



**ANA ISABEL FERNANDES MAGALHÃES**

**Deteção de *Enterobacteriaceae* produtoras de  $\beta$ -  
lactamases de espectro alargado em lamas de ETAR**

Dissertação do 2.º Ciclo de Estudos Conducente ao Grau de Mestre em Controlo de  
Qualidade

Trabalho realizado sob a orientação da:

Professora Doutora Helena Maria Neto Ferreira de Sousa

Faculdade de Farmácia Universidade do Porto, Portugal

**Porto, Setembro de 2015**

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

## AGRADECIMENTOS

---

À minha orientadora, Professora Doutora Helena Ferreira, pela transmissão de conhecimentos, pelo incansável apoio e disponibilidade, pela paciência, pelo entusiasmo e pelas palavras sábias nos momentos mais difíceis.

Aos responsáveis das Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETAR de Agra, ETAR de Serzedelo, ETAR de Lordelo, ETAR da Rabada, ETAR de Sobreiras, ETAR do Freixo, ETAR da Madalena, ETAR de Febros e ETAR da Ponte da Ribeira) pela cedência de amostras de lamas de ETAR que foram fundamentais para o presente estudo. Particularmente ao Diretor Cláudio Costa, Engenheira Raquel Araújo e Engenheira Ermelinda Barreiro pela pronta disponibilidade.

Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Bacteriologia pelo companheirismo, entusiasmo e alegria, pois permitem que as conquistas individuais se transformem em conquistas coletivas.

Aos meus pais, que são o meu modelo de vida, pela transmissão de valores, pelo constante apoio e incentivo em todos os momentos.

Às minhas irmãs que são a minha fonte de motivação e que sempre me acompanharam em todas as etapas da minha vida sem nunca deixarem de acreditar em mim.

E por fim, e não menos importante, aos meus amigos, especialmente à Andreia Magalhães, pelo apoio incondicional e pela motivação no alcançar de todos os meus objetivos.

“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós.”  
**(Antoine de Saint-Exupéry)**

**A todos, o meu sincero obrigada!**

## RESUMO

---

O normal funcionamento das Estações de Tratamento de Águas Residuais origina, como subproduto, grandes quantidades de resíduos, as lamas. As lamas de ETAR têm levantado várias questões no que concerne ao seu impacto quer a nível ambiental, quer a nível de saúde pública, pois com o desenvolvimento da população, urbanização e industrialização, estas sofreram um gradual aumento, tornando-se essencial a sua correta gestão.

No passado era prática comum a deposição no mar de lamas de ETAR, sendo esta prática abolida, a partir de 1998, pela Diretiva 91/271/CEE. Assim foi necessário encontrar outras alternativas, sendo as mais conhecidas e praticadas: a deposição em aterros sanitários, a valorização agrícola, a valorização energética e a aplicação na construção civil. Como atravessamos uma era em que o desenvolvimento sustentável é um conceito primordial, um dos destinos finais que tem conquistado um lugar cimeiro é a valorização agrícola das lamas. Em Portugal é considerado um destino final de eleição, pois os solos agrícolas manifestam características ácidas e são maioritariamente pobres em matéria orgânica. No entanto, é importante garantir que as lamas de ETAR estejam em conformidade, com um conjunto de requisitos de qualidade, aquando a sua aplicação nos solos agrícolas, sendo posteriormente designadas por bio sólidos.

Este estudo teve como objetivo a deteção e caracterização de bactérias resistentes aos antibióticos, neste caso particular, *Enterobacteriaceae* produtoras de  $\beta$ -lactamases de espectro alargado, em lamas de ETAR. Foram estudadas nove ETARs da zona Norte de Portugal, em seis destas foram detetados isolados de *Enterobacteriaceae* produtores de  $\beta$ -lactamases de espectro alargado. Não foi obtido crescimento nas lamas de ETAR estabilizadas com cal, de acordo com o esperado. Foi ainda possível detetar presença de isolados que apresentaram redução da suscetibilidade aos carbapenemos.

