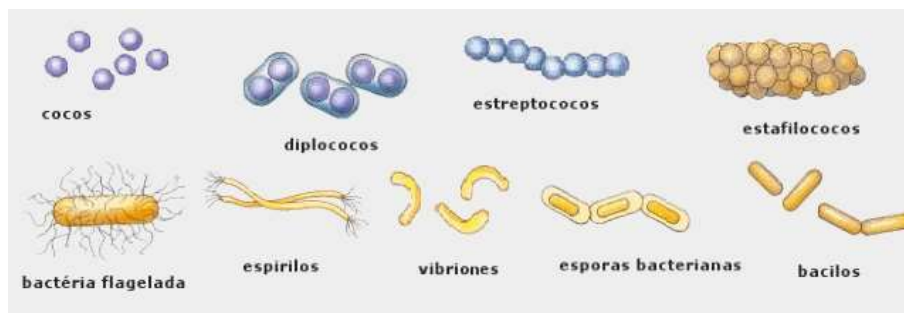


Figura 3.6 - Classificação das bactérias conforme a forma e agrupamento [8]

As bactérias podem ser classificadas em dois grupos: bactérias Gram-positivo e bactérias Gram-negativo. A principal diferença é na espessura da parede celular (peptidoglicano), sendo que as bactérias Gram-positivo contêm uma parede celular mais espessa enquanto as bactérias de Gram-negativo contêm essa camada mais fina (Figura 3.7).

A composição da parede celular inclui políptídeos, açúcares aminados (glucosamina, ácido murâmico) e fosfato de ribitol.

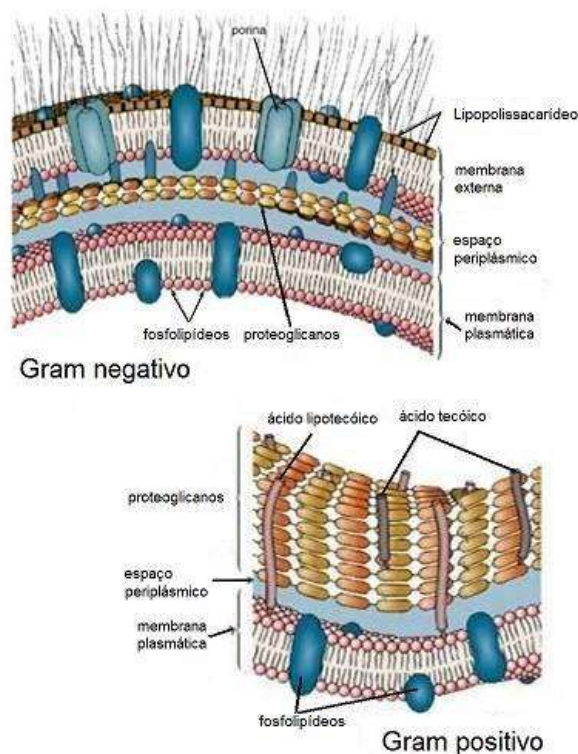


Figura 3.7 - Composição da parede celular para Gram-negativo e Gram-positivo [9]

Para o tratamento biológico das ETAR funcionar, é necessário conter microrganismos capazes de realizar o tratamento ao efluente. Os microrganismos presentes no tratamento secundário das ETAR são responsáveis pela redução da carga orgânica e turbidez presentes nos efluentes domésticos e industriais. Cada tipo de tratamento secundário contém os seus microrganismos específicos.

Os microrganismos presentes nas lamas ativadas são protozoários, nomeadamente ciliados e flagelados, bactérias, rotíferos e raramente fungos.

Os microrganismos presentes nos filtros percoladores e nos discos biológicos são bactérias, fungos, algas, protozoários e rotíferos [2].

Os microrganismos presentes nas lagoas (lagunagem) são microrganismos aeróbios, aeróbios-anaeróbios facultativos e anaeróbios, consoante as zonas e o tipo das lagoas [2].

Os microrganismos presentes na digestão anaeróbia são diversos tipos de bactérias que conseguem viver em condições anaeróbias, ou seja, ausência de oxigénio [2].

3.3 Bactéria *Escherichia coli*

Entre os microrganismos existentes nas águas das ETAR. A bactéria *E. coli* está habitualmente presente nas águas residuais domésticas, sendo uma das mais características nestes efluentes.

A bactéria *E. coli*, é uma bactéria Gram negativa, pertencente à família Enterobacteriaceae. Esta bactéria encontra-se no trato intestinal dos animais de sangue quente, sobretudo dos seres humanos.

A *E. coli* tem o formato de bastonete, possui vários flagelos em volta da célula e adesinas para facilitar a sua fixação ao trato intestinal do animal (Figura 3.8).



Figura 3.8 - Bactéria *Escherichia coli* [10]

Apesar da bactéria *E. coli* existir naturalmente no nosso trato intestinal, esta bactéria é responsável por algumas doenças que ocorrem nos restantes órgãos do

organismo, como gastroenterites e infecções urinárias. Estas situações ocorrem quando há ingestão de água e alimentos contaminados por fezes humanas.

A observação da resistência da bactéria *E. coli* aos antibióticos pode dar-nos uma ideia aproximada da propagação da resistência das bactérias após os tratamentos impostos pelas ETAR.

A bactéria *E. coli* é a bactéria mais frequente nas hemoculturas e é considerada uma enterobacteriaceae comum multirresistente [11].

3.4 Antibióticos

Os antibióticos são fármacos que contêm substâncias químicas produzidas por organismos vivos para controlar a infeção bacteriana, com o objetivo de matar os microrganismos ou inibir o seu crescimento, mesmo sendo em doses baixas [12].

Os diversos tipos de antibióticos são antibacterianos, antimicóticos, antivíricos, antifúngicos, antiparasitários.

Dependendo do tipo do antibiótico, o mecanismo de ação pode ser:

- Inibir a produção de proteínas ou de parede celular;
- Inibir da replicação de ácido desoxirribonucleico (ADN);
- Rutura da membrana de células que mantêm o equilíbrio químico [12].

As características ideais para um antibiótico são:

- Conter uma ação antibacteriana seletiva e forte na extensa gama de microrganismos;
- Ser bactericida;
- Exercer a sua atividade antibacteriana, não sendo degradado ou prejudicado por enzimas;
- Não danificar o sistema imunitário do organismo;
- Não causar efeitos adversos, mesmo em doses elevadas;
- Não criar reações alérgicas;
- Não induzir o aparecimento de germes resistentes;
- Possuir características de absorção, distribuição e excreção para que estes possam ser mantidos por um tempo necessário no sangue e tecidos do organismo;
- Eficaz tanto por via oral tanto por rectal;
- Ser produzido em grandes quantidades a um preço razoável.

No surgimento dos primeiros antibióticos na década de 1940, foram considerados fármacos milagrosos da era moderna, pois o risco de morte com infecções comuns e com doenças como sífilis, gonorreia, tuberculose foi reduzido significativamente. Apesar da descoberta da cura “milagrosa”, o surgimento e a propagação de microrganismos patogénicos resistentes aos fármacos subiu drasticamente [13]. Com o aumento da resistência das bactérias responsáveis pelas infecções dos seres humanos, maior terá que ser a concentração dos antibióticos a utilizar. Segundo os dados da estatística do medicamento de 2012, publicado em 15 de Junho de 2015, os antibióticos estão em 5º lugar, tendo vendidos 7191321 embalagens [14].

Durante os tratamentos das ETAR os microrganismos vão contactar com os antibióticos presentes nas águas residuais, o que promove a sua seleção em termos de resistência aos antibióticos assim como a sua proliferação. Assim estes podem ter como destino final o meio hídrico, caso não sejam eliminados no processo de tratamento, o que pode reintroduzi-los nos sistemas de abastecimento de águas se não forem removidos por processos de desinfecção, causando um problema de saúde pública.

Contudo, no ano 2013, a Direção-Geral da saúde criou uma norma específica sobre as resistências dos microrganismos para todos os laboratórios do Sistema Nacional de Saúde referente à vigilância epidemiológica das resistências aos antimicrobianos com o intuito de controlar a sua propagação [15].

Neste trabalho realizou-se um breve estudo sobre a resistência na bactéria *E. coli* a alguns antibióticos. Para uma justa seleção de antibióticos a analisar, fez-se uma breve investigação sobre os antibióticos mais consumidos pela população portuguesa e os antibióticos mais persistentes no meio ambiente, baseada em informação obtida pelo ministério da agricultura e do mar e artigos científicos [16,17].

Na Tabela 3.1 apresentam-se os vários antibióticos e a respetiva doença a tratar, isto é, a razão ou o motivo pela toma do antibiótico pelo ser humano [18,19].

Tabela 3.1 - Antibiótico e respetiva doença a tratar

Antibiótico	Doença a tratar
Eritromicina	Infeções oculares, infeções estreptocócicas, doença do legionário.
Azitromicina	Bronquite, pneumonia, amigdalite, faringite, sinusite, otite média, infeções na pele, DST.
Claritromicina	Infeções do trato respiratório superior e inferior. Úlcera duodenal por <i>H. pylori</i> , Infeção por <i>Micobacterium avium</i> .
Ofloxacina	Pneumonia, bronquite e exacerbações agudas da bronquite crónica, Infeções abdominais.
Ciprofloxacina	Infeções oculares, úlceras que ocorrem na córnea do olho.
Sulfametoxazol Trimetoprim	Bronquite, infeção do ouvido médio, infeções do trato urinário, diarreia do viajante
Metronidazol	Infeções vaginais, doenças de pele, úlceras e gastrite crónica.

3.5 A resistência aos antibióticos

A resistência dos microrganismos aos antibióticos é uma forma de defesa do microrganismo à ação do antibiótico.

Os microrganismos considerados resistentes, incluindo os multirresistentes, são responsáveis pelas contaminações nos centros de saúde, pelas contaminações em doentes que não estão em ambiente hospitalar e pelas infeções dos animais destinados à alimentação, podendo pertencer à flora bacteriana dos seres vivos saudáveis [20].

Segundo os estudos científicos publicados [21], a resistência das bactérias aos antibióticos tem evoluído de uma forma drástica e preocupante.

Alguns estudos científicos [22,23] revelam que adição de antibióticos nos animais destinados para consumo humano, aumenta a possibilidade de criação de superbactérias resistentes.

No caso das bactérias, como a *E. coli*, estas já são naturalmente resistentes a alguns antibióticos (resistência intrínseca ou inerente), mas outras bactérias desenvolvem resistência com a ocorrência de alterações genéticas com o contacto com o antibiótico (resistência adquirida) ou por meio de troca de material genético no interior do organismo do ser vivo [20].

A aquisição e a propagação da resistência antibacteriana podem advir de diversos mecanismos. Os vários tipos de mecanismos podem ser por resistência natural ou intrínseca, por resistência adquirida, por elementos genéticos móveis, por mecanismos de transmissão genética ou por mecanismos bioquímicos de resistência [24].

No caso da resistência antibacteriana através da bactéria *E. coli*, a resistência é obtida por mecanismos bioquímicos de resistência, mais concretamente, inativação ou modificação enzimática. Uma das enzimas responsáveis por este acontecimento na bactéria *E. coli* é a beta-lactamase. Esta enzima contém o essencial mecanismo de resistência aos antibióticos beta-lactâmicos vulgarmente associada aos microrganismos Gram-negativo (Figura 3.9) [24].

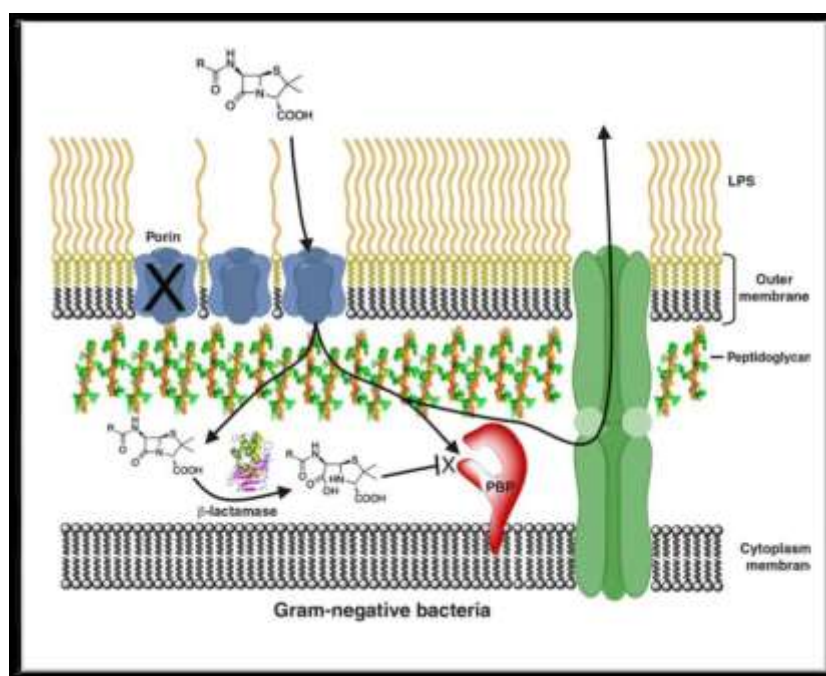


Figura 3.9 - Mecanismos de resistência aos agentes antimicrobianos beta-lactâmicos em microrganismos Gram-negativo como membros da família Enterobacteriaceae [24].

Algumas bactérias causadoras de doenças reagem à medicação utilizada, tornando-se resistentes a ela. Este processo pode ser rápido ou lento, por isso, a vida útil dos antibióticos fica limitada. Por este motivo, o uso incorreto dos antibióticos potencia o aparecimento da resistência das bactérias. Esta questão, apesar de ser económica, é muito importante para a saúde pública, porque uma simples infeção comum pode passar a ser uma infeção fatal para o ser humano [25].

Se não forem tomadas medidas contra o uso inadequado dos fármacos, corremos o risco enfrentar uma era pós-antibiótica, em que as infeções deixam de ter cura e haverá a necessidade de descobrir “novos antibióticos”.

A evolução das resistências dos microrganismos é um processo natural que vai acontecer, mais tarde ou mais cedo, com todos os fármacos. Independentemente da escolha do antibiótico, da infecção, da dose ingerida ou do tempo de tratamento, a o microrganismo ajusta-se ou falece através de um fenómeno conhecido por “pressão seletiva” [26].

Esta problemática tem uma enorme importância socioeconómica, porque custa incontáveis quantias de dinheiro e prejudica imensas vidas humanas, podendo causar uma crise global no sector dos fármacos [13].

É necessário tomar medidas urgentes para evitar a evolução das resistências de forma tão acelerada.

Este trabalho visa contribuir para a compreensão deste fenómeno nas estações de tratamento de águas residuais, onde contactam prolongadamente microrganismos e antibióticos. Descrevem-se de seguida alguns dos testes de sensibilidade dos microrganismos aos antibióticos que poderiam ser usados.

Teste de sensibilidade dos microrganismos aos antibióticos (TSA)

Os TSA podem ser realizados aos seguintes microrganismos:

- Enterobactérias;
- *Pseudomonas* spp.,
- *Acinetobacter* spp.;
- *Staphylococcus* spp.;
- *Enterococcus* spp.;
- *Streptococcus pneumoniae*;
- *Streptococcus* do grupo *viridans* e beta-hemolítico;
- *Haemophilus influenzae*;
- Complexo *Burkholderia cepacia*;
- *Stenotrophomonas maltophilia*;
- *Neisseria gonorrhoeae* e *Neisseria meningitidis*.

Os testes podem ser realizados de diversas formas:

- Macrodiluição em tubos;
- Teste em Microplacas;
- Diluição em agar;
- Etest;

- Automação;
- Difusão por disco.

A macrodiluição em tubos foi uma das primeiras técnicas disponíveis a ser usada para a realização dos TSA. Consiste numa preparação de diluições seriadas e logarítmicas de antibióticos em meio de cultura líquido, permitindo o crescimento bacteriano (Figura 3.10) [27].

A vantagem da macrodiluição em tubos é a descoberta de um resultado quantitativo sobre a concentração mínima de inibição de crescimento bacteriano.

As desvantagens desta técnica são:

- Grande quantidade de reagente utilizado (grande custo);
- Espaço necessário para a conservação dos tubos;
- Enorme possibilidade de ocorrerem erros experimentais durante a preparação das concentrações dos antibióticos;
- Muito trabalho manual e muito tempo necessário para a preparação deste TSA [27].

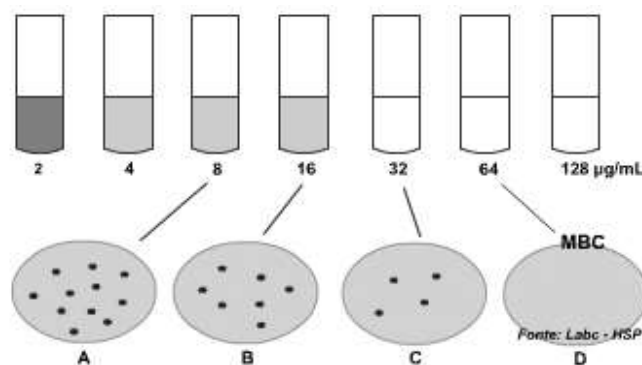


Figura 3.10 - TSA por método de macrodiluição em tubos [27]

O Teste por Microplacas (Figura 3.11) é uma réplica em pequena escala da técnica anterior, em que se substitui os tubos utilizados na macrodiluição por placas plásticas estéreis. Estas placas contêm 96 poços e um fundo em formato em “U”, permitindo uma melhor visualização do crescimento bacteriano. Em cada placa é colocado um número de antibióticos, próximo de 12, em diversas concentrações [27].

As vantagens desta técnica são:

- Utilização de pouco espaço de armazenamento e de poucos reagentes;
- Grande reprodutibilidade dos resultados;
- Geração de um resultado quantitativo face à concentração mínima de inibição bacteriana;
- Possibilidade de utilizar placas pré-fabricadas e sistemas informáticos, fornecidos pelos fabricantes das placas, para a análise dos resultados obtidos.

As desvantagens deste método são:

- Custo elevado das placas de microdiluição;
- Inflexibilidade na escolha dos antibióticos a testar quando se utilizam placas pré-fabricadas.

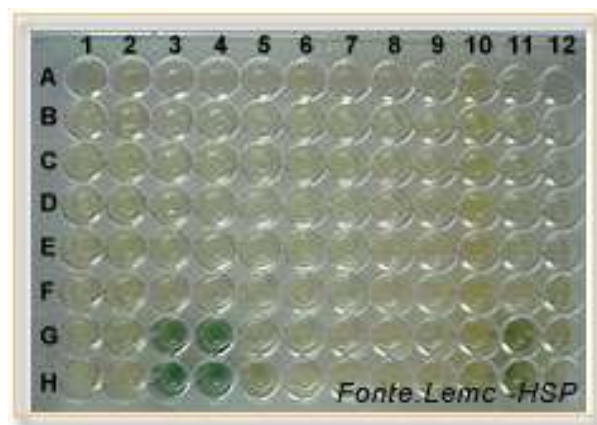


Figura 3.11 - TSA por método de teste em microplacas [27]

O TSA pelo método diluição em agar consiste em ensaios com concentrações seriadas e logarítmicas de um antibiótico. Cada placa de Petri com meio de cultura só contém uma única concentração de antibiótico (Figura 3.12) [27].