**Palavras-chave:** ETAR, lamas de ETAR, bio sólidos, *Enterobacteriaceae*, ESBL.

## ABSTRACT

---

The normal operation of the Wastewater Treatment Plants originates, as a byproduct, large quantities of waste, the sewage sludge. These sewage sludge have raised several questions regarding their impact both on environmental level, as well as in terms of public health, as, with the development of population, urbanization and industrialization, they have suffered a gradual increase, making their proper management essential.

In the past it was a common practice the deposition of sewage sludge in the sea, however, this practice has been abolished since 1998 by Directive 91/271 / EEC. Therefore it was necessary to find other alternatives, being the most known and practiced: the deposition in landfills, agricultural recovery, energy recovery and the application in construction. As we are crossing an era in which sustainable development is a key concept, one of the final applications that has achieved an increased relevance is the agricultural recovery of sewage sludge. In Portugal it is considered an application of choice because agricultural soils exhibit acidic characteristics and are mostly poor in organic matter. However, it is important to ensure that sewage sludge comply with a set of quality requirements when applied in agricultural land, subsequently referred to as biosolids.

The aim of this study was detection and characterization of antibiotic resistant bacteria, in this particular case, extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*, in sewage sludge. Nine WWTPs from Northern of Portugal were studied, in six of them we were able to find isolates of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. As expected stabilized sewage sludge showed no growth. It was also possible to detect the presence of isolates with reduced susceptibility to carbapenems.

**Keywords:** WWTP, sewage sludge, biosolids, *Enterobacteriaceae*, ESBL.

# ÍNDICE

---

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>1. Águas residuais</b> .....	2
1.1. Caracterização das águas residuais.....	3
1.1.1. Águas residuais domésticas.....	3
1.1.2. Águas residuais industriais.....	4
1.2. Estação de Tratamento de Águas Residuais (ETAR).....	5
1.2.1. Fase Líquida .....	7
1.2.2. Fase Sólida .....	12
<b>2. Lamas de ETAR</b> .....	13
2.1. Composição de Lamas de ETAR .....	15
2.1.1. Matéria orgânica .....	15
2.1.2. Nutrientes .....	16
2.1.3. Metais Pesados .....	17
2.1.4. Poluentes orgânicos.....	18
2.1.5. Características biológicas .....	19
2.2. Tratamento das Lamas de ETAR .....	19
2.2.1. Tratamento preliminar .....	19
2.2.2. Espessamento .....	20
2.2.3. Estabilização.....	21
2.2.4. Condicionamento .....	23
2.2.5. Desidratação.....	24
2.3. Destinos Finais de Lamas de ETAR.....	24
2.3.1. Deposição em aterro sanitário.....	25
2.3.2. Incineração .....	25
2.3.3. Valorização agrícola.....	26
2.3.4. Valorização energética.....	28

2.4.	Legislação.....	30
2.4.1.	Diretiva 86/278/CEE.....	30
2.4.2.	Decreto-lei nº. 446/91, de 22 de Novembro e Decreto-lei nº. 118/2006, de 21 de Junho .....	31
2.4.3.	Decreto-lei nº. 276/2009, de 2 de Outubro .....	31
2.5.	ETARI, um luxo ou uma precaução?.....	31
2.6.	Lamas de ETAR como via de disseminação de bactérias resistentes aos antibióticos.....	33
<b>3.</b>	<b><i>Enterobacteriaceae</i></b> .....	<b>33</b>
3.1.	<i>Escherichia coli</i> .....	35
3.2.	<i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	36
<b>4.</b>	<b>Antibióticos</b> .....	<b>36</b>
4.1.	Antibióticos $\beta$ -lactâmicos.....	38
<b>5.</b>	<b>Resistência bacteriana</b> .....	<b>39</b>
5.1.	Bases genéticas da resistência aos antibióticos.....	41
5.1.1.	Transformação.....	42
5.1.2.	Conjugação.....	42
5.1.3.	Transdução .....	42
5.2.	Resistência intrínseca .....	43
5.3.	Resistência adquirida.....	43
5.3.1.	$\beta$ -lactamases.....	44
<b>6.</b>	<b>Deteção laboratorial de <math>\beta</math>-lactamases de Espectro Alargado</b> .....	<b>47</b>
	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>49</b>
	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>51</b>
<b>1.</b>	<b>Origem das amostras de lamas de ETAR</b> .....	<b>52</b>
<b>2.</b>	<b>Processamento das amostras de lamas</b> .....	<b>52</b>
<b>3.</b>	<b>Determinação do fenótipo de resistência aos antibióticos em isolados de lamas de ETAR</b> .....	<b>54</b>
3.1.	Teste de suscetibilidade aos antibióticos pelo método de difusão em agar .....	54
3.2.	Deteção fenotípica de $\beta$ -lactamases de Espectro Alargado .....	55