As vantagens deste método são:

- Possibilidade de testar um número elevado de amostras em simultâneo;
- Custo baixo de operação;
- Determinação quantitativa da concentração mínima de inibição de crescimento bacteriano;

As desvantagens deste método são:

- Muito tempo e trabalho necessários para a preparação desta técnica;

- Possibilidade de perda da potência/concentração dos antibióticos;

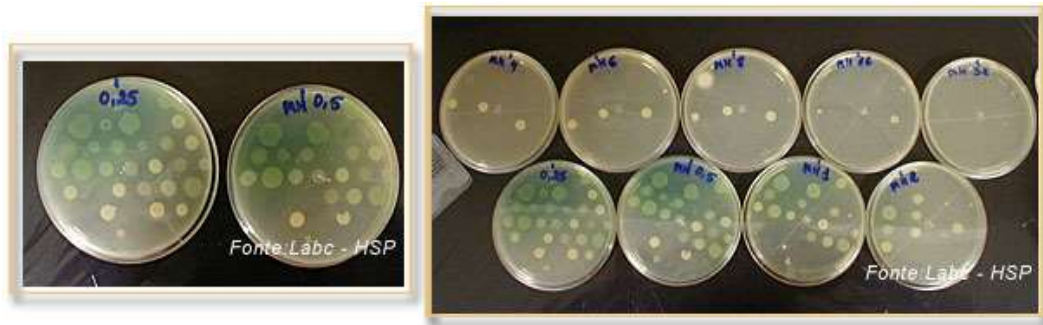


Figura 3.12 - TSA por método de Agar-Diluição [27]

A técnica de Etest® consiste numa fita plástica disponível no mercado (Figura 3.13) que contém concentrações de antibióticos crescentes numa face e a marcação da escala de concentrações na outra face, com o intuito de facilitar a leitura dos resultados. Baseia-se na difusão do gradiente do antibiótico no meio de cultura, com o objetivo de determinar a concentração mínima de inibição (CMI) do microrganismo em teste [27].

As vantagens deste método são:

- Flexibilidade de escolha dos antibióticos em teste;
- Determinação quantitativa da concentração mínima de inibição de crescimento bacteriano;
- Fácil operação.

As desvantagens deste método são:

- Custo elevado;
- Limitação do número de antibióticos em teste por placa de Petri.

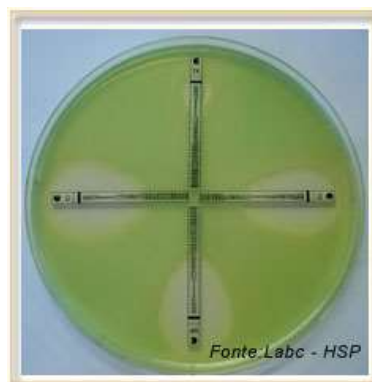


Figura 3.13 - TSA por método de Etest® [27]

O TSA por automação é um sistema automático. Os métodos mais utilizados para a realização dos TSA são:

- Vitek®;
- Vitek-2® (bioMérieux, Hazelwood, MO);
- Walk-Away® (DADE, West Sacramento, CA);
- BD Phoenix®.

Esta técnica permite uma execução eficaz e rápida, visto que os equipamentos possibilitam sistemas de detecção óticas, capazes de detetar alterações discretas no crescimento bacteriano. Também é possível juntar num só relatório, os resultados dos TSA com a identificação do Gram das bactérias, em simultâneo. Os resultados obtidos desta técnica são semi-quantitativos, por isso, não mudam as informações obtidas pelos métodos de TSA com resultados quantitativos [27].

As principais vantagens desta técnica são as seguintes:

- Emissão mais rápida dos resultados;
- Padronização intralaboratorial e interlaboratorial;
- Disponibilidade de programas de computador (software) adicionais para facilitar a emissão dos relatórios e redução do trabalho manual.

O TSA por difusão por disco consiste em colocação de antibióticos em forma de disco, numa placa de Petri com meio de cultura, após aplicado inóculo bacteriano com $1E+08$ a $2E+08$ UFC/mL. Os discos com antibióticos têm uma concentração fixa e são comerciais. Uma placa de Petri com diâmetro 150 mm consegue ter 12 discos, enquanto uma placa de Petri com 90 mm de diâmetro pode conter 4 a 5 discos (Figura 3.14). As placas ficam incubadas entre 16 a 24 horas à temperatura favorável ao desenvolvimento do microrganismo em teste [27].

O método de difusão por disco foi descrito por Bauer e Kirby em 1966. É o método mais simples e mais confiável para a realização do TSA. Esta técnica fornece um resultado qualitativo em vez de um resultado quantitativo [27].

Para a utilização deste método para TSA, é necessário um controlo de qualidade rigoroso, visto que há imensas variáveis existentes que podem afetar o resultado final do TSA. As possíveis variáveis em causa são as seguintes:

- Preparação do meio de cultura;
- Controlo do pH do meio de cultura;
- Tempo do TSA;

- Temperatura e atmosfera da incubação das placas;
- Concentração do inóculo bacteriano;
- Colocação dos discos com antibióticos;
- Rigor na execução da técnica.

Esta técnica apresenta as seguintes vantagens:

- Facilidade na execução da técnica;
- Reprodutibilidade dos resultados;
- Baixo custo;
- Fácil interpretação dos resultados obtidos;
- Flexibilidade de escolha dos antibióticos em teste;
- Não há exigência de equipamentos próprios/especiais.

Todavia, esta técnica também possui desvantagens:

- Não-padronização do método para combinações entre microrganismos e antibióticos;
- Concentração mínima de inibição não detetada;
- Não adequada para detecção de mecanismos de resistência resultantes da produção de β -lactamases e de outros mecanismos mais complexos.



Figura 3.14 - TSA por método de difusão por disco [27]

Nesta dissertação, o TSA será realizado à bactéria *E. coli*, pertencente às bactérias enterobactérias e a técnica selecionada para a realização do teste foi a difusão por disco [27].

4. Parte Experimental

A recolha de amostras de água residual foi feita nas ETAR no interior de Vila Nova de Gaia, ETAR de Febros e de Lever. A recolha foi efetuada na entrada e na saída do tratamento secundário, ou seja, a montante e jusante dos reatores biológicos das ETAR.

As análises microbiológicas das amostras de água foram executadas no laboratório de Química e Biologia e na unidade de investigação GRAQ, ambos do Instituto Superior de Engenharia do Porto.

4.1 Meios de cultura e biodiscos

A análise microbiológica das amostras de água tem como pressupostos o isolamento, enumeração, caracterização dos microrganismos de interesse para o estudo. Foram selecionados os meios de cultura sólidos e líquidos, com propriedades seletivas, diferenciais ou de enriquecimento para crescimento e desenvolvimento de *E. coli*, que a seguir se descrevem.

4.1.1 Tryptone Bile X-glucuronide (TBX) Agar

O meio de cultura TBX é um meio cromogénico seletivo para deteção da *E. coli* pela enzima β -D-glucuronidase, sendo este meio de cultura aconselhado pela ISO 16649-2 para a deteção da *E. coli* em produtos para consumo humano e animal.

A maioria dos estudos tem demonstrado que entre 94 a 97% de *E. coli* de origem humana ou a partir do ambiente possuem atividade da enzima β -D-glucuronidase.

Seguindo as indicações do fabricante (Frilabo), o meio de cultura foi elaborado e posteriormente autoclavado a 121 °C, durante 15 minutos. Após a autoclavagem, o meio de cultura foi colocado em placas de Petri esterilizadas.

O resultado final foi obtido pela contagem de colónias características, após 24-48h de incubação a 37 °C.

4.1.2 Água peptonada tamponada (APT)

O meio de cultura APT é um meio não seletivo pré-enriquecido utilizado previamente ao isolamento e sementeira de bactérias pertencentes à família

Enterobacteriaceae, como por exemplo *Salmonella* e *E. coli*, antes do isolamento e enriquecimento seletivo. Este meio de cultura é recomendado pela ISO 6579.

Este meio é isento de inibidores e é tamponado, proporcionando condições para a recuperação de células que tenham sido prejudicadas, nomeadamente por processos de preservação da amostra ou técnicas de análise como filtração de membranas.

Este meio de cultura é utilizado para efetuar diluições do meio de cultura Mueller Hinton em estado líquido.

O meio de cultura foi reconstituído de acordo com as indicações do fabricante (Frilabo) e posteriormente autoclavado em tubos a 121°C, durante 15 minutos.

4.1.3 Mueller Hinton (MH) Broth

O meio MH é um meio de cultura utilizado para a realização de testes de suscetibilidade antimicrobiana de microrganismos aeróbios pelo método de diluição em caldo.

Este meio de cultura é utilizado para a execução do teste de sensibilidade a antibióticos, tanto no estado líquido (caldo) como no estado sólido (placas) com a adição de agar suficiente para a solidificação.

Segundo as indicações do fabricante (Frilabo), o meio de cultura foi elaborado e colocado em tubos e posteriormente autoclavado a 121 °C, durante 15 minutos. Após a autoclavagem, o meio de cultura é reservado a baixas temperaturas (4 °C) e depois efetua-se a contaminação com o microrganismo pretendido. O meio de cultura com agar foi colocado em placas de Petri esterilizadas.

4.1.4 Discos de Antibiótico

Os discos de antibiótico são de papel (com características específicas) impregnado com o antibiótico com uma massa definida. Estes discos são utilizados, exclusivamente, para a realização de teste de sensibilidade segundo o método de difusão em disco.

Os discos são colocados no meio de cultura, contaminado com a bactéria em estudo, e posteriormente colocados em incubação à temperatura ótima de crescimento da bactéria. Após a incubação, as placas de Petri são verificadas e os halos obtidos pelos discos são comparados com os halos-padrão de forma a classificar os resultados como resistentes, intermédio e não resistente.

A Tabela 4.1 contém a listagem dos discos utilizados com a sua respetiva massa.

Tabela 4.1 - Listagem de antibióticos com a respetiva massa

Antibiótico	Massa (µg)
Eritromicina (E)	15
Azitromicina (AZM)	15
Claritromicina (CLR)	15
Ofloxacina (OFX)	5
Ciprofloxacina (CIP)	5
Sulfametoxazol (SMX)	50
Trimetoprim (TM)	5
Metronidazol (MTZ)	5/50

Todos os discos com os antibióticos incorporados necessitam de ser conservadas a baixas temperaturas, no máximo 8 °C.

O planeamento semestral e semanal foram efetuados de forma a dar tempo para que ocorra o crescimento microbiano e para a realização dos ensaios necessários (Anexo A). Deste modo o protocolo experimental decorreu inicialmente numa sequência de 5 dias de trabalho, repetida tantas as vezes quanto os dias de colheita. Posteriormente considerou-se necessário acrescentar mais um dia ao protocolo para fazer um re-isolamento, num outro meio de TBX, para garantir que a estirpe em teste provinha de uma unidade formadora de colónia (UFC) típica de *E. coli*.

4.2 Confirmação da presença da bactéria *E. coli*

Teste Presuntivo:

Coloração de Gram:

1. Colocar uma gota de água desionizada no centro da lâmina;
2. Esterilizar a ansa à chama, retirar uma pequena quantidade de colónia bacteriana do meio de cultura sólido e suspender na água;
3. Espalhar a gota na superfície da lâmina numa área aproximada de 1 cm²;
4. Marcar a zona do esfregão com marcador permanente no lado oposto da lâmina;
5. Secar lentamente com o auxílio da chama;

6. Fixar os microrganismos à lâmina com ação do calor, passando 3 vezes na chama.
7. Colocar corante cristal de violeta no esfregaço e aguardar 1 min. Lavar com água da torneira;
8. Colocar corante lugol no esfregaço e aguardar 1 min. Lavar com água da torneira;
9. Colocar álcool a 96% no esfregaço e aguardar 40 min. Lavar com água da torneira;
10. Colocar corante safranina no esfregaço e aguardar 1 min. Lavar com água da torneira;
11. Limpar a lâmina com muito cuidado com um papel de filtro próprio;
12. Observar no microscópio a partir da menor objetiva;
13. Aplique uma gota de óleo de imersão sobre o esfregaço e observe no microscópico (Nikon Eclipsa Ti; Câmera: Nikon Digital Sight) com objetiva de imersão (100 X).

Teste Confirmativo:

Pesquisa de Coliformes Totais e *E. coli* (Método PA)

1. Esterilizar a ansa à chama, retirar uma pequena quantidade de colônia bacteriana do meio de cultura sólido;
2. Adicione o material biológico ao meio de cultura Fluorocult LMX broth e colocar a incubar a $36 \pm 1^\circ\text{C}$, durante 24 horas;
3. Examinar a cor do meio de cultura;
4. Verificar a exibição de fluorescência, usando uma lâmpada apropriada;
5. Após a observação da presença de fluorescência, adicionar algumas gotas do Reagente de Kovacs.
6. Verificação dos resultados de acordo com a Tabela 4.2.

Tabela 4.2 - Leitura dos resultados do teste confirmativo

	Cor azul-esverdeada do meio de cultura	Fluorescência	Indol
Coliformes Totais	+	-	-
<i>E. coli</i>	+	+	+

Nota: Caso haja aparecimento de cor vermelho-cereja/rosa no sobrenadante do meio de cultura, alguns minutos após a adição do reagente de Kovacs, significa que a bactéria é Indol (+); Caso haja aparecimento de uma cor ligeiramente amarelada, significa que a bactéria é Indol (-).

4.3 Planeamento laboral:

4.3.1 Etapa 1 – Amostragem e Preparação:

- Recolha das amostras com frascos previamente esterilizados na autoclave;
- Elaboração dos meios de cultura segundo as indicações do fornecedor;
- Análise das amostras de água das ETAR (Figura 4.1) pelo método das membranas filtrantes (membranas de filtração estéreis em éster de celulose, poro 0.45 µm, diâmetro 47 mm)
- Crescimento bacteriano em meio de cultura TBX (24-48h)



Figura 4.1 - Amostras de uma ETAR: 1 - Afluente; 2 - Efluente

4.3.2 Etapa 2 - Isolamento:

- Isolamento da *E. coli* em placas de Petri com meio de cultura TBX (Figura 4.2) (24h-48h).



Figura 4.2 - Elaboração de um isolamento de um microrganismo [28]

4.3.3 Etapa 3 – Crescimento Bacteriano:

- Crescimento da *E. coli* em tubos de ensaio no meio de cultura Muller Hinton com 2/3 colónias de *E. coli* isolada (18-24h).



Figura 4.3 - Crescimento de *E. coli* em tubos de ensaios após inoculação a 37 °C

4.3.4 Etapa 4 - Antibiograma:

- Verificação da concentração de *E. coli* através da medição de turbidez nos ensaios (medição da Absorvância a 600 nm num espectrofotômetro UV/Vis (Shimadzu, 160A) a qual deve apresentar um valor de $0,5 \pm 0,1$ na Escala McFarland;
- Realização do antibiograma com discos com antibióticos em meio de cultura Muller Hinton Agar (18-24h).

4.3.5 Etapa 5 – Recolha de Resultados:

- Recolha de dados experimentais, medição do diâmetro do halo com um paquímetro;
- Análise dos dados experimentais.



Figura 4.4 - Recolha de resultados com o paquímetro

A recolha das amostras nas ETAR foi efetuada por volta das 9h da manhã, com a ajuda dos operários presentes nas instalações. Ao longo do estudo, a amostragem manteve constante em maioria das situações. Na ETAR de Lever, só houve ligação das lâmpadas UV a partir do mês de Maio.

5. Resultados e Discussão

5.1 Curva de calibração e testes bioquímicos

Para a elaboração dos TSA, é necessário as bactérias estarem em fase de crescimento exponencial em meio de cultura líquido e atingir o valor 0,5 na Escala de McFarland. Foram realizados ensaios experimentais para a preparação da curva de calibração para quantificar o crescimento bacteriano, relacionando a turvação medida na Escala de McFarland com a Absorvância a 600 nm. A respectiva curva de calibração está na Figura 5.1.

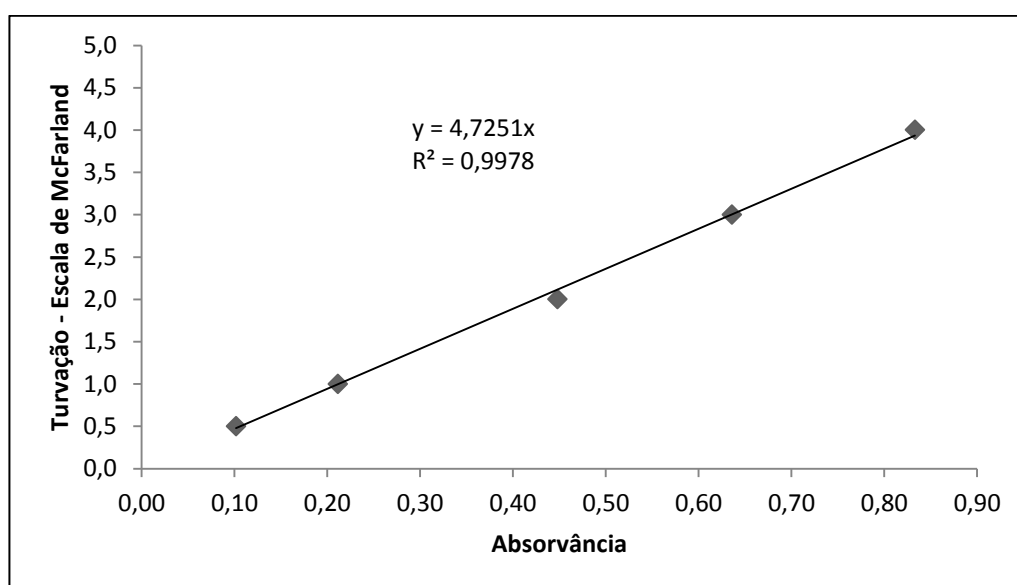


Figura 5.1 - Calibração do equipamento UV em utilização

Os valores usados para a elaboração da curva de calibração encontram-se no Anexo B. Como os valores de absorvância só são credíveis entre o 0 e 1, só representamos a escala de McFarland entre o valor 0 e 4 na Figura 5.1.

Para obter a turvação desejada, 0,5 na escala de McFarland tal como descrito, deve-se atingir uma absorvância com o valor aproximado a 0,1.

Conforme os objetivos definidos para a realização da dissertação, a próxima figura representa a eficácia das lâmpadas de UV instaladas na ETAR de Lever. A percentagem de eficiência das lâmpadas é calculada pela diferença de número de UFC nas amostras recolhidas antes e depois da instalação das lâmpadas de UV, normalizada pelo valor obtido antes da desinfecção e multiplicando por 100. A eficiência (%) foi analisada entre o dia 25 de Maio até ao dia 22 de Junho, semanalmente.

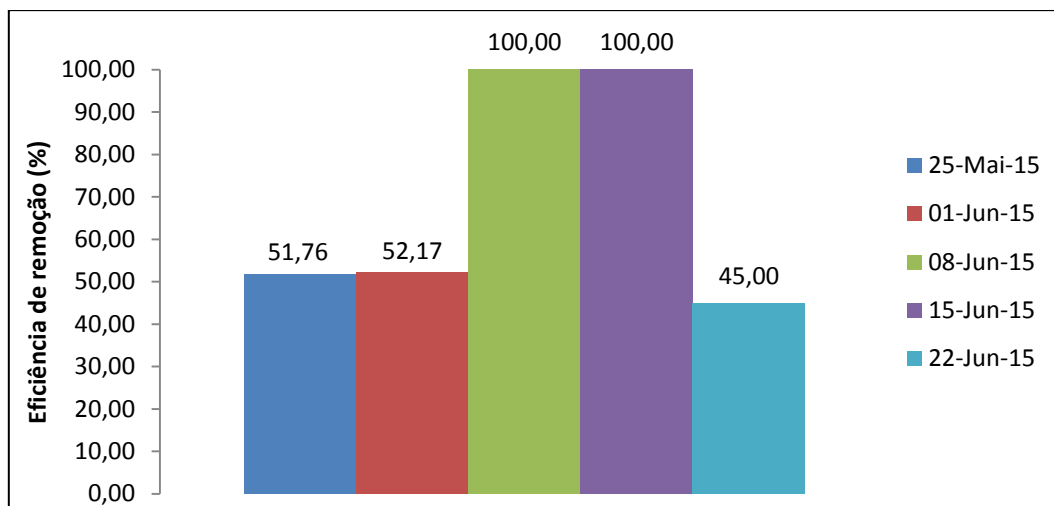


Figura 5.2 – Eficiência de remoção (%) das lâmpadas UV na ETAR de Lever

Após uma análise à Figura 5.2, verifica-se que a eficiência das lâmpadas foi ótima, nos dias 8 e 15 de Junho. No entanto, verificaram-se valores bastante inferiores de eficiência de remoção nos dias 25 de Maio, 1 de Junho e no dia 22 de Junho, o que foi atribuído a avaria em algumas lâmpadas/necessidade de limpeza das mesmas. De qualquer forma, uma vez que este parâmetro não faz parte da licença de descarga da ETAR de Lever, os valores obtidos não são considerados problemáticos.

Foi avaliada a resistência da bactéria *E. coli* a diversos antibióticos selecionados. Esta investigação foi efetuada entre o dia 23 de Março e o dia 15 de Junho na ETAR de Febras e entre o dia 10 de Abril e o dia 15 de Junho na ETAR de Lever. Este estudo foi executado semanalmente.

Para o isolamento da bactéria utiliza-se o meio de cultura TBX, que um meio adequado para enterobactérias. Segundo a ficha técnica do meio de cultura, as colónias da bactéria *E. coli*, adquirem uma tonalidade azul/verde durante o seu crescimento [29]. Para ter a certeza do isolamento da bactéria *E. coli*, foi necessário a realização de testes presuntivos e confirmativos da sua presença. As Figuras 5.3 - 5.5 demonstram os resultados dos testes executados.

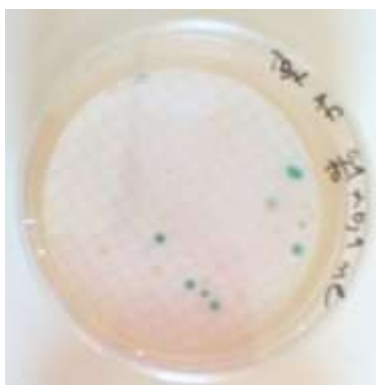


Figura 5.3 - Teste Presuntivo: Crescimento da bactéria em meio de cultura TBX.

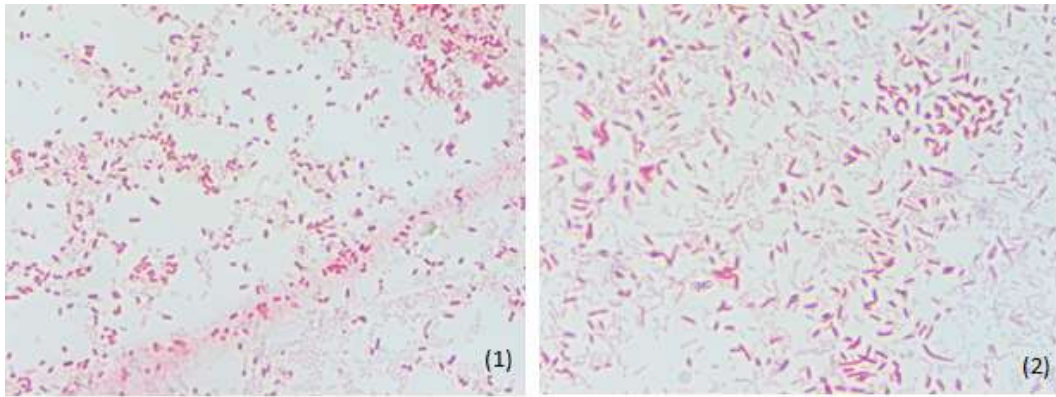


Figura 5.4 - Teste Presuntivo: Visualização das bactérias no microscópio ótico após coloração de Gram: 1 – Bactéria de coloração verde no TBX; 2 – bactéria de coloração branca no TBX.

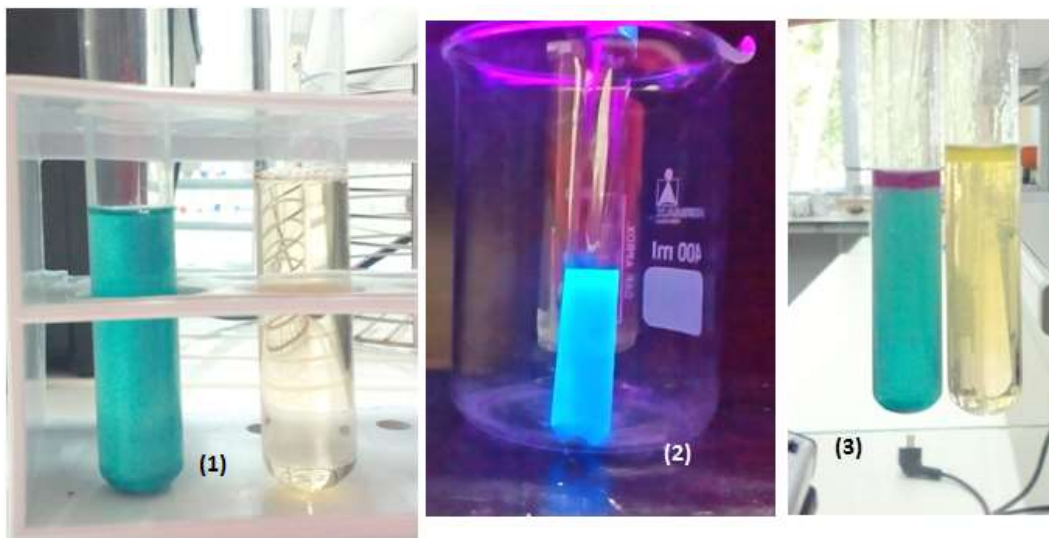


Figura 5.5 - Testes confirmativos:

- 1 - Crescimento da bactéria em meio de cultura Fluorocult (*E. coli* presente na tonalidade azul);
- 2 – Obtenção de fluorescência (*E. coli* presente na emissão de fluorescência);
- 3 – Obtenção do anel com adição de reagente Kovacs (*E. coli* presente em Indol (+)).

5.2 Resultados de TSA referentes à ETAR de Febros

Na tabela seguinte, Tabela 5.1, baseada nos resultados experimentais obtidos na ETAR de Febros. Os exemplos de cálculo para a elaboração dos resultados experimentais encontram-se no Anexo C. Os resultados experimentais, com os respectivos desvios padrão encontram-se no Anexo D. No Anexo E, apresenta-se um exemplo dos antibiogramas realizados.

A Figura 5.6 demonstra a variação dos diâmetros dos halos de inibição, em milímetros, entre o afluente e o efluente da ETAR de Febros, para cada antibiótico. O antibiótico MTZ como teve halos nulos, não está contido na figura referida.

Tabela 5.1 - Média dos diâmetros dos halos de inibição obtidos com estirpes de *E. coli* isoladas no afluente e efluente da ETAR de Febros

Data	Diâmetro do Halo (mm)																							
	23 de Março		7 de Abril		10 de Abril		20 de Abril		27 de Abril		4 de Maio		11 de Maio		18 de Maio		25 de Maio		1 de Junho		8 de Junho		15 de Junho	
Tipo de amostra	Af.	Ef.	Af.	Ef.	Af.	Ef.	Af.	Ef.	Af.	Ef.	Af.	Ef.	Af.	Ef.	Af.	Ef.	Af.	Ef.	Af.	Ef.	Af.	Ef.	Af.	Ef.
Eritromicina (15)	17,58	17,51	15,44	10,54	15,84	16,52	16,01	10,66	15,00	0,00	12,65	16,74	12,20	18,15	11,87	10,95	20,77	15,83	14,74	12,23	13,98	16,59	14,12	12,12
Azitromicina (15)	28,44	28,51	28,06	23,94	28,48	31,24	28,06	27,62	29,49	18,40	26,30	30,89	29,18	32,34	22,70	30,89	31,90	24,80	27,14	20,20	28,14	32,16	25,42	24,15
Claritromicina (15)	19,44	18,51	19,32	10,76	16,67	15,82	17,13	0,00	16,17	0,00	13,05	17,19	14,70	21,36	12,56	12,04	18,47	16,36	14,90	13,28	14,12	21,51	11,62	13,39
Ofloxacina (5)	28,84	11,38	9,54	14,73	29,24	23,76	28,41	28,14	0,00	7,34	28,42	27,62	31,18	33,51	24,24	28,25	32,09	29,28	27,56	27,08	30,17	32,92	28,57	26,72
Ciprofloxacina (5)	34,78	13,04	12,26	22,28	36,99	33,14	33,76	36,09	9,54	12,28	33,20	31,94	32,59	38,58	29,36	30,50	36,68	33,22	35,34	29,46	35,43	40,88	31,32	29,31
Sulfametoxazol (50)	21,44	21,98	0,00	0,00	23,01	0,00	18,82	0,00	0,00	0,00	24,24	23,19	20,40	25,12	0,00	24,82	0,00	20,66	19,79	22,28	0,00	0,00	16,18	21,46
Trimetoprim (5)	23,51	25,64	0,00	0,00	23,86	0,00	22,45	0,00	22,26	0,00	21,10	20,02	24,43	26,38	0,00	24,33	24,70	21,94	17,53	20,16	0,00	24,71	17,46	23,16
Metronidazol (5)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Metronidazol (50)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Legenda: Af. – afluente; Ef. – efluente.

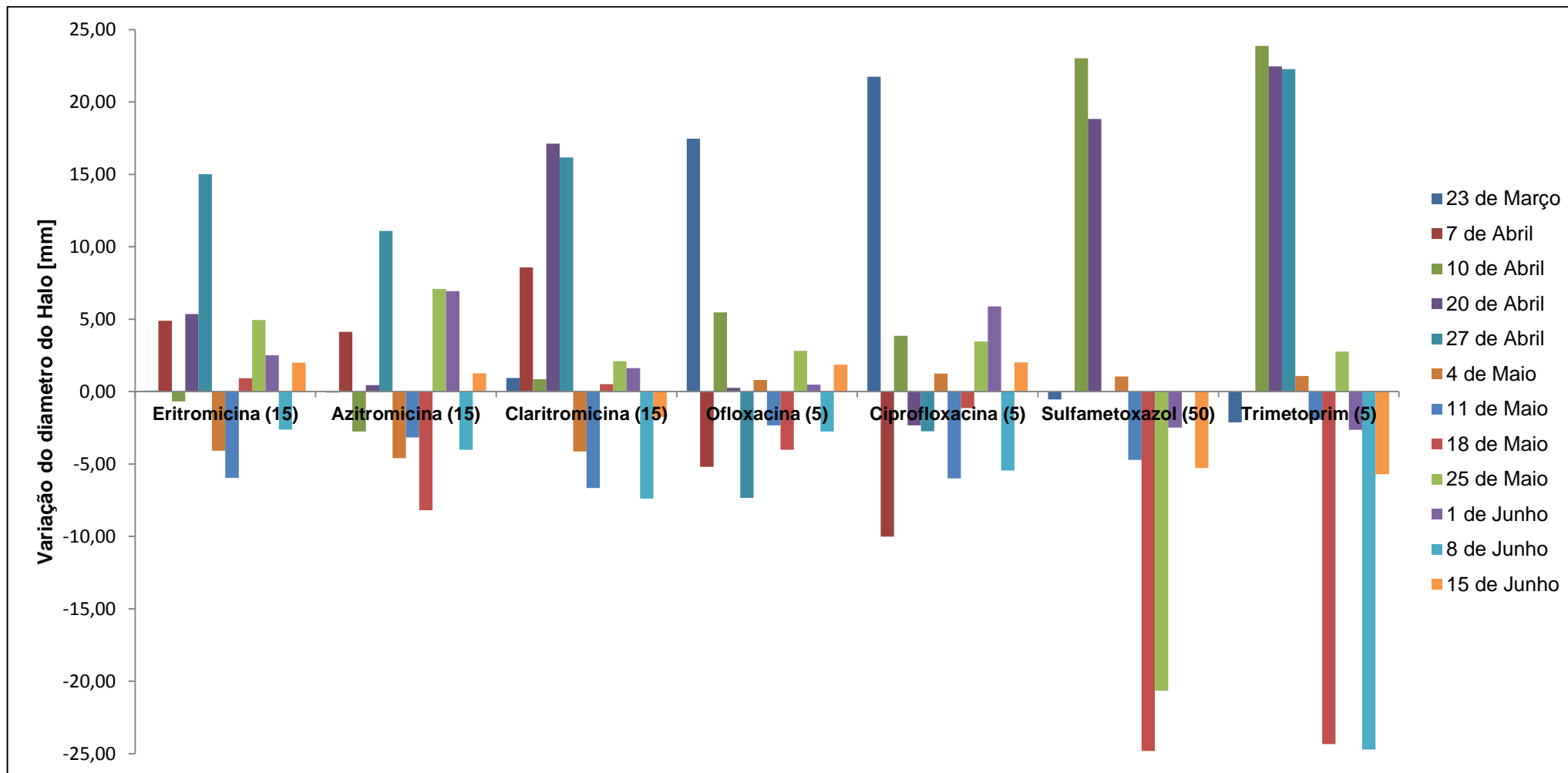


Figura 5.6 - Variação dos diâmetros dos halos em milímetros para cada antibiótico conforme a data de execução do ensaio na ETAR de Febros

De acordo com os estudos realizados em Portugal, estes mesmos antibióticos são encontrados em maior quantidade em ETAR hospitalares [17, 30, 31], estando também presentes em ETAR domésticas. Esta situação necessita de uma atenção especial, porque a sua presença nas ETAR pode contribuir para a seleção e propagação de bactérias resistentes a fármacos.

Após uma análise à Tabela 5.1 e à Figura 5.6, na ETAR de Febros, verifica-se que há variações significativas, da resistência da bactéria *E. coli* aos antibióticos ao longo deste estudo. As ocorrências destas variações podem ser atribuídas à pressão seletiva causada pela presença de antibióticos nas águas residuais.

Para uma melhor compreensão vai ser feita uma análise mais específica, para cada antibiótico, daí as próximas figuras, Figuras 5.7 – 5.13, apresentam os valores do diâmetro do halo no afluente e no efluente para cada dia de ensaio, respetivamente para cada um dos antibióticos estudados.

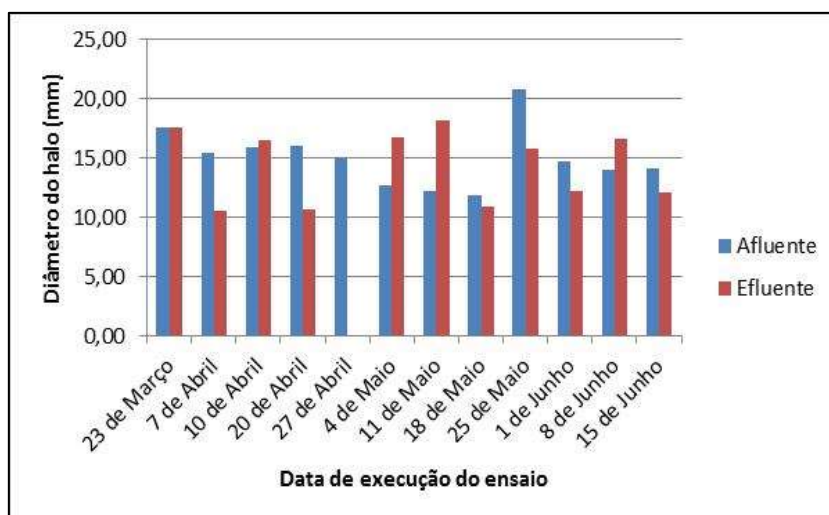


Figura 5.7 - Diâmetro dos halos da *E. coli* no Afluente e Efluente da ETAR de Febros para o antibiótico Eritromicina

Para o antibiótico Eritromicina (Figura 5.7), a variação no dia 27 de Abril é a mais significativa, ocorrendo um aumento da resistência da bactéria, observando-se a inexistência de qualquer halo de inibição de crescimento da *E. coli* isolada no efluente. Em contrapartida nos dias 4 e 11 de Maio observam-se os maiores aumentos dos halos, isto é, diminuição de resistência da *E. coli* presente nos efluentes. Em 50% dos dias avaliados verificou-se um aumento da resistência da *E. coli* à saída da ETAR.

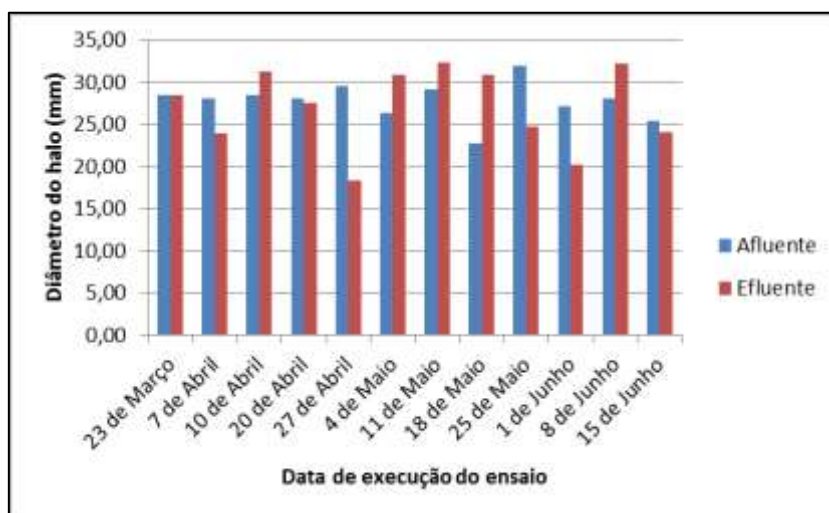


Figura 5.8 - Diâmetro dos halos da *E.coli* no Afluente e Efluente da ETAR de Febros para o antibiótico Azitromicina

Para o antibiótico Azitromicina (Figura 5.8), os halos são maiores do que no caso da Eritromicina consequentemente os efeitos relativos verificados consideram-se menos significativos (Figura 5.6). À semelhança da Eritromicina verifica-se um aumento de resistência em 50% dos dias analisados, observando-se a 27 de Abril o aumento mais significativo de resistência da *E. coli* e no dia 18 de Maio verifica-se a maior diminuição da resistência.