3.2.1.	Sinergismo de oximino- $\beta$ -lactâmicos com ácido clavulânico no teste de suscetibilidade aos antibióticos $\beta$ -lactâmicos pelo método de difusão em agar.....	55
3.2.2.	Teste de adição de ácido clavulânico.....	56
<b>4.</b>	<b>Identificação dos isolados de lamas residuais com perfil de suscetibilidade relevante aos agentes antimicrobianos.....</b>	<b>57</b>
<b>5.</b>	<b>Determinação do genótipo de resistência aos antibióticos em isolados de lamas residuais .....</b>	<b>57</b>
5.1.	Extração de ADN bacteriano.....	57
5.2.	Determinação dos genes que codificam $\beta$ -lactamases.....	57
5.3.	Identificação dos produtos de PCR por eletroforese .....	59
	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>61</b>
<b>1.</b>	<b>Isolados obtidos no processamento das amostras de lamas de ETAR.....</b>	<b>62</b>
1.1.	Lamas de ETAR estabilizadas com cal .....	63
1.2.	Lamas de ETAR desidratadas.....	64
<b>2.</b>	<b>Deteção fenotípica de ESBLs nos isolados de lamas residuais.....</b>	<b>64</b>
<b>3.</b>	<b>Identificação dos isolados de lamas residuais .....</b>	<b>70</b>
<b>4.</b>	<b>Determinação do genótipo de resistência aos antibióticos em isolados de lamas residuais .....</b>	<b>72</b>
	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>76</b>
	<b>PERSPETIVAS FUTURAS .....</b>	<b>79</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>81</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>100</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

---

Figura 1 - Evolução no tratamento de águas residuais nos países do Sul Europeu.....	6
Figura 2 - Quantidades totais de lamas produzidas em diversos Estados-Membros, incluindo projeções para o ano 2000 e 2005 (expressas em matéria seca).....	13
Figura 3 - Estimativa da produção de lamas em 2006, em Portugal Continental, por sistema plurimunicipal .....	14
Figura 4 - Espessamento gravítico .....	20
Figura 5 - Espessamento por flotação por ar dissolvido .....	21
Figura 6 - Destino final de lamas de ETAR produzidas em diversos Estados-Membros, em 1998.....	25
Figura 7 - Classes de biossólidos em função dos tratamentos a que são submetidas as lamas .....	26
Figura 8 - Acidez e alcalinidade dos solos em Portugal Continental.....	28
Figura 9 - Dependência Energética na UE-28 em 2013 .....	29
Figura 10 - Evolução da dependência energética de Portugal.....	29
Figura 11 - Diferença entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.....	35
Figura 12 - Mecanismos de ação dos agentes antimicrobianos .....	37
Figura 13 - Mecanismo de ação dos antibióticos $\beta$ -lactâmicos numa bactéria Gram-negativa .....	39
Figura 14 - Estrutura química das principais subclasses dos antibióticos $\beta$ -lactâmicos ...	39
Figura 15 - Consumo de Antibióticos em 29 Países da UE, no ano 2011.....	40
Figura 16 - Mecanismos de resistência. ....	41
Figura 17 - Mecanismos de resistência adquirida.....	43
Figura 18 – Sistemas principais de classificação de $\beta$ -lactamases.....	45
Figura 19 – Distribuição geográfica das ETARs que cederam amostras de lamas de ETAR .....	52
Figura 20 - Inoculação da suspensão bacteriana no meio de cultura .....	55
Figura 21 - Fenótipo típico de um isolado produtor de ESBL.....	56
Figura 22 – Presença de ESBL detetada pela adição de ácido clavulânico.....	56
Figura 23 - Distribuição geográfica das ETARs e número dos respetivos isolados que apresentaram resistência a pelo menos um oximino- $\beta$ -lactâmico ou carbapenemo .....	62
Figura 24 - Resultado do processamento da amostra da lama de ETAR estabilizada com cal, suspensa em soro fisiológico .....	63
Figura 25 - Resultado do processamento da amostra da lama de ETAR estabilizada com cal, suspensa em TSB .....	64

Figura 26 – Fenótipo típico de um isolado produtor de ESBL. Isolado oriundo da amostra de lama de ETAR de Lordelo, selecionado com cefotaxima.....	65
Figura 27 – Teste de adição do ácido clavulânico positivo. Isolado oriundo da amostra de lama de ETAR de Serzedelo .....	65
Figura 28 - Distribuição geográfica das ETARS onde foram detetados isolados produtores de ESBLs, bem como, hospitais e UCCI circundantes .....	67
Figura 29 - Distribuição geográfica pormenorizada das ETARs de Sobreiras, da Madalena e de Febros onde foram detetados isolados produtores de ESBLs, bem como, distribuição dos hospitais e UCCI circundantes.....	68
Figura 30 - Distribuição geográfica pormenorizada das ETARs da Rabada, de Lordelo e de Serzedelo onde foram detetados isolados produtores de ESBLs, bem como, distribuição dos hospitais e UCCI circundantes.....	69
Figura 31 - Visualização dos produtos de amplificação, resultantes da PCR multiplex para pesquisa dos genes <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> , em gel de agarose .....	72

## ÍNDICE DE TABELAS

---

Tabela 1 - Constituição típica de uma água residual doméstica .....	3
Tabela 2 - Concentração média dos 7 metais pesados nos Estados-Membros e valores limite de concentração em Portugal .....	17
Tabela 3 - Valores limite de concentração de compostos orgânicos nas lamas destinadas à agricultura .....	18
Tabela 4 - Grupo de <i>primers</i> específicos utilizados nas reações de PCR.....	58
Tabela 5 - Caracterização do fenótipo de resistência aos antibióticos $\beta$ -lactâmicos dos isolados produtores de ESBLs detetados através da observação do sinergismo entre os oximino- $\beta$ -lactâmicos e o ácido clavulânico com amoxicilina ou pelo teste de adição do ácido clavulânico .....	66
Tabela 6 - Caracterização do fenótipo de resistência aos antibióticos $\beta$ -lactâmicos dos isolados submetidos à pesquisa de carbapenemases.....	74

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

---

Gráfico 1- Identificação dos 55 isolados de lamas residuais desidratadas em função do número de isolados.....	71
---	----

## ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS

---

AML	Ampicilina
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATM	Aztreonamo
AUG	Amoxicilina com ácido clavulânico
CAZ	Ceftazidima
CBO <sub>5</sub>	Carência bioquímica de oxigénio
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CTX	Cefotaxima
DATA	Digestão aeróbia termofílica autotérmica
DGEG	Direcção-Geral de Energia e Geologia
DHF	Dihidrofolato
dNTP's	Desoxirribunucleotídeos
ESBL	$\beta$ -lactamase de espectro alargado
ETAR	Estação de Tratamento de Águas Residuais
ETARI	Estação de Tratamento de Águas Residuais Infetadas
ETP	Ertapenemo
ExPEC	<i>Escherichia coli</i> extraintestinais
Fator F	Fator de fertilidade
FEP	Cefepime
FOX	Cefoxitina
I	Intermédio
IMI	Imipenemo
LAS	Alquilo benzenossulfonatos lineares
NAG	<i>N</i> -acetilglucosamina
NAM	<i>N</i> -acetilmurâmico
NDP	<i>Nordmann/Dortet/Poirel</i>
NPE	<i>Nonilfenóis e nonilfenóis etoxilados</i>