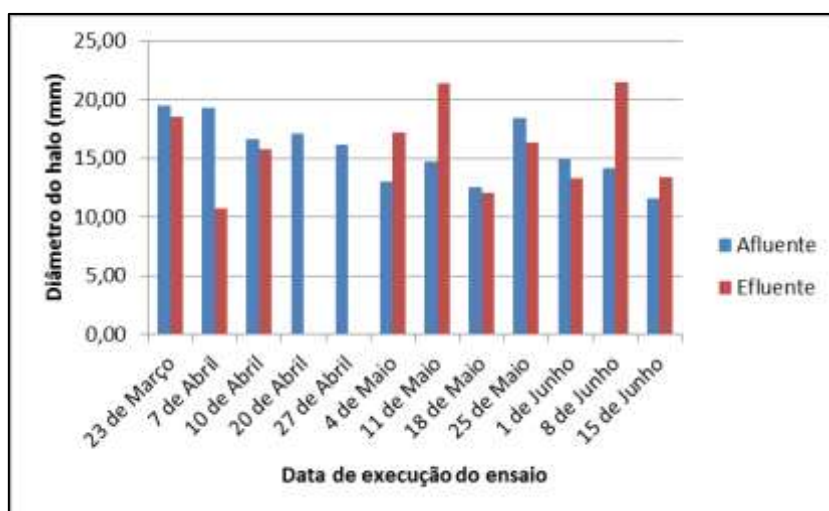


Figura 5.9 - Diâmetro dos halos da *E.coli* no Afluente e Efluente da ETAR de Febros para o antibiótico Claritromicina

Para o antibiótico Claritromicina (Figura 5.9), identificaram-se 67% de situações de aumento da resistência, tendo as variações mais significativas ocorrido nos dias 20 e 27 de Abril, havendo um aumento de resistência da bactéria *E. coli* ao antibiótico com um halo inexistente, no caso da *E. coli* presente nos efluentes destes dias. Por outro lado, tal como com os antibióticos anteriores, observou-se um aumento da sensibilidade em alguns dias, sendo os mais significativos os dias 11 de Maio e 8 de Junho. Considerando que o antibiótico Claritromicina é o prescrito com maior frequência para infeções do trato respiratório, é

interessante verificar as situações de resistência máxima coincidem com possíveis aumentos do seu consumo.

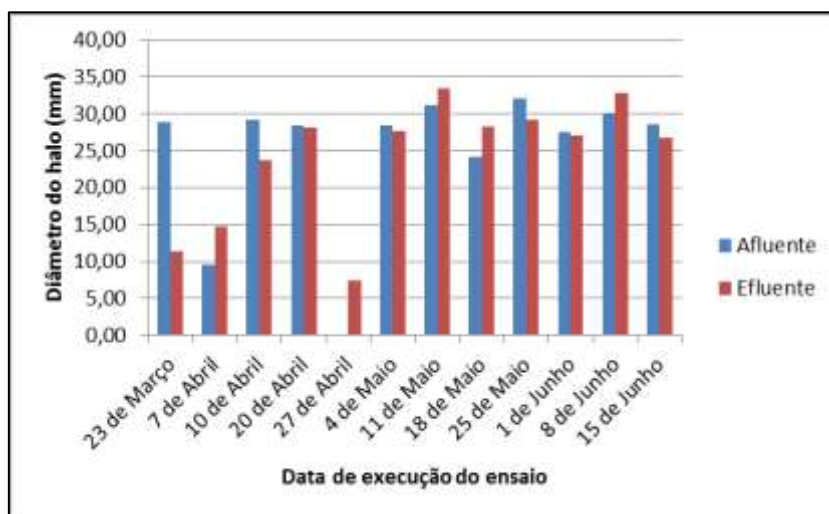


Figura 5.10 - Diâmetro dos halos da *E. coli* no Afluente e Efluente da ETAR de Febros para o antibiótico Ofloxacina

Para o antibiótico Ofloxacina (Figura 5.10), observam-se halos maiores como no caso da Azitromicina e apenas em 33% das situações foi identificado um aumento da resistência a este fármaco, sendo o caso mais significativo identificado a 23 de Março. Destaca-se a variação mais significativa no sentido da redução da resistência no dia 27 de Abril, com resistência máxima verificada para a *E. coli* presente no afluente, fenómeno inverso ao verificado nos antibióticos anteriores.

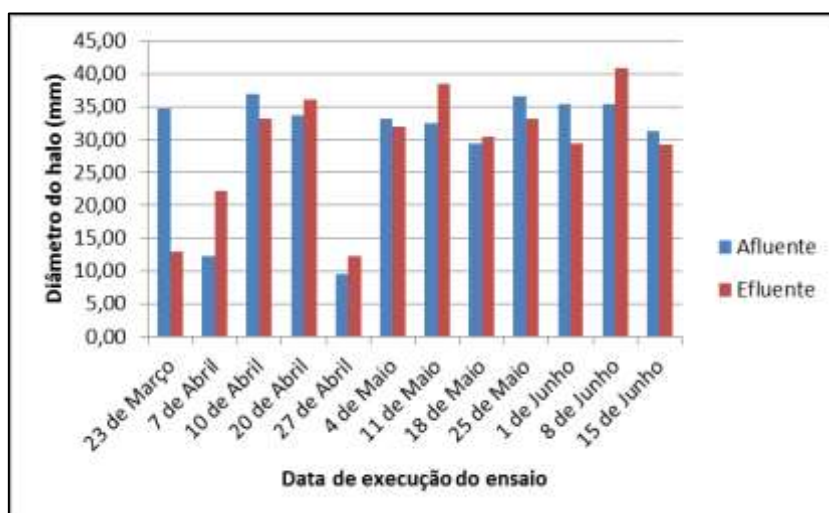


Figura 5.11 - Diâmetro dos halos da *E. coli* no Afluente e Efluente da ETAR de Febros para o antibiótico Ciprofloxacina

Para o antibiótico Ciprofloxacina (Figura 5.11), observam-se também halos de maiores dimensões e apenas em 42% das situações foi identificado um aumento da resistência da *E. coli*, correspondendo o caso mais extremo ao dia 23 de Março, tal como na Ofloxacina. O tratamento da ETAR não provocou

variações muito significativas no nível de resistência da bactéria, ou verificou-se uma diminuição da resistência nos restantes casos, sendo a mais significativa no dia 7 de Abril.

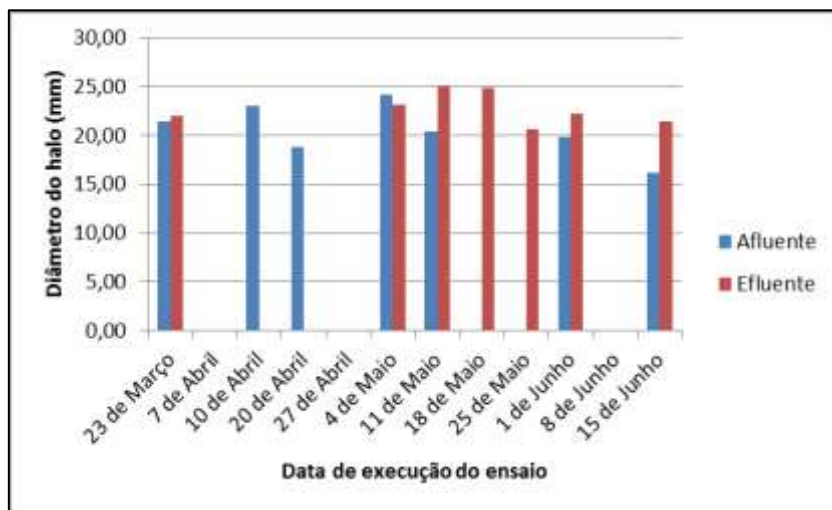


Figura 5.12 - Diâmetro dos halos da *E.coli* no Afluente e Efluente da ETAR de Febros para o antibiótico Sulfametoxazol

Para o antibiótico Sulfametoxazol (Figura 5.12), ocorreram várias variações significativas, com efeitos diferentes. As situações mais graves correspondem aos dias 10 e 20 de Abril, em que ocorreu um aumento extremo de resistência, e aos dias 7 e 27 de Abril e 8 de Junho em que se verificou resistência máxima (halo nulo) a este fármaco (inalterada pela passagem na ETAR). Contrariamente, nos dias 18 e 25 de maio identificou-se uma diminuição extrema de resistência da bactéria ao antibiótico Sulfametoxazol, já que a *E. coli* presente no afluente apresentava resistência máxima ao antibiótico. De facto, de acordo com o observado na Figura 5.6 associam-se a este antibiótico as situações de variação de resistência mais extremas e preocupantes devido aos halos nulos correspondentes a resistência máxima identificados em muitas amostras (42%).

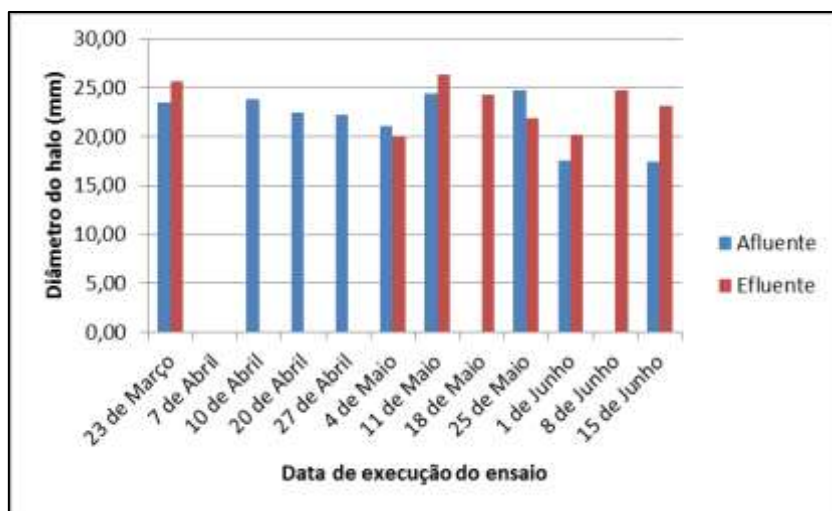


Figura 5.13 - Diâmetro dos halos da *E.coli* no Afluente e Efluente da ETAR de Febros para o antibiótico Trimetoprim

Para o antibiótico Trimetoprim (Figura 5.13) verifica-se um comportamento semelhante ao antibiótico Sulfametoxazol, o que pode ser explicado devido à sua utilização em conjunto. Identificam-se situações extremas de aumento de resistência ao antibiótico nos dias 10, 20 e 27 de Abril. Observa-se uma situação de resistência máxima no dia 7 de Abril, inalterada pela passagem na ETAR, e uma diminuição drástica da mesma no dia 8 de Junho. Tal como o Sulfametoxazol, associam-se a este antibiótico as situações de variação de resistência mais extremas e preocupantes pela resistência máxima (halos nulos) identificados em várias amostras (29%).

A Claritromicina, o Trimetoprim e Sulfametoxazol são antibióticos prescritos para infeções respiratórias tendo-se verificado (relativamente ao período estudado na ETAR de Febros) um aumento de resistência para estes três antibióticos num espaço temporal associado a estes problemas de saúde. O mês mais crítico, com maior número de ocorrências de halo nulo, foi o mês de Abril, nomeadamente no dia 27 de Abril. As situações mais críticas observadas na ETAR de Febros foram detetadas para estes fármacos, principalmente para o Sulfametoxazol e o Trimetoprim.

Para o antibiótico Metronidazol todos os halos foram nulos ao longo do estudo porque este mesmo antibiótico tem características antifúngicas e antiparasitárias sendo esperada uma capacidade reduzida para evitar o crescimento da *E. coli*.

A comparação dos halos experimentais com os halos-padrão para a obtenção de uma classificação de resistência não foi efectuada devido à inexistência de dados para os antibióticos em estudo pela bactéria *E. coli*.

5.3 Resultados de TSA referentes à ETAR de Lever

A tabela seguinte, Tabela 5.2, contém os resultados experimentais obtidos através da média dos diâmetros dos halos de inibição obtidos nos ensaios realizados na ETAR de Lever. Os exemplos de cálculo para a elaboração dos resultados experimentais encontram-se no Anexo C. Os dados práticos para obtenção dos resultados experimentais, com os respetivos desvios padrão encontram-se no Anexo F. No anexo E, está um exemplo dos antibiogramas realizados.

A Figura 5.14 demonstra a variação dos diâmetros dos halos de inibição, em milímetros, entre o afluente e o efluente da ETAR de Lever, para cada antibiótico. O antibiótico MTZ como tem sempre halos nulos, não está contido na figura referida.

Tabela 5.2 - Média dos diâmetros dos halos de inibição obtidos com estirpes de *E. coli* isoladas no afluente e efluente da ETAR de Lever

	Diâmetro do Halo (mm)																					
	Data		10 de Abril		20 de Abril		27 de Abril		4 de Maio		11 de Maio		18 de Maio		25 de Maio		1 de Junho		8 de Junho		15 de Junho	
	Tipo de amostra	Af.	Ef.	Af.	Ef.	Af.	Ef.	Af.	Ef.	Af.	Ef.	Af.	Ef.	Af.	Ef.	Af.	Ef.	Af.	Ef.	Af.	Ef.	
Antibiótico (massa em µg)	Eritromicina (15)	11,40	10,07	7,84	7,81	7,13	6,87	12,92	14,03	0,00	14,11	13,48	10,25	17,28	12,63	13,35	16,63	16,12	17,67	13,64	12,80	
	Azitromicina (15)	21,69	21,54	22,90	24,03	22,78	22,35	27,60	28,18	10,51	25,54	25,52	30,20	28,43	28,79	27,47	27,24	26,47	30,20	24,70	25,40	
	Clarithromicina (15)	11,48	11,80	10,95	0,00	8,80	7,95	12,68	13,82	0,00	14,88	14,32	12,87	15,18	13,22	16,78	16,58	17,09	18,05	14,84	14,12	
	Ofloxacina (5)	27,87	22,54	13,72	30,91	23,25	22,66	30,69	29,43	32,30	23,17	19,87	7,54	31,36	22,46	30,89	30,46	28,04	28,48	26,48	27,07	
	Ciprofloxacina (5)	33,05	28,57	18,83	30,00	31,12	29,32	35,28	35,57	36,87	31,40	28,05	10,00	37,38	31,26	38,76	35,84	31,20	36,15	33,05	24,53	
	Sulfametoxazol (50)	14,60	0,00	0,00	17,93	16,93	13,06	19,96	20,56	0,00	24,44	20,00	22,64	22,85	22,11	22,56	22,94	18,04	21,27	18,15	16,00	
	Trimetoprim (5)	15,99	0,00	0,00	19,83	15,46	14,40	21,61	23,87	0,00	21,58	21,18	18,57	25,98	21,83	25,30	21,79	22,86	21,60	21,10	18,32	
	Metronidazol (5)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Metronidazol (50)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Legenda: Af. – afluente; Ef. – efluente.

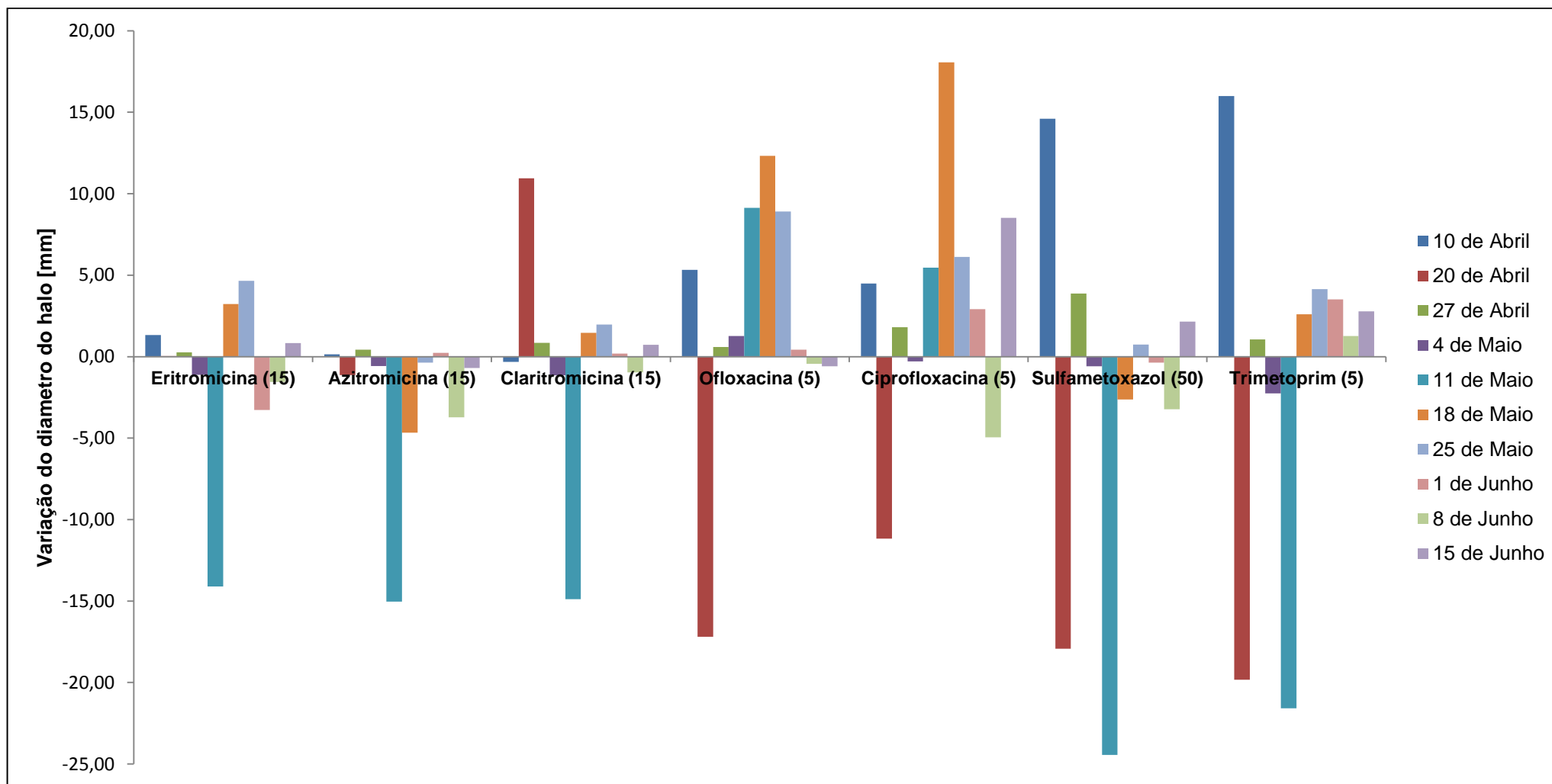


Figura 5.14 - Variação dos diâmetros dos halos em milímetros para cada antibiótico conforme a data de execução do ensaio para a ETAR de Lever

Após uma análise à Tabela 5.2 e à Figura 5.14, na ETAR de Lever verifica-se que há variações positivas e negativas significativas, variando o nível de resistência da bactéria *E. coli* aos antibióticos. As ocorrências destas variações podem estar relacionadas com a presença de antibióticos nas águas residuais domésticas.

Vai ser apresentada uma análise individual, para cada antibiótico, nas Figuras 5.15 – 5.21, em que se apresentam os valores do diâmetro do halo no afluente e no efluente para cada dia de ensaio, respetivamente para cada um dos antibióticos estudados.