PABA	Ácido para-aminobenzóico
PAH	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
PBPs	<i>Penicilin-Binding-Proteins</i>
PCB	Compostos bifenilos policlorados)
PCDD	Policlorodibenzodioxinas
PCDF	Furanos
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
PENSAAR	Plano Estratégico de Abastecimento de Água e Saneamento de Águas Residuais
PERSU	Plano Estratégico para os Resíduos Urbanos
R	Resistentes
S	Sensível
SSV	Sólidos suspensos voláteis
TEQ	<i>Toxic equivalence quotient</i>
THF	Ácido tetrahidrofólico
<i>tra</i>	<i>transfer</i>
TSB	Caldo triptona de soja
UCCI	Unidade de Cuidados Continuados Integrados
UE	União Europeia
US EPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i>



## 1. Águas residuais

O impacto da intervenção humana sobre a natureza está a tornar-se, cada vez mais, evidente ao longo dos anos. Conceitos como desenvolvimento sustentável e preservação ambiental tornaram-se impreterivelmente frequentes no nosso quotidiano, sendo uma exigência incontornável a sua integração nas estratégias políticas <sup>1</sup>.

Com o constante avanço tecnológico e industrial, implementado pelo progresso científico, o esgotamento dos recursos naturais é uma realidade cada vez mais iminente. Os recursos hídricos, não são exceção, sendo a escassez de água um dos principais problemas de muitas sociedades e do mundo do século XXI <sup>1-4</sup>.

A água constitui um recurso essencial à vida e a todas atividades humanas, desempenhando um papel vital no ecossistema global <sup>2</sup>. O rápido aumento populacional, a intensificação da agricultura, a industrialização e a urbanização são os principais fatores que contribuíram para o aumento do consumo de água <sup>1,3,5</sup>.

Aproximadamente um quinto da população mundial vive em áreas de escassez física e 500 milhões de pessoas brevemente chegarão a esta situação. Um quarto da população mundial enfrenta escassez económica de água <sup>4</sup>.

Além desta utilização excessiva levar ao agravamento do desequilíbrio entre procura e oferta, a água também tem sofrido, gradualmente, uma acentuada perda de qualidade <sup>6</sup>. As Nações Unidas estimam que, todos os dias, cerca de 3600 crianças perdem as suas vidas devido a água contaminada e falta de saneamento <sup>1</sup>.

Uma vez que a população mundial está a aumentar a utilização dos recursos hídricos, conseqüentemente há uma maior produção de águas residuais que geridas incorretamente são uma fonte de contaminação – principalmente por microrganismos patogénicos –, representando um perigo para a saúde e para o meio ambiente <sup>7</sup>.

As águas residuais, em função da sua origem, podem ser classificadas em águas residuais domésticas, águas residuais industriais e águas residuais urbanas <sup>8</sup>.

Segundo o Decreto-Lei 152/1997, de 19 de Junho:

- Águas residuais domésticas: águas provenientes de instalações residenciais e serviços, resultantes de atividades domésticas e metabolismo humano. Dentro deste tipo pode ainda considerar-se as águas residuais turísticas – com características sazonais – e as águas residuais pluviais – provenientes da precipitação atmosférica <sup>8</sup>.
- Águas residuais industriais: águas provenientes de qualquer atividade industrial <sup>8</sup>.



- Águas residuais urbanas: mistura das águas residuais domésticas com águas residuais industriais <sup>8</sup>.

As águas residuais necessitam de ser previamente tratadas nas estações adequadas – Estação de Tratamento de Águas Residuais (ETAR) – e só depois devem retornar aos corpos de água. Desta forma é garantida/mantida a qualidade dos corpos recetores e a qualidade de vida aí existente <sup>9</sup>.

Na maioria dos países europeus, pelo menos, 60% da população está conectada a um sistema de recolha de águas residuais. A Roménia e o Chipre são as exceções, já que apenas 40 e 30%, respetivamente, estão ligados a sistemas de recolha de águas residuais <sup>10</sup>.

O normal funcionamento destas infraestruturas origina, como subproduto, grandes quantidades de resíduos, as lamas. As lamas devem ser adequadamente tratadas atendendo às suas características físicas, químicas e biológicas <sup>10</sup>.

### 1.1. Caracterização das águas residuais

A quantidade e a qualidade das águas residuais são influenciadas por vários fatores, nomeadamente comportamento, padrão e estilo de vida dos habitantes, bem como, o tipo de serviços e tipo de atividade da indústria <sup>11</sup>.

#### 1.1.1. Águas residuais domésticas

As águas residuais domésticas são uma mistura complexa constituída maioritariamente por água (aproximadamente 99,9%) em conjunto com componentes orgânicos e inorgânicos (0,1%) (Tabela 1) <sup>12</sup>.

Tabela 1 - Constituição típica de uma água residual doméstica (adaptado) <sup>11</sup>

Principais constituintes das águas residuais domésticas		Consequências
<b>Microrganismos</b>	Bactérias patogénicas, vírus e parasitas	Risco de contrair uma infeção
<b>Resíduos orgânicos biodegradáveis</b>	Proteínas e carboidratos	Depleção do oxigénio nos rios e lagos resultando na morte dos peixes, odores
<b>Outros resíduos orgânicos</b>	Detergentes, pesticidas, gorduras, óleo e espumas, corantes, solventes, fenóis e cianeto	Efeito tóxico, condições antiestéticas, bioacumulação na cadeia alimentar

<b>Nutrientes</b>	Azoto e fósforo	Eutrofização, depleção do oxigénio, efeito tóxico
<b>Metais</b>	Mercúrio, chumbo, cádmio, crómio, cobre e níquel	Efeito tóxico, bioacumulação
<b>Outros resíduos inorgânicos</b>	Ácidos e bases	Corrosão, efeito tóxico

#### **1.1.1.1. Caracterização biológica das águas residuais domésticas**

Vários microrganismos e vírus são comumente encontrados nas águas residuais domésticas, bem como, nos efluentes das Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETARs) <sup>13</sup>. A natureza e as concentrações vão depender da dimensão e da saúde da população servida <sup>14</sup>. Sendo os principais:

- Bactérias – A água residual doméstica contém muitos milhões de bactérias, sendo a maioria bactérias entéricas <sup>15</sup>. Os principais grupos de bactérias encontrados nas águas residuais domésticas são:

- Bactérias Gram-negativas anaeróbias facultativas: por exemplo, *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Vibrio*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, e *Shigella* <sup>13</sup>.
- Bactérias Gram-negativas aeróbias: por exemplo, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*.
- Bactérias Gram-positivas formadoras de esporos: por exemplo, *Bacillus* spp <sup>13</sup>.
- Bactérias Gram-positivas não formadoras de esporos: por exemplo, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Rhodococcus* <sup>13</sup>.

- Vírus – não têm capacidade para se multiplicarem fora do hospedeiro e, geralmente, estão em menores concentrações relativamente às bactérias <sup>13</sup>;

- Protozoários – presentes sob forma de cistos ou oocistos que são muito resistentes ao *stress* ambiental e desinfeção. Além disso, não possuem capacidade para se multiplicarem fora do hospedeiro <sup>13</sup>.

#### **1.1.2. Águas residuais industriais**

A composição das águas residuais industriais varia de acordo com o tipo de indústria e de materiais processados. Por norma, os efluentes industriais apresentam diversos tipos de poluentes orgânicos e inorgânicos <sup>12</sup>.

A estas águas também podem ser associadas altas concentrações de metais pesados, que quando retornam aos corpos recetores sem tratamento prévio acarretam um grave risco para a saúde e para o meio ambiente devido à sua toxicidade. Os metais usualmente encontrados nestas águas são cádmio, níquel, chumbo, crómio e mercúrio <sup>16</sup>.

O tratamento das águas residuais industriais, ricas em metais pesados, apresenta um custo mais elevado, pois os metais pesados não são biodegradáveis <sup>16</sup>. Além disso, interferem no tratamento biológico devido à sua capacidade inibidora e tóxica que exerce sobre a comunidade microbiana <sup>17</sup>.

### **