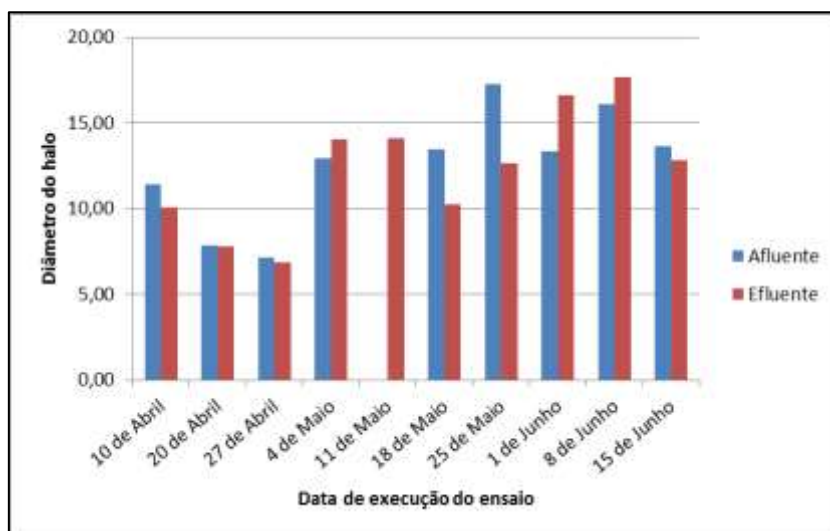


Figura 5.15 - Diâmetro dos halos da *E. coli* no Afluente e Efluente da ETAR de Lever para o antibiótico Eritromicina

Para o antibiótico Eritromicina (Figura 5.15), a variação no dia 11 de Maio é a mais significativa, ocorrendo uma perda da resistência da bactéria *E. coli* isolada no efluente, que apresentava resistência máxima (halo nulo) à entrada do tratamento. Nos dias 1 e 8 de Junho também houve um aumento da sensibilidade. Todavia, nos dias 18 e 25 de Maio observa-se uma redução dos halos, isto é, acréscimo de resistência nos efluentes. Só em 50% dos dias avaliados foi verificado um aumento da resistência da *E. coli* à saída da ETAR.

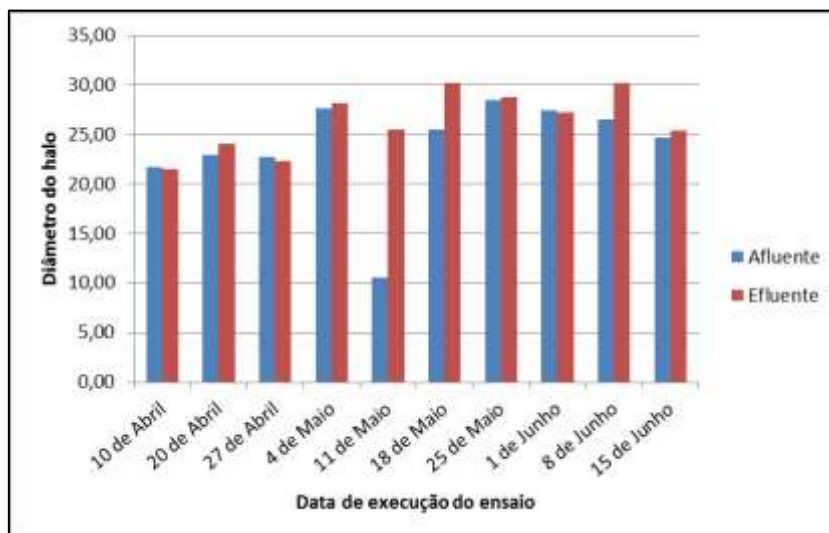


Figura 5.16 - Diâmetro dos halos da *E. coli* no Afluente e Efluente da ETAR de Lever para o antibiótico Azitromicina

Para o antibiótico Azitromicina (Figura 5.16), a variação mais significativa foi no 11 de Maio havendo uma diminuição da resistência da bactéria, como ocorreu no antibiótico Eritromicina. Para este antibiótico, os diâmetros dos halos foram superiores aos diâmetros do antibiótico Eritromicina. O perfil de variação destes dois antibióticos revelou-se no entanto similar (Figura 5.14). Nos dias 18 de Maio e 8 de Junho também houve uma subida da sensibilidade. Nos restantes dias, as mudanças não foram muitas significativas. Considerando que o antibiótico Azitromicina é prescrito para doenças do trato respiratório como bronquite e pneumonia, a diminuição do diâmetro do halo inibição, ou seja, o aumento da resistência poderá estar coincidente com a época do ano em que as referidas doenças são mais frequentes.

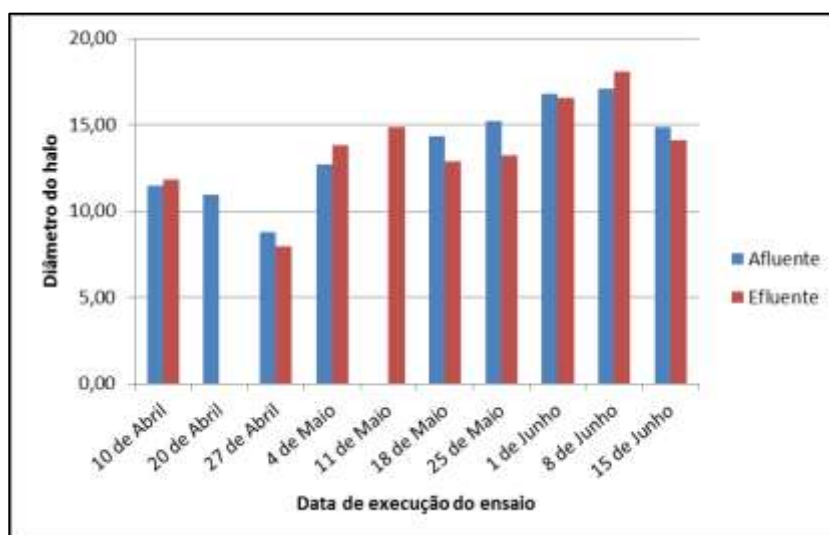


Figura 5.17 - Diâmetro dos halos da *E. coli* no Afluente e Efluente da ETAR de Lever para o antibiótico Claritromicina

Para o antibiótico Claritromicina (Figura 5.17), as variações mais significativas aconteceram nos dias 20 de Abril (aumento da resistência) e 11 de Maio (redução da resistência), tendo sido identificados halos nulos (10%) nestas situações. Foram detetados 50% de casos de diminuição de sensibilidade na

ETAR. Considerando que o antibiótico Claritromicina é prescrito com frequência para infecções do trato respiratório, a diminuição do halo, isto é, o aumento da resistência poderá estar relacionado com um aumento destas referidas infecções.

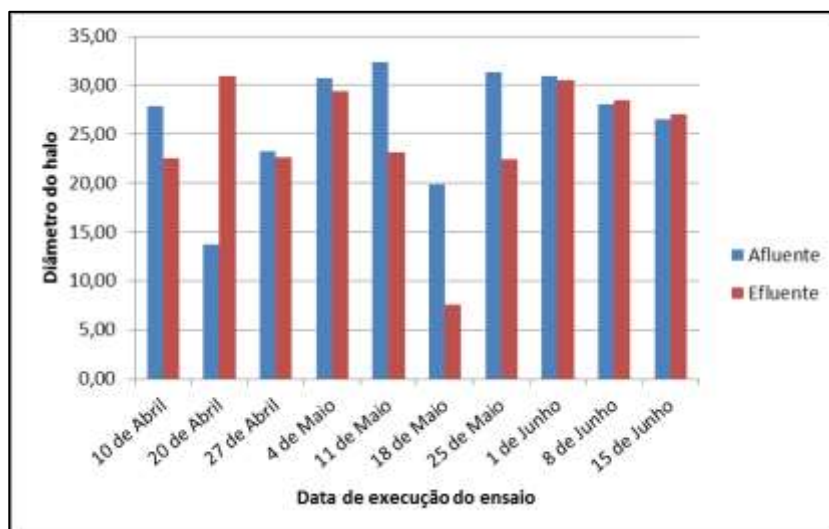


Figura 5.18 - Diâmetro dos halos da *E.coli* no Afluente e Efluente da ETAR de Lever para o antibiótico Ofloxacina

Para o antibiótico Ofloxacina (Figura 5.18), as variações mais significativas aconteceram nos dias 20 de Abril (aumento da sensibilidade) e 11, 18 e 25 de Maio (aumento da resistência). Em 40% das situações foi identificado um aumento da resistência a este fármaco. Para este antibiótico, os diâmetros dos halos foram superiores à dos outros antibióticos estudados, e equivalentes aos verificados para o antibiótico Azitromicina.

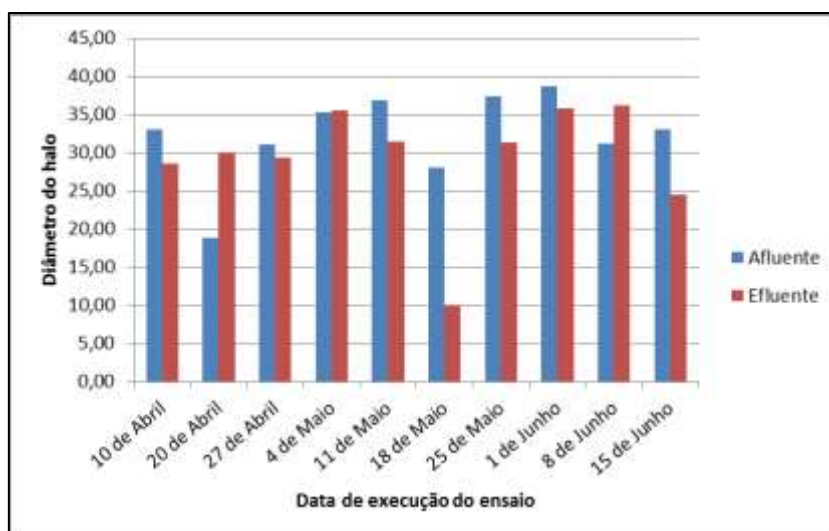


Figura 5.19 - Diâmetro dos halos da *E.coli* no Afluente e Efluente da ETAR de Lever para o antibiótico Ciprofloxacina

Para o antibiótico Ciprofloxacina (Figura 5.19), à semelhança do antibiótico Ofloxacina, as mudanças dos valores de diâmetros dos halos são significativas nos dias 20 de Abril (redução de resistência) e 18 de Maio (aumento da resistência). Para este antibiótico, os diâmetros dos halos foram

superiores à dos outros antibióticos estudados. Existem 50% de situações de aumento da resistência na ETAR com este fármaco.

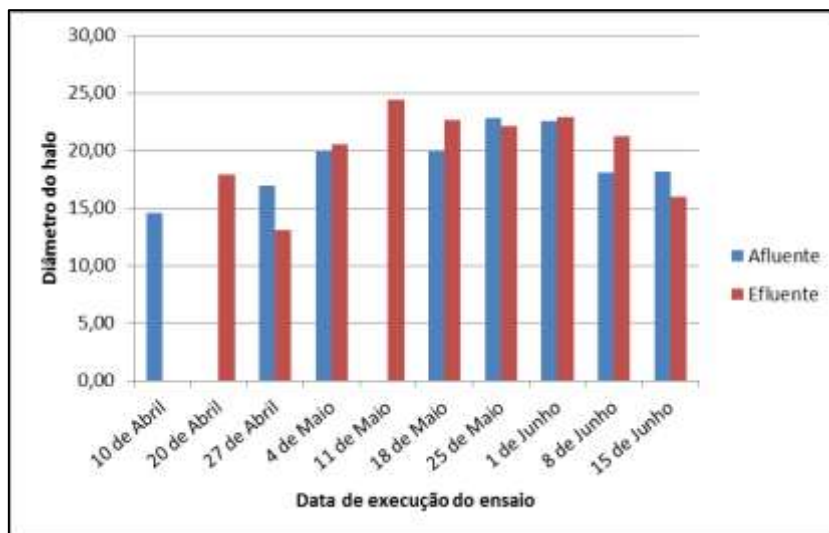


Figura 5.20 - Diâmetro dos halos da *E.coli* no Afluente e Efluente da ETAR de Lever para o antibiótico Sulfametoxazol

Para o antibiótico Sulfametoxazol (Figura 5.20), houve algumas variações significativas no dia 10 de Abril (aumento de resistência) e 20 de Abril e 11 de Maio (aumento da sensibilidade), havendo halos nulos em 15% das situações. Só apenas 30% dos dias testados houve aumento de resistência.

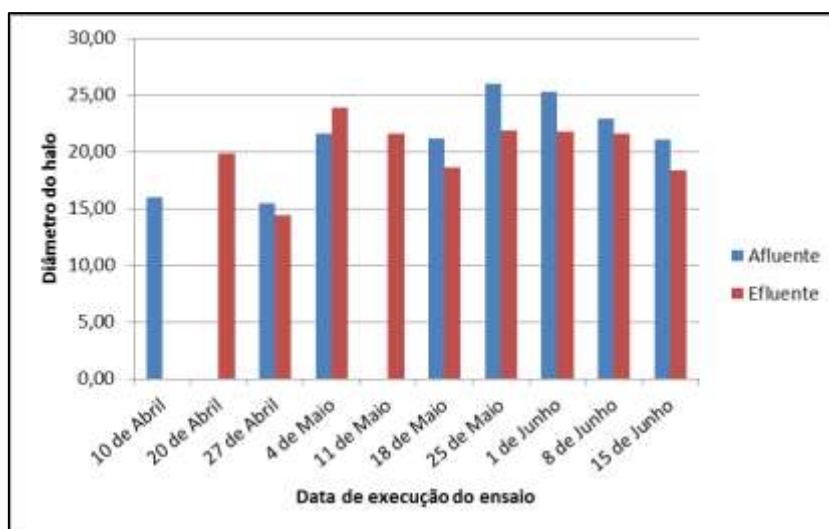


Figura 5.21 - Diâmetro dos halos da *E.coli* no Afluente e Efluente da ETAR de Lever para o antibiótico Trimetoprim

Para o antibiótico Trimetoprim (Figura 5.21) verificaram-se alterações semelhantes ao antibiótico Sulfametoxazol, devido à sua utilização em conjunto. Tal como o antibiótico Sulfametoxazol, as variações mais significativas foram no dia 10 de Abril (aumento drástico de resistência) e nos dias 20 de Abril e 11 de Maio (diminuição drástica de resistência), tendo-se identificado 15% de situações de resistência máxima. Neste fármaco, 50% dos casos de análise ocorreu aumento de resistência por parte da bactéria *E.coli*.

Para o antibiótico Metronidazol foram obtidos halos nulos em todo o estudo, uma vez que este antibiótico tem características antifúngicas e antiparasitárias, a que corresponde a uma capacidade reduzida de eliminar a *E. coli*.

Sinteticamente, a ETAR de Lever teve uma evolução um pouco diferente da ETAR de Febros. A época em que se identificaram mais situações críticas foi entre final do mês de Abril e meados do mês de Maio.

No período estudado, as situações mais críticas observadas na ETAR de Lever foram detetadas para os fármacos Claritromicina, o Trimetoprim e Sulfametoxazol, principalmente os dois últimos. Estes antibióticos são prescritos para infeções respiratórias, podendo as situações de resistência máxima corresponder ao período de maior consumo destes fármacos.

A classificação de resistência da bactéria *E. coli* face aos antibióticos estudados não foi possível ter acesso aos valores padrão para a realização da comparação com os resultados experimentais.

5.4 Análise da evolução do afluente das ETAR ao longo do estudo

Para obtenção de conclusões mais concretas, verificamos a evolução dos diâmetros dos halos no afluente nas Figuras 5.22 e 5.23.

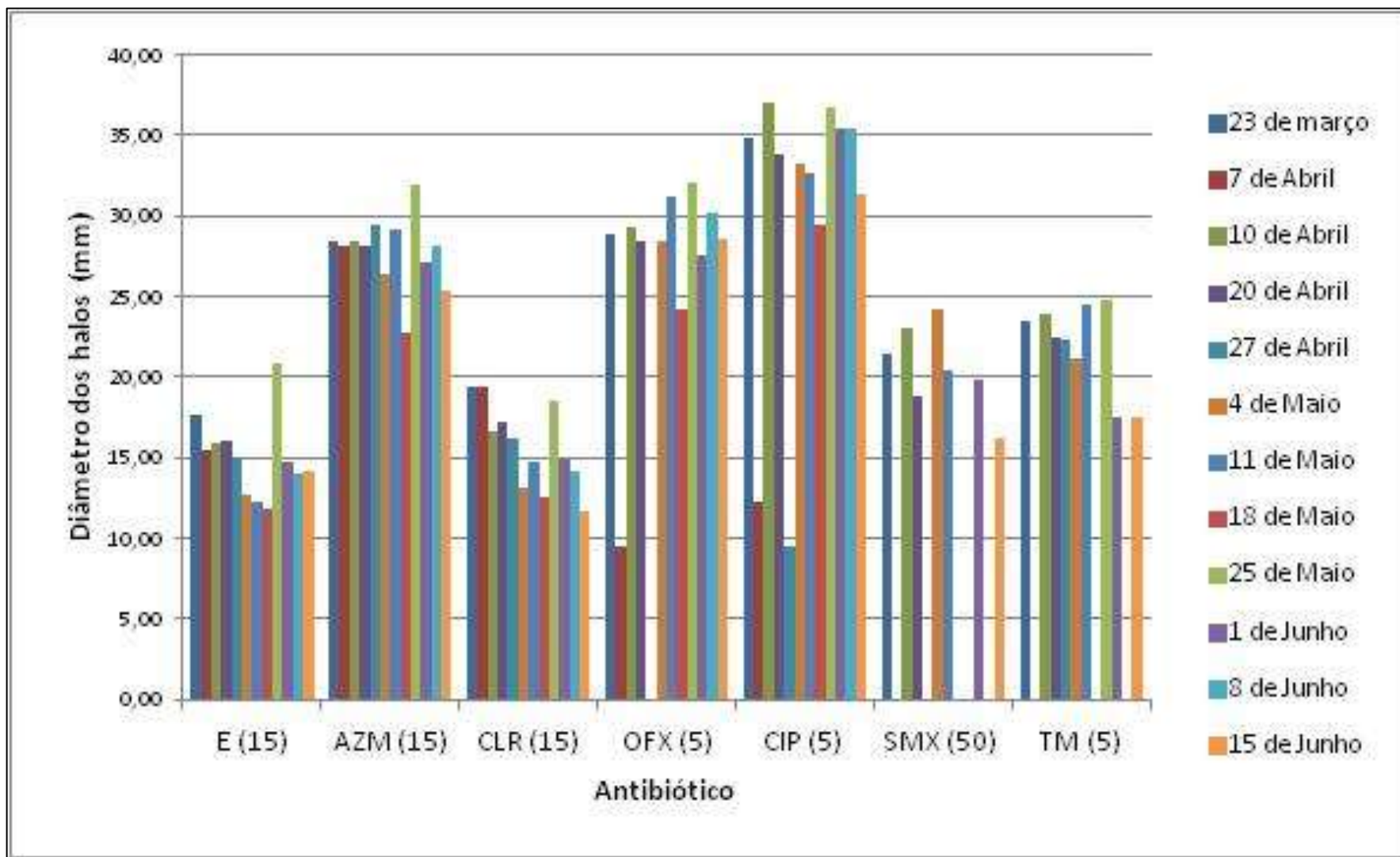


Figura 5.22 - Variação do diâmetro do halo do afluyente ao longo do tempo na ETAR de Febros

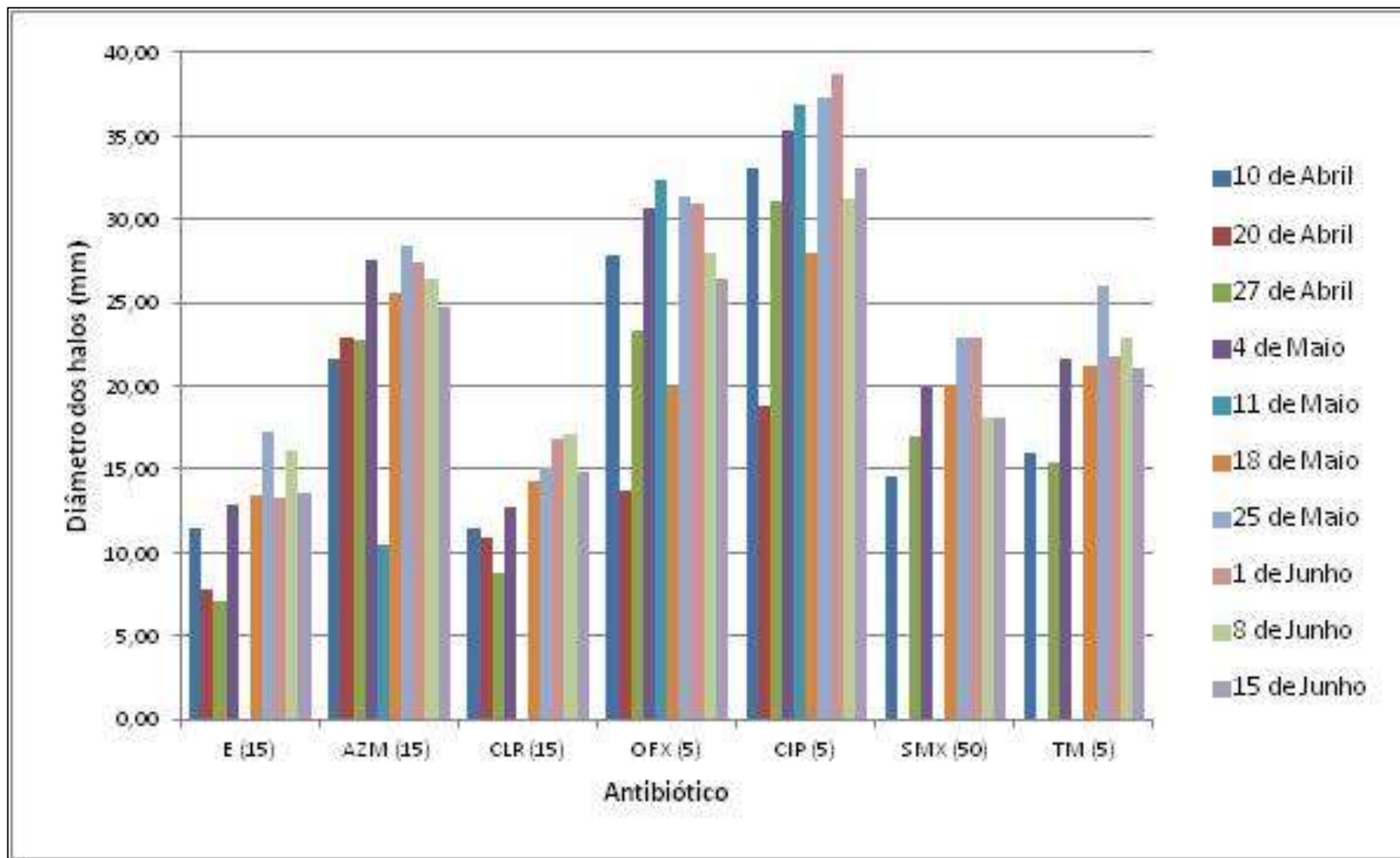


Figura 5.23 - Variação do diâmetro do halo do afluente ao longo do tempo na ETAR de Lever

Na ETAR de Febros, os diâmetros dos halos no afluente diminuem ao longo do tempo, exceto nos antibióticos Ciprofloxacina e Ofloxacina. Na ETAR de Lever, os diâmetros dos halos no afluente aumentam ligeiramente ao longo do tempo, apesar de haver uma súbita descida no início do mês de Maio. Este fenómeno pode ser explicado por um aumento do consumo destes antibióticos neste período de tempo.

Conclui-se que as ETAR de Febros e Lever recebem diariamente estirpes resistentes aos antibióticos da bactéria *E. coli* no seu afluente, o que é um caso preocupante pois se estas estirpes resistentes não forem removidas pela ETAR através de desinfecção, irão para o meio hídrico.

6. Conclusões e sugestões para trabalhos futuros

Esta dissertação teve como objetivo a avaliação do funcionamento de duas ETAR do interior do município de Vila Nova de Gaia quanto à eliminação ou disseminação de bactérias resistentes a antibióticos. Assim, realizaram-se testes de sensibilidade a alguns antibióticos na ETAR de Febros e na ETAR de Lever nos seus afluentes e efluentes e foi avaliada a eficiência da desinfecção por radiação UV na ETAR de Lever.

Foram selecionados para este estudo alguns dos antibióticos mais consumidos e persistentes no ambiente: Eritromicina; Azitromicina; Claritromicina; Ofloxacina; Ciprofloxacina; Sulfametoxazol; Trimetoprim e Metronidazol. A bactéria usada nestes ensaios foi a *E. coli* isolada a partir de amostras das águas residuais estudadas, uma vez que esta é uma bactéria suscetível de adquirir resistências.

Em ambas as ETAR, as situações mais críticas (maior número de ocorrências de halo nulo) foram observadas para os fármacos Claritromicina, Sulfametoxazol e o Trimetoprim, principalmente estes dois últimos. Para a ETAR de Febros o mês mais crítico foi o de Abril, enquanto que para ETAR de Lever foi entre final do mês de Abril e meados do mês de Maio. Dentro do período estudado (de Março a Junho de 2015) considera-se que esses períodos poderão coincidir com a ocorrência de infeções respiratórias associadas a esta época do ano e conseqüente aumento do consumo destes antibióticos.

Para o antibiótico Metronidazol todos os halos foram nulos ao longo do estudo porque este mesmo antibiótico tem características antifúngicas e antiparasitárias sendo esperada uma capacidade reduzida para evitar o crescimento da *E. coli*.

Sintetizando, na ETAR de Febros, os diâmetros dos halos no afluente diminuem ao longo do tempo, exceto nos antibióticos Ciprofloxacina e Ofloxacina e na ETAR de Lever, os diâmetros dos halos no afluente aumentam ligeiramente ao longo do tempo, apesar de haver uma súbita descida no início do mês de Maio.

Quando a unidade de desinfecção por radiação UV na ETAR de Lever funcionou de forma normal (sem avaria e com limpeza adequada) a eficiência revelou-se satisfatória.

Conclui-se que as ETAR de Febros e Lever recebem diariamente estirpes resistentes aos antibióticos da bactéria *E. coli* no seu afluente, o que é um caso preocupante pois se estas estirpes resistentes não forem removidas pela ETAR através de desinfecção, serem descarregadas para o meio hídrico.

Para a realização de trabalhos futuros apresentam-se as seguintes sugestões:

- Alargar o período de estudo a pelo menos 12 meses;
- Realizar este estudo com outras bactérias nomeadamente a *Pseudomonas aeruginosa*;
- Expandir o estudo a outras ETAR em funcionamento do distrito do Porto.

7. Bibliografia

1. Águas do Norte, *www.simdouro.pt* (acedido a 25 de Abril de 2015).
2. Soares, E.V., 2007. *Sebenta da disciplina de Biologia e Processos Biológicos do mestrado em Engenharia Química, no ramo de Tecnologia de Protecção Ambiental*, Instituto Superior de Engenharia do Porto, Instituto Politécnico do Porto.
3. Diário da Republica Electrónico, DL nº 152/97, <https://dre.pt/application/dir/pdf1sdip/1997/06/139A00/29592967.pdf>. (Acedido a 15 de Outubro de 2015).
4. Cursinho Pre ENEM, <http://cursinhopreenem.com.br/wp-content/uploads/2012/05/Fungos.jpg>. (acedido a 15 de Outubro de 2015).
5. Grupo Escolar, <http://www.grupoescolar.com/a/b/C92D2.jpg>. (acedido a 15 de Outubro de 2015).
6. Só Biologia - Portal de Biologia e Ciências, <http://sobiologia.com.br/figuras/Reinos/algasunicelulares.jpg>. (acedido a 15 de Outubro de 2015).
7. HypeScience - O universo em um clique, <http://hypescience.com/wp-content/uploads/2010/06/rot.jpg>. (acedido a 15 de Outubro de 2015).
8. 4 Bp Blogspot, http://4.bp.blogspot.com/_rPqXM6MeVk/T2nkk2fHORI/AAAAAAAAAMM/_QEXC-MbSfl/s640/Image26946.gif. (acedido a 15 de Outubro de 2015).
9. Medicina Geriatrica, <http://www.medicinageriatrica.com.br/wp-content/uploads/2008/09/bacterias.jpg>. (acedido a 15 de Outubro de 2015).
10. EnvioAg, <http://www.envioag.com/wp-content/uploads/2015/04/e-coli-streptococci.jpg>. (acedido a 15 de Outubro de 2015).
11. *Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)*, Stockholm, 2012.
12. European Centre for Disease Prevention and Control/European Medicines Agency - (ECDC/EMA), *The bacterial challenge: time to react*, Stockholm, 2009.
13. Statement by WHO Director-General - Margaret Chan, *Combat drug resistance: no action today means no cure tomorrow*, World Health Organization. (2011).
14. Infarmed. *Estatística do Medicamento - 2012*. Lisboa.
15. Direção-Geral da Saude, *Vigilância Epidemiológica das Resistências aos Antimicrobianos*, <https://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas/norma-n-0042013-de-21022013-atualizada-a-08082013.aspx>. (acedido a 4 de Novembro de 2015).
16. Documentos Oficiais - Ministério da Agricultura e do Mar, <http://www.portugal.gov.pt/pt/os-ministerios/ministerio-da-agricultura-e-do-mar/documentos-oficiais.aspx>. (acedido em Março de 2015).
17. Santos L., Gros M., Rodriguez-Mozaz S., Delerue-Matos C., Pena A., Barceló D., Montenegro M.C., *Contribution of hospital effluents to the load of pharmaceuticals in urban wastewaters: Identification of ecologically relevant pharmaceuticals*,. *Science of the Total Environment* 461–462 (2013) 302–316.
18. Dicas de Saúde, <http://www.saudedicas.com.br> (acedido a 23 de Outubro de 2015).
19. Diagnosia, <http://www.diagnosia.com/pt> (acedido a 23 de Outubro de 2015).

20. ECDC - Europa, <http://ecdc.europa.eu/pt/eaad/antibiotics/pages/factsexperts.aspx>. (acedido a 12 de Outubro de 2015).
21. Bergeron S., Boopathy R., Nathaniel R., Corbin A., LaFleur G., *Presence of antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes in raw source water and treated drinking water. USA*, International Biodeterioration & Biodegradation 102 (2015) 370 e 374. Vol. 102.
22. Bouki C., Venieri D., Diamadopoulos E., *Detection and fate of antibiotic resistant bacteria in wastewater*. Ecotoxicology and Environmental Safety 91 (2013) 1–9. Vol. 91.
23. Baquero F., Martínez JL, Rafael Cantón R., *Antibiotics and antibiotic resistance in water environments*. Biotechnology 19 (2008) 260–265.
24. Martins, A., 2012. *Prevalência de resistência a antimicrobianos em isolados ambientais de Escherichia coli e enterococos*, Tese de Mestrado em Tecnologia Bioquímica em Saúde. Escola Superior de Tecnologia de Saúde do Porto, Instituto Politécnico do Porto.
25. World Health Organization, *The evolving threat of antimicrobial resistance: options for action*, Genebra, Suíça, 2012.
26. H. Goossens, M. Ferech, R. Vander Stichele, M. Elseviers, *Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study*, Lancet. 365 (2005) 579–587. pp. 579–587.
27. Agência Nacional de Vigilância sanitária, http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo5/introducao.htm (Acedido a 15 de julho de 2015).
28. Universidade da Madeira, <http://www3.uma.pt/gcosta/docs/microbiology/prat4.pdf>. (acedido a 13 de Outubro de 2015).
29. Frilado, <http://www.frilabo.pt/Imgs/produtos/import/610224.TechnicalDataSheet.pdf> (acedido a 4 de Outubro de 2015).
30. Rodriguez-Mozaz S., Chamorro S., Marti E., Huerta B., Gros M., Sánchez-Melsió A., Carles M. Borrego, Damià Barceló, Jose Luis Balcázar, *Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewater and their impact on the receiving river*. Water Research 69 (2015) 234 e 242.
31. Korzeniewska E., Korzeniewska A., Harnisz M., *Antibiotic resistant Escherichia coli in hospital and municipal sewage and their emission to the environment*. Ecotoxicology and Environmental Safety 91 (2013) 96–102.

Anexos

Anexo A: Planeamento semestral da dissertação

Tabela A1 - Planeamento semestral da dissertação

Data Inicial	Data Final	Ação a decorrer
15 Set 2014	28 Fev 2015	Pesquisa e elaboração da parte teórica da dissertação.
01 Mar 2015	31 Mar 2015	Realização de testes e aprendizagem da técnica.
01 Abr 2015	31 Mai 2015	Recolha de Amostras na entrada e na saída dos reatores biológicos nas ETAR; Realização dos testes microbiológicos das amostras; Análise de resultados experimentais.
01 Jun 2015	30 Set 2015	Escrita mais elaborada da dissertação.
01 Out 2015	23 Nov 2015	Finalização da dissertação e defesa da mesma.

*Anexo B: Curva de calibração da Escala McFarland num espectrofotómetro UV***Tabela B1** - Indicações da preparação dos padrões da escala de McFarland e absorvâncias obtidas

Padrão da Escala McFarland	BaCl ₂ 1%	H ₂ SO ₄ 1%	Rélicas (Abs)			Absorvância
0,5	0,05	9,95	0,096	0,113	0,096	0,102
1	0,10	9,90	0,204	0,217	0,213	0,211
2	0,20	9,80	0,451	0,448	0,445	0,448
3	0,30	9,70	0,643	0,625	0,640	0,636
4	0,40	9,60	0,840	0,828	0,831	0,833
5	0,50	9,50	1,056	1,050	1,021	1,042
6	0,60	9,40	1,229	1,223		1,226
7	0,70	9,30	1,333	1,323		1,328
8	0,80	9,20	1,658	1,677		1,668
9	0,90	9,10	1,600	1,590		1,595
10	1,00	9,00	1,671	1,707		1,689

Anexo C: Exemplo de cálculo

- Cálculo do desvio padrão dos ensaios:

$$\text{desvio padrão} = \text{DESVPAD}(\text{ensaio1}; \text{ensaio2}; \text{ensaio3})$$

- Exemplo para os ensaios no dia 24 de Março para o antibiótico Eritromicina para a ETAR de Febros:

$$\text{desvio padrão} = \text{DESVPAD}(5,50; 7,00; 5,00) = 1,041$$

- Cálculo da média dos diâmetros dos halos de inibição:

$$\text{diâmetro disco} = 5,91 \text{ mm}$$

$$\text{média raio halos (mm)} = \frac{(\text{ensaio1} + \text{ensaio2} + \text{ensaio3})}{3}$$

$$\text{média diametro halos (mm)} = 2 \times \text{média raio} + \text{diâmetro disco}$$

- Exemplo para os ensaios no dia 24 de Março para o antibiótico Eritromicina para a ETAR de Febros:

$$\text{média raio halos} = \frac{(5,50 + 7,00 + 5,00)}{3} = 5,833 \text{ mm}$$

$$\text{média diametro halos} = 2 \times 5,833 + 5,91 = 17,577 \text{ mm}$$

- Cálculo da variação dos diâmetros dos halos de inibição:

$$\text{Variação diâmetro halos (mm)} = \text{média do afluente} - \text{média do efluente}$$

- Exemplo para os ensaios no dia 24 de Março para o antibiótico Eritromicina para a ETAR de Febros:

$$\text{Variação diâmetro halos} = 17,58 - 17,51 = 0,07 \text{ mm}$$

Anexo D: Resultados experimentais obtidos da ETAR de Febros

- Diâmetro do disco de antibiótico = 5,91 mm

Tabela D1 - Resultados experimentais no dia 24 de Março para a ETAR de Febros

Antibiótico (Massa)	Afluente				Efluente			
	Réplicas (mm)	Desvio Padrão	Raio Halo (mm)	Diâmetro Halo (mm)	Réplicas (mm)	Desvio Padrão	Raio Halo (mm)	Diâmetro Halo (mm)
Eritromicina (15)	5,50	1,041	5,833	17,577	6,70	0,854	5,800	17,510
	7,00				5,70			
	5,00				5,00			
Azitromicina (15)	10,60	0,586	11,267	28,443	12,90	1,552	11,300	28,510
	11,70				9,80			
	11,50				11,20			
Claritromicina (15)	6,90	1,704	6,767	19,443	5,70	0,656	6,300	18,510
	8,40				7,00			
	5,00				6,20			
Ofloxacina (5)	11,20	1,419	11,467	28,843	3,90	1,021	2,733	11,377
	10,20				2,00			
	13,00				2,30			
Ciprofloxacina (5)	14,00	1,790	14,433	34,777	2,50	0,929	3,567	13,043
	12,90				4,20			
	16,40				4,00			
Sulfametoxazol (50)	8,40	1,097	7,767	21,443	9,00	0,850	8,033	21,977
	8,40				7,70			
	6,50				7,40			
Trimetoprim (5)	9,00	0,200	8,800	23,510	10,40	0,611	9,867	25,643
	8,80				10,00			
	8,60				9,20			
Metronidazol (5)	0,00	0,000	0,000	0,000	0,00	0,000	0,000	0,000
	0,00				0,00			
	0,00				0,00			
Metronidazol (50)	0,00	0,000	0,000	0,000	0,00	0,000	0,000	0,000
	0,00				0,00			
	0,00				0,00			

Tabela D2 - Resultados experimentais no dia 7 de Abril para a ETAR de Febros

Antibiótico (Massa)	Afluente				Efluente			
	Réplicas (mm)	Desvio Padrão	Raio Halo (mm)	Diâmetro Halo (mm)	Réplicas (mm)	Desvio Padrão	Raio Halo (mm)	Diâmetro Halo (mm)
Eritromicina (15)	4,06	1,455	4,767	15,443	2,69	0,370	2,317	10,543
	3,80				2,31			
	6,44				1,95			
Azitromicina (15)	10,51	0,491	11,077	28,063	10,36	1,360	9,017	23,943
	11,38				7,64			
	11,34				9,05			
Claritromicina (15)	7,33	1,320	6,707	19,323	2,22	0,361	2,423	10,757
	5,19				2,84			
	7,60				2,21			
Ofloxacina (5)	2,18	0,370	1,817	9,543	4,35	0,226	4,410	14,730
	1,83				4,66			
	1,44				4,22			
Ciprofloxacina (5)	3,18	0,135	3,177	12,263	7,57	0,615	8,187	22,283
	3,04				8,80			
	3,31				8,19			
Sulfametoxazol (50)	0,00	0,000	0,000	0,000	0,00	0,000	0,000	0,000
	0,00				0,00			
	0,00				0,00			
Trimetoprim (5)	0,00	0,000	0,000	0,000	0,00	0,000	0,000	0,000
	0,00				0,00			
	0,00				0,00			
Metronidazol (5)	0,00	0,000	0,000	0,000	0,00	0,000	0,000	0,000
	0,00				0,00			
	0,00				0,00			
Metronidazol (50)	0,00	0,000	0,000	0,000	0,00	0,000	0,000	0,000
	0,00				0,00			
	0,00				0,00			

Tabela D3 - Resultados experimentais no dia 10 de Abril para a ETAR de Febros

Antibiótico (Massa)	Afluente				Efluente			
	Réplicas (mm)	Desvio Padrão	Raio Halo (mm)	Diâmetro Halo (mm)	Réplicas (mm)	Desvio Padrão	Raio Halo (mm)	Diâmetro Halo (mm)
Eritromicina (15)	5,20	0,681	4,967	15,843	4,57	0,641	5,303	16,517
	5,50				5,76			
	4,20				5,58			
Azitromicina (15)	11,09	0,200	11,283	28,477	13,11	0,934	12,663	31,237
	11,27				13,29			
	11,49				11,59			
Claritromicina (15)	5,18	0,858	5,380	16,670	4,02	1,056	4,953	15,817
	4,64				4,74			
	6,32				6,10			
Ofloxacina (5)	11,01	0,573	11,663	29,237	10,82	1,703	8,927	23,763
	11,90				8,44			
	12,08				7,52			
Ciprofloxacina (5)	14,56	0,897	15,540	36,990	13,63	1,080	13,617	33,143
	16,32				12,53			
	15,74				14,69			
Sulfametoxazol (50)	7,90	0,564	8,550	23,010	0,00	0,000	0,000	0,000
	8,91				0,00			
	8,84				0,00			
Trimetoprim (5)	9,31	0,317	8,977	23,863	0,00	0,000	0,000	0,000
	8,68				0,00			
	8,94				0,00			
Metronidazol (5)	0,00	0,000	0,000	0,000	0,00	0,000	0,000	0,000
	0,00				0,00			
	0,00				0,00			
Metronidazol (50)	0,00	0,000	0,000	0,000	0,00	0,000	0,000	0,000
	0,00				0,00			
	0,00				0,00			

Tabela D4 - Resultados experimentais no dia 20 de Abril para a ETAR de Febros

Antibiótico (Massa)	Afluente				Efluente			
	Réplicas (mm)	Desvio Padrão	Raio Halo (mm)	Diâmetro Halo (mm)	Réplicas (mm)	Desvio Padrão	Raio Halo (mm)	Diâmetro Halo (mm)
Eritromicina (15)	5,00	0,114	5,050	16,010	2,21	0,315	2,377	10,663
	5,18				2,74			
	4,97				2,18			
Azitromicina (15)	10,55	0,493	11,073	28,057	10,79	0,251	10,853	27,617
	11,14				11,13			
	11,53				10,64			
Claritromicina (15)	6,42	0,750	5,610	17,130	0,00	0,000	0,000	0,000
	5,47				0,00			
	4,94				0,00			
Ofloxacina (5)	11,13	0,356	11,250	28,410	10,58	0,490	11,117	28,143
	11,65				11,54			
	10,97				11,23			
Ciprofloxacina (5)	14,53	0,965	13,923	33,757	14,95	0,201	15,090	36,090
	12,81				15,00			
	14,43				15,32			
Sulfametoxazol (50)	6,95	0,720	6,457	18,823	0,00	0,000	0,000	0,000
	5,63				0,00			
	6,79				0,00			
Trimetoprim (5)	8,54	0,298	8,270	22,450	0,00	0,000	0,000	0,000
	8,32				0,00			
	7,95				0,00			
Metronidazol (5)	0,00	0,000	0,000	0,000	0,00	0,000	0,000	0,000
	0,00				0,00			
	0,00				0,00			
Metronidazol (50)	0,00	0,000	0,000	0,000	0,00	0,000	0,000	0,000
	0,00				0,00			
	0,00				0,00			

Tabela D5 - Resultados experimentais no dia 27 de Abril para a ETAR de Febros

Antibiótico (Massa)	Afluente				Efluente			
	Réplicas (mm)	Desvio Padrão	Raio Halo (mm)	Diâmetro Halo (mm)	Réplicas (mm)	Desvio Padrão	Raio Halo (mm)	Diâmetro Halo (mm)
Eritromicina (15)	4,30	0,240	4,547	15,003	0,00	0,000	0,000	0,000
	4,56				0,00			
	4,78				0,00			
Azitromicina (15)	11,17	0,805	11,790	29,490	6,66	0,361	6,243	18,397
	12,70				6,04			
	11,50				6,03			
Claritromicina (15)	4,48	0,571	5,130	16,170	0,00	0,000	0,000	0,000
	5,36				0,00			
	5,55				0,00			
Ofloxacina (5)	0,00	#DIV/0!	0,000	0,000	0,77	0,047	0,717	7,343
	0,00				0,70			
	0,00				0,68			
Ciprofloxacina (5)	1,99	0,250	1,817	9,543	3,61	0,630	3,183	12,277
	1,93				3,48			
	1,53				2,46			
Sulfametoxazol (50)	0,00	0,000	0,000	0,000	0,00	0,000	0,000	0,000
	0,00				0,00			
	0,00				0,00			
Trimetoprim (5)	8,31	0,126	8,177	22,263	0,00	0,000	0,000	0,000
	8,16				0,00			
	8,06				0,00			
Metronidazol (5)	0,00	0,000	0,000	0,000	0,00	0,000	0,000	0,000
	0,00				0,00			
	0,00				0,00			
Metronidazol (50)	0,00	0,000	0,000	0,000	0,00	0,000	0,000	0,000
	0,00				0,00			
	0,00				0,00			

Tabela D6 - Resultados experimentais no dia 4 de Maio para a ETAR de Febros

Antibiótico (Massa)	Afluente				Efluente			
	Réplicas (mm)	Desvio Padrão	Raio Halo (mm)	Diâmetro Halo (mm)	Réplicas (mm)	Desvio Padrão	Raio Halo (mm)	Diâmetro Halo (mm)
Eritromicina (15)	3,53	0,404	3,370	12,650	5,04	0,333	5,413	16,737
	3,67				5,68			
	2,91				5,52			
Azitromicina (15)	10,38	0,172	10,193	26,297	12,06	0,407	12,490	30,890
	10,04				12,54			
	10,16				12,87			
Claritromicina (15)	3,45	0,243	3,570	13,050	5,17	0,423	5,640	17,190
	3,85				5,99			
	3,41				5,76			
Ofloxacina (5)	11,13	0,125	11,257	28,423	10,67	0,292	10,853	27,617
	11,26				10,70			
	11,38				11,19			
Ciprofloxacina (5)	13,85	0,192	13,643	33,197	13,21	0,406	13,017	31,943
	13,61				13,29			
	13,47				12,55			
Sulfametoxazol (50)	9,04	0,231	9,163	24,237	8,36	0,363	8,640	23,190
	9,43				9,05			
	9,02				8,51			
Trimetoprim (5)	7,89	0,488	7,593	21,097	6,91	0,150	7,053	20,017
	7,86				7,04			
	7,03				7,21			
Metronidazol (5)	0,00	0,000	0,000	0,000	0,00	0,000	0,000	0,000
	0,00				0,00			
	0,00				0,00			
Metronidazol (50)	0,00	0,000	0,000	0,000	0,00	0,000	0,000	0,000
	0,00				0,00			
	0,00				0,00			

Tabela D7 - Resultados experimentais no dia 11 de Maio para a ETAR de Febros

Antibiótico (Massa)	Afluente				Efluente			
	Réplicas (mm)	Desvio Padrão	Raio Halo (mm)	Diâmetro Halo (mm)	Réplicas (mm)	Desvio Padrão	Raio Halo (mm)	Diâmetro Halo (mm)
Eritromicina (15)		0,233	3,145	12,200	5,79	0,580	6,120	18,150
	3,31				6,79			
	2,98				5,78			
Azitromicina (15)	11,59	0,228	11,633	29,177	12,70	0,802	13,217	32,343
	11,88				12,81			
	11,43				14,14			
Claritromicina (15)	4,27	0,827	4,397	14,703	7,44	0,918	7,723	21,357
	5,28				6,98			
	3,64				8,75			
Ofloxacina (5)	12,83	0,168	12,637	31,183		0,170	13,800	33,510
	12,55				13,68			
	12,53				13,92			
Ciprofloxacina (5)	14,55	1,151	13,340	32,590	16,37	0,671	16,337	38,583
	13,21				16,99			
	12,26				15,65			
Sulfametoxazol (50)	7,63	0,355	7,247	20,403	8,76	0,785	9,607	25,123
	7,18				10,31			
	6,93				9,75			
Trimetoprim (5)	9,03	0,202	9,260	24,430	10,50	0,231	10,233	26,377
	9,34				10,09			
	9,41				10,11			
Metronidazol (5)	0,00	0,000	0,000	0,000	0,00	0,000	0,000	0,000
	0,00				0,00			
	0,00				0,00			
Metronidazol (50)	0,00	0,000	0,000	0,000	0,00	0,000	0,000	0,000
	0,00				0,00			
	0,00				0,00			

Tabela D8 - Resultados experimentais no dia 18 de Maio para a ETAR de Febros

Antibiótico (Massa)	Afluente				Efluente			
	Réplicas (mm)	Desvio Padrão	Raio Halo (mm)	Diâmetro Halo (mm)	Réplicas (mm)	Desvio Padrão	Raio Halo (mm)	Diâmetro Halo (mm)
Eritromicina (15)	2,84	0,122	2,980	11,870	2,89	0,548	2,520	10,950
	3,04				2,78			
	3,06				1,89			
Azitromicina (15)	8,69	0,438	8,393	22,697	13,33	0,969	12,490	30,890
	7,89				12,71			
	8,60				11,43			
Clarithromicina (15)	2,81	0,585	3,323	12,557	2,71	0,575	3,067	12,043
	3,20				3,73			
	3,96				2,76			
Ofloxacina (5)	9,54	0,741	9,163	24,237	11,83	0,632	11,170	28,250
	9,64				10,57			
	8,31				11,11			
Ciprofloxacina (5)	12,60	1,029	11,723	29,357	11,89	0,415	12,293	30,497
	11,98				12,27			
	10,59				12,72			
Sulfametoxazol (50)	0,00	0,000	0,000	0,000	9,86	0,612	9,453	24,817
	0,00				9,75			
	0,00				8,75			
Trimetoprim (5)	0,00	0,000	0,000	0,000	8,75	0,601	9,210	24,330
	0,00				9,89			
	0,00				8,99			
Metronidazol (5)	0,00	0,000	0,000	0,000	0,00	0,000	0,000	0,000
	0,00				0,00			
	0,00				0,00			
Metronidazol (50)	0,00	0,000	0,000	0,000	0,00	0,000	0,000	0,000
	0,00				0,00			
	0,00				0,00			

Tabela D9 - Resultados experimentais no dia 25 de Maio para a ETAR de Febros

Antibiótico (Massa)	Afluente				Efluente			
	Réplicas (mm)	Desvio Padrão	Raio Halo (mm)	Diâmetro Halo (mm)	Réplicas (mm)	Desvio Padrão	Raio Halo (mm)	Diâmetro Halo (mm)
Eritromicina (15)	8,06	0,822	7,430	20,770		0,325	4,960	15,830
	7,73				4,73			
	6,50				5,19			
Azitromicina (15)	13,66	0,847	12,993	31,897	9,25	0,941	9,447	24,803
	13,28				8,62			
	12,04				10,47			
Clarithromicina (15)	6,72	0,590	6,280	18,470	4,96	0,615	5,227	16,363
	6,51				4,79			
	5,61				5,93			
Ofloxacina (5)	13,07	0,300	13,090	32,090	11,67	0,410	11,683	29,277
	13,40				11,28			
	12,80				12,10			
Ciprofloxacina (5)	15,43	0,127	15,383	36,677	12,55	0,992	13,653	33,217
	15,24				14,47			
	15,48				13,94			
Sulfametoxazol (50)	0,00	0,000	0,000	0,000	6,74	0,555	7,377	20,663
	0,00				7,76			
	0,00				7,63			
Trimetoprim (5)	9,71	0,435	9,397	24,703	7,99	0,059	8,013	21,937
	9,58				8,08			
	8,90				7,97			
Metronidazol (5)	0,00	0,000	0,000	0,000	0,00	0,000	0,000	0,000
	0,00				0,00			
	0,00				0,00			
Metronidazol (50)	0,00	0,000	0,000	0,000	0,00	0,000	0,000	0,000
	0,00				0,00			
	0,00				0,00			

Tabela D10 - Resultados experimentais no dia 1 de Junho para a ETAR de Febros

Antibiótico (Massa)	Afluente				Efluente			
	Réplicas (mm)	Desvio Padrão	Raio Halo (mm)	Diâmetro Halo (mm)	Réplicas (mm)	Desvio Padrão	Raio Halo (mm)	Diâmetro Halo (mm)
Eritromicina (15)	5,23	0,707	4,413	14,737	2,96	0,304	3,160	12,230
	3,99				3,51			
	4,02				3,01			
Azitromicina (15)	11,04	0,392	10,613	27,137	7,44	0,343	7,147	20,203
	10,53				7,23			
	10,27				6,77			
Clarithromicina (15)	4,38	0,325	4,493	14,897		0,276	3,685	13,280
	4,86				3,49			
	4,24				3,88			
Ofloxacina (5)	10,73	0,095	10,827	27,563	10,12	0,709	10,583	27,077
	10,92				10,23			
	10,83				11,40			
Ciprofloxacina (5)	14,61	0,090	14,713	35,337	11,55	0,556	11,777	29,463
	14,77				12,41			
	14,76				11,37			
Sulfametoxazol (50)	8,56	1,429	6,940	19,790	8,42	0,359	8,183	22,277
	5,86				8,36			
	6,40				7,77			
Trimetoprim (5)	7,08	1,169	5,810	17,530	7,55	0,690	7,127	20,163
	4,78				7,50			
	5,57				6,33			
Metronidazol (5)	0,00	0,000	0,000	0,000	0,00	0,000	0,000	0,000
	0,00				0,00			
	0,00				0,00			
Metronidazol (50)	0,00	0,000	0,000	0,000	0,00	0,000	0,000	0,000
	0,00				0,00			
	0,00				0,00			

Tabela D11 - Resultados experimentais no dia 8 de Junho para a ETAR de Febros

Antibiótico (Massa)	Afluente				Efluente			
	Réplicas (mm)	Desvio Padrão	Raio Halo (mm)	Diâmetro Halo (mm)	Réplicas (mm)	Desvio Padrão	Raio Halo (mm)	Diâmetro Halo (mm)
Eritromicina (15)	4,04	0,760	4,033	13,977	5,93	0,903	5,340	16,590
	3,27				5,79			
	4,79				4,30			
Azitromicina (15)	11,11	0,650	11,117	28,143	13,29	0,748	13,127	32,163
	10,47				13,78			
	11,77				12,31			
Claritromicina (15)	3,78	0,311	4,107	14,123	8,49	0,802	7,800	21,510
	4,14				7,99			
	4,40				6,92			
Ofloxacina (5)	12,54	1,075	12,130	30,170	13,57	0,078	13,507	32,923
	10,91				13,42			
	12,94				13,53			
Ciprofloxacina (5)	14,36	0,552	14,760	35,430	16,83	0,567	17,483	40,877
	15,39				17,84			
	14,53				17,78			
Sulfametoxazol (50)	0,00	0,000	0,000	0,000	0,00	0,000	0,000	0,000
	0,00				0,00			
	0,00				0,00			
Trimetoprim (5)	0,00	0,000	0,000	0,000	9,46	0,207	9,400	24,710
	0,00				9,17			
	0,00				9,57			
Metronidazol (5)	0,00	0,000	0,000	0,000	0,00	0,000	0,000	0,000
	0,00				0,00			
	0,00				0,00			
Metronidazol (50)	0,00	0,000	0,000	0,000	0,00	0,000	0,000	0,000
	0,00				0,00			
	0,00				0,00			

Tabela D12 - Resultados experimentais no dia 15 de Junho para a ETAR de Febros

Antibiótico (Massa)	Afluente				Efluente			
	Réplicas (mm)	Desvio Padrão	Raio Halo (mm)	Diâmetro Halo (mm)	Réplicas (mm)	Desvio Padrão	Raio Halo (mm)	Diâmetro Halo (mm)
Eritromicina (15)	4,27	0,505	4,107	14,123		0,120	3,105	12,120
	3,54				3,02			
	4,51				3,19			
Azitromicina (15)	10,37	1,008	9,753	25,417	8,97	0,145	9,120	24,150
	10,30				9,13			
	8,59				9,26			
Claritromicina (15)	2,45	0,372	2,857	11,623	3,36	0,783	3,740	13,390
	2,94				4,64			
	3,18				3,22			
Ofloxacina (5)	10,95	0,390	11,330	28,570	10,44	0,666	10,403	26,717
	11,73				9,72			
	11,31				11,05			
Ciprofloxacina (5)	12,18	0,677	12,707	31,323	11,31	0,380	11,700	29,310
	12,47				12,07			
	13,47				11,72			
Sulfametoxazol (50)	4,81	0,366	5,133	16,177	7,90	0,130	7,773	21,457
	5,06				7,78			
	5,53				7,64			
Trimetoprim (5)	5,59	0,472	5,773	17,457	8,24	0,895	8,627	23,163
	5,42				9,65			
	6,31				7,99			
Metronidazol (5)	0,00	0,000	0,000	0,000	0,00	0,000	0,000	0,000
	0,00				0,00			
	0,00				0,00			
Metronidazol (50)	0,00	0,000	0,000	0,000	0,00	0,000	0,000	0,000
	0,00				0,00			
	0,00				0,00			

Anexo E: Exemplo dos Antibiogramas realizados ao efluente da ETAR de Febros no dia 24 de Março de 2015

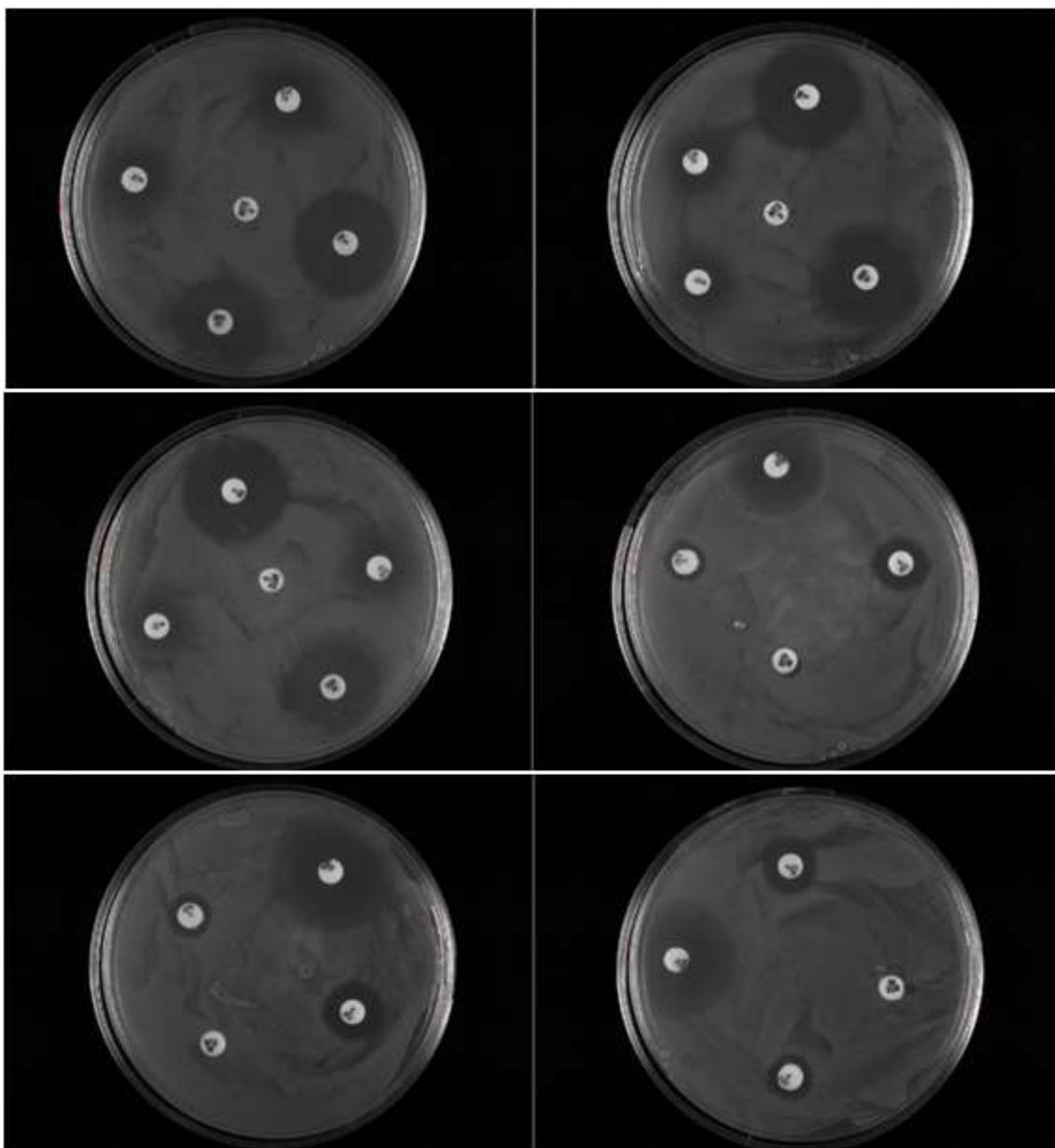


Figura E1 - Exemplo dos Antibiogramas realizados ao efluente da ETAR de Febros no dia 24 de Março de 2015

*Anexo F: Resultados experimentais obtidos da ETAR de Lever***Tabela F1** - Resultados experimentais no dia 10 de Abril para a ETAR de Lever

Antibiótico (Massa)	Afluente				Efluente			
	Réplicas (mm)	Desvio Padrão	Raio Halo (mm)	Diâmetro Halo (mm)	Réplicas (mm)	Desvio Padrão	Raio Halo (mm)	Diâmetro Halo (mm)
Eritromicina (15)	6,03	0,320	5,700	11,400	4,64	0,365	5,033	10,067
	5,39				5,10			
	5,68				5,36			
Azitromicina (15)	10,73	0,549	10,843	21,687	10,80	0,546	10,770	21,540
	10,36				10,21			
	11,44				11,30			
Claritromicina (15)	5,08	0,576	5,740	11,480	5,45	2,062	5,900	11,800
	6,14				4,10			
	6,00				8,15			
Ofloxacina (5)	13,70	0,351	13,937	27,873	11,41	0,131	11,270	22,540
	14,34				11,25			
	13,77				11,15			
Ciprofloxacina (5)	16,50	0,038	16,527	33,053	14,06	0,318	14,285	28,570
	16,57				14,51			
	16,51							
Sulfametoxazol (50)	7,17	0,154	7,300	14,600	0,00	0,000	0,000	0,000
	7,47				0,00			
	7,26				0,00			
Trimetoprim (5)	7,64	0,345	7,993	15,987	0,00	0,000	0,000	0,000
	8,33				0,00			
	8,01				0,00			
Metronidazol (5)	0,00	0,000	0,000	0,000	0,00	0,000	0,000	0,000
	0,00				0,00			
	0,00				0,00			
Metronidazol (50)	0,00	0,000	0,000	0,000	0,00	0,000	0,000	0,000
	0,00				0,00			
	0,00				0,00			

Tabela F2 - Resultados experimentais no dia 20 de Abril para a ETAR de Lever

Antibiótico (Massa)	Afluente				Efluente			
	Réplicas (mm)	Desvio Padrão	Raio Halo (mm)	Diâmetro Halo (mm)	Réplicas (mm)	Desvio Padrão	Raio Halo (mm)	Diâmetro Halo (mm)
Eritromicina (15)	3,50	0,618	3,920	7,840	3,54	0,318	3,903	7,807
	4,63				4,13			
	3,63				4,04			
Azitromicina (15)	11,63	0,591	11,450	22,900	11,18	0,723	12,013	24,027
	11,93				12,39			
	10,79				12,47			
Claritromicina (15)	5,71	0,208	5,473	10,947	0,00	0,000	0,000	0,000
	5,32				0,00			
	5,39				0,00			
Ofloxacina (5)	6,91	0,171	6,860	13,720	12,20	5,488	15,453	30,907
	6,67				12,37			
	7,00				21,79			
Ciprofloxacina (5)	9,54	0,148	9,413	18,827	16,27	0,071	15,000	30,000
	9,25				14,95			
	9,45				15,05			
Sulfametoxazol (50)	0,00	0,000	0,000	0,000	9,17	0,186	8,963	17,927
	0,00				8,81			
	0,00				8,91			
Trimetoprim (5)	0,00	0,000	0,000	0,000	9,90	0,131	9,913	19,827
	0,00				9,79			
	0,00				10,05			
Metronidazol (5)	0,00	0,000	0,000	0,000	0,00	0,000	0,000	0,000
	0,00				0,00			
	0,00				0,00			
Metronidazol (50)	0,00	0,000	0,000	0,000	0,00	0,000	0,000	0,000
	0,00				0,00			
	0,00				0,00			

Tabela F3 - Resultados experimentais no dia 27 de Abril para a ETAR de Lever

Antibiótico (Massa)	Afluente				Efluente			
	Réplicas (mm)	Desvio Padrão	Raio Halo (mm)	Diâmetro Halo (mm)	Réplicas (mm)	Desvio Padrão	Raio Halo (mm)	Diâmetro Halo (mm)
Eritromicina (15)	2,93	0,596	3,567	7,133	3,62	0,176	3,433	6,867
	4,11				3,27			
	3,66				3,41			
Azitromicina (15)	10,96	0,588	11,390	22,780	11,66	0,561	11,173	22,347
	11,15				11,30			
	12,06				10,56			
Clarithromicina (15)	5,37	0,881	4,400	8,800	3,74	0,290	3,977	7,953
	3,65				4,30			
	4,18				3,89			
Ofloxacina (5)	10,96	0,578	11,627	23,253	11,61	0,807	11,330	22,660
	11,93				11,96			
	11,99				10,42			
Ciprofloxacina (5)	16,02	0,912	15,560	31,120	14,35	0,689	14,660	29,320
	16,15				15,45			
	14,51				14,18			
Sulfametoxazol (50)	8,52	0,398	8,463	16,927	6,09	0,531	6,530	13,060
	8,04				6,38			
	8,83				7,12			
Trimetoprim (5)	7,42	0,271	7,730	15,460	7,02	0,231	7,200	14,400
	7,85				7,46			
	7,92				7,12			
Metronidazol (5)	0,00	0,000	0,000	0,000	0,00	0,000	0,000	0,000
	0,00				0,00			
	0,00				0,00			
Metronidazol (50)	0,00	0,000	0,000	0,000	0,00	0,000	0,000	0,000
	0,00				0,00			
	0,00				0,00			

Tabela F4 - Resultados experimentais no dia 4 de Maio para a ETAR de Lever

Antibiótico (Massa)	Afluente				Efluente			
	Réplicas (mm)	Desvio Padrão	Raio Halo (mm)	Diâmetro Halo (mm)	Réplicas (mm)	Desvio Padrão	Raio Halo (mm)	Diâmetro Halo (mm)
Eritromicina (15)	3,78	0,437	3,503	12,917	3,94	0,159	4,060	14,030
	3,00				4,00			
	3,73				4,24			
Azitromicina (15)	11,18	0,340	10,847	27,603	11,43	0,576	11,133	28,177
	10,50				10,47			
	10,86				11,50			
Claritromicina (15)	3,00	0,395	3,387	12,683	3,29	0,931	3,957	13,823
	3,37				5,02			
	3,79				3,56			
Ofloxacina (5)	12,18	0,347	12,390	30,690	12,06	0,700	11,760	29,430
	12,20				12,26			
	12,79				10,96			
Ciprofloxacina (5)	14,95	0,237	14,687	35,283	14,70	0,184	14,830	35,570
	14,62				15,04			
	14,49				14,75			
Sulfametoxazol (50)	7,22	0,195	7,027	19,963	6,57	0,655	7,323	20,557
	6,83				7,76			
	7,03				7,64			
Trimetoprim (5)	7,95	0,092	7,850	21,610	9,11	0,252	8,980	23,870
	7,77				8,69			
	7,83				9,14			
Metronidazol (5)	0,00	0,000	0,000	0,000	0,00	0,000	0,000	0,000
	0,00				0,00			
	0,00				0,00			
Metronidazol (50)	0,00	0,000	0,000	0,000	0,00	0,000	0,000	0,000
	0,00				0,00			
	0,00				0,00			

Tabela F5 - Resultados experimentais no dia 11 de Maio para a ETAR de Lever

Antibiótico (Massa)	Afluente				Efluente			
	Réplicas (mm)	Desvio Padrão	Raio Halo (mm)	Diâmetro Halo (mm)	Réplicas (mm)	Desvio Padrão	Raio Halo (mm)	Diâmetro Halo (mm)
Eritromicina (15)	0,00	0,000	0,000	0,000	4,01	0,373	4,100	14,110
	0,00				3,78			
	0,00				4,51			
Azitromicina (15)	2,15	0,234	2,300	10,510	9,60	0,185	9,813	25,537
	2,18				9,92			
	2,57				9,92			
Claritromicina (15)	0,00	0,000	0,000	0,000	4,65	0,146	4,483	14,877
	0,00				4,38			
	0,00				4,42			
Ofloxacina (5)	13,91	0,972	13,197	32,303	8,31	0,280	8,630	23,170
	12,09				8,75			
	13,59				8,83			
Ciprofloxacina (5)	14,80	0,675	15,480	36,870	12,67	0,668	12,747	31,403
	15,49				12,12			
	16,15				13,45			
Sulfametoxazol (50)	0,00	0,000	0,000	0,000	9,59	0,307	9,263	24,437
	0,00				9,22			
	0,00				8,98			
Trimetoprim (5)	0,00	0,000	0,000	0,000	7,73	0,131	7,833	21,577
	0,00				7,98			
	0,00				7,79			
Metronidazol (5)	0,00	0,000	0,000	0,000	0,00	0,000	0,000	0,000
	0,00				0,00			
	0,00				0,00			
Metronidazol (50)	0,00	0,000	0,000	0,000	0,00	0,000	0,000	0,000
	0,00				0,00			
	0,00				0,00			

Tabela F6 - Resultados experimentais no dia 18 de Maio para a ETAR de Lever

Antibiótico (Massa)	Afluente				Efluente			
	Réplicas (mm)	Desvio Padrão	Raio Halo (mm)	Diâmetro Halo (mm)	Réplicas (mm)	Desvio Padrão	Raio Halo (mm)	Diâmetro Halo (mm)
Eritromicina (15)		0,205	3,785	13,480	2,61	0,382	2,170	10,250
	3,93				1,92			
	3,64				1,98			
Azitromicina (15)	9,00	0,700	9,807	25,523	11,85	0,588	12,143	30,197
	10,16				12,82			
	10,26				11,76			
Claritromicina (15)	3,53	0,685	4,207	14,323	3,57	0,501	3,480	12,870
	4,19				3,93			
	4,90				2,94			
Ofloxacina (5)	6,96	1,440	6,980	19,870	0,73	0,290	0,817	7,543
	5,55				1,14			
	8,43				0,58			
Ciprofloxacina (5)	11,42	0,870	11,070	28,050	2,26	0,243	2,043	9,997
	11,71				1,78			
	10,08				2,09			
Sulfametoxazol (50)	6,71	0,819	7,047	20,003	9,12	0,707	8,363	22,637
	7,98				8,25			
	6,45				7,72			
Trimetoprim (5)	6,87	0,662	7,633	21,177	5,93	0,350	6,330	18,570
	7,99				6,48			
	8,04				6,58			
Metronidazol (5)	0,00	0,000	0,000	0,000	0,00	0,000	0,000	0,000
	0,00				0,00			
	0,00				0,00			
Metronidazol (50)	0,00	0,000	0,000	0,000	0,00	0,000	0,000	0,000
	0,00				0,00			
	0,00				0,00			

Tabela F7 - Resultados experimentais no dia 25 de Maio para a ETAR de Lever

Antibiótico (Massa)	Afluente				Efluente			
	Réplicas (mm)	Desvio Padrão	Raio Halo (mm)	Diâmetro Halo (mm)	Réplicas (mm)	Desvio Padrão	Raio Halo (mm)	Diâmetro Halo (mm)
Eritromicina (15)	6,13	0,385	5,687	17,283	3,63	0,298	3,360	12,630
	5,49				3,41			
	5,44				3,04			
Azitromicina (15)	11,18	0,122	11,260	28,430	10,83	0,605	11,440	28,790
	11,20				12,04			
	11,40				11,45			
Claritromicina (15)	4,40	0,212	4,637	15,183	4,17	0,744	3,653	13,217
	4,70				2,80			
	4,81				3,99			
Ofloxacina (5)	12,53	0,552	12,727	31,363	8,72	1,113	8,277	22,463
	13,35				9,10			
	12,30				7,01			
Ciprofloxacina (5)	16,26	0,588	15,737	37,383	12,42	0,222	12,677	31,263
	15,85				12,80			
	15,10				12,81			
Sulfametoxazol (50)	7,90	0,514	8,470	22,850	8,36	0,225	8,100	22,110
	8,61				7,98			
	8,90				7,96			
Trimetoprim (5)	9,86	0,390	10,033	25,977	7,83	0,625	7,960	21,830
	10,48				8,64			
	9,76				7,41			
Metronidazol (5)	0,00	0,000	0,000	0,000	0,00	0,000	0,000	0,000
	0,00				0,00			
	0,00				0,00			
Metronidazol (50)	0,00	0,000	0,000	0,000	0,00	0,000	0,000	0,000
	0,00				0,00			
	0,00				0,00			

Tabela F8 - Resultados experimentais no dia 1 de Junho para a ETAR de Lever

Antibiótico (Massa)	Afluente				Efluente			
	Réplicas (mm)	Desvio Padrão	Raio Halo (mm)	Diâmetro Halo (mm)	Réplicas (mm)	Desvio Padrão	Raio Halo (mm)	Diâmetro Halo (mm)
Eritromicina (15)	3,97	0,219	3,720	13,350	4,84	0,583	5,360	16,630
	3,63				5,25			
	3,56				5,99			
Azitromicina (15)	10,09	0,602	10,780	27,470	11,80	0,982	10,667	27,243
	11,20				10,08			
	11,05				10,12			
Clarithromicina (15)	5,72	0,332	5,433	16,777	5,41	0,277	5,337	16,583
	5,51				5,03			
	5,07				5,57			
Ofloxacina (5)	12,51	0,261	12,490	30,890	12,62	0,544	12,277	30,463
	12,22				12,56			
	12,74				11,65			
Ciprofloxacina (5)	15,86	0,598	16,423	38,757	15,57	0,530	14,963	35,837
	17,05				14,73			
	16,36				14,59			
Sulfametoxazol (50)	8,63	0,333	8,327	22,563	7,80	0,715	8,513	22,937
	8,38				9,23			
	7,97				8,51			
Trimetoprim (5)	9,50	0,190	9,697	25,303	7,64	0,389	7,940	21,790
	9,88				8,38			
	9,71				7,80			
Metronidazol (5)	0,00	0,000	0,000	0,000	0,00	0,000	0,000	0,000
	0,00				0,00			
	0,00				0,00			
Metronidazol (50)	0,00	0,000	0,000	0,000	0,00	0,000	0,000	0,000
	0,00				0,00			
	0,00				0,00			

Tabela F9 - Resultados experimentais no dia 8 de Junho para a ETAR de Lever

Antibiótico (Massa)	Afluente				Efluente			
	Réplicas (mm)	Desvio Padrão	Raio Halo (mm)	Diâmetro Halo (mm)	Réplicas (mm)	Desvio Padrão	Raio Halo (mm)	Diâmetro Halo (mm)
Eritromicina (15)	5,89	0,914	5,103	16,117	4,88	0,883	5,880	17,670
	4,10				6,55			
	5,32				6,21			
Azitromicina (15)	9,50	0,702	10,280	26,470	12,54	0,381	12,143	30,197
	10,48				11,78			
	10,86				12,11			
Claritromicina (15)	6,50	0,814	5,590	17,090	5,36	0,720	6,070	18,050
	5,34				6,05			
	4,93				6,80			
Ofloxacina (5)	11,69	0,725	11,063	28,037	10,22	0,925	11,287	28,483
	11,23				11,87			
	10,27				11,77			
Ciprofloxacina (5)	12,67	0,271	12,643	31,197	15,50	1,110	15,120	36,150
	12,36				13,87			
	12,90				15,99			
Sulfametoxazol (50)	6,54	0,507	6,063	18,037	7,55	0,115	7,680	21,270
	5,53				7,72			
	6,12				7,77			
Trimetoprim (5)	8,94	0,405	8,477	22,863	8,05	0,189	7,843	21,597
	8,30				7,68			
	8,19				7,80			
Metronidazol (5)	0,00	0,000	0,000	0,000	0,00	0,000	0,000	0,000
	0,00				0,00			
	0,00				0,00			
Metronidazol (50)	0,00	0,000	0,000	0,000	0,00	0,000	0,000	0,000
	0,00				0,00			
	0,00				0,00			

Tabela F10 - Resultados experimentais no dia 15 de Junho para a ETAR de Lever

Antibiótico (Massa)	Afluente				Efluente			
	Réplicas (mm)	Desvio Padrão	Raio Halo (mm)	Diâmetro Halo (mm)	Réplicas (mm)	Desvio Padrão	Raio Halo (mm)	Diâmetro Halo (mm)
Eritromicina (15)	3,64	0,193	3,863	13,637	3,31	0,211	3,447	12,803
	3,97				3,34			
	3,98				3,69			
Azitromicina (15)	8,98	0,364	9,397	24,703	9,66	0,372	9,743	25,397
	9,65				9,42			
	9,56				10,15			
Claritromicina (15)	4,63	0,438	4,467	14,843	4,49	0,380	4,103	14,117
	3,97				3,73			
	4,80				4,09			
Ofloxacina (5)	9,49	0,705	10,283	26,477	10,37	0,233	10,580	27,070
	10,84				10,83			
	10,52				10,54			
Ciprofloxacina (5)	13,28	0,300	13,570	33,050	9,44	0,154	9,310	24,530
	13,55				9,35			
	13,88				9,14			
Sulfametoxazol (50)	5,77	0,547	6,120	18,150	4,97	0,425	5,043	15,997
	5,84				4,66			
	6,75				5,50			
Trimetoprim (5)	7,27	0,287	7,597	21,103	6,02	0,583	6,207	18,323
	7,81				6,86			
	7,71				5,74			
Metronidazol (5)	0,00	0,000	0,000	0,000	0,00	0,000	0,000	0,000
	0,00				0,00			
	0,00				0,00			
Metronidazol (50)	0,00	0,000	0,000	0,000	0,00	0,000	0,000	0,000
	0,00				0,00			
	0,00				0,00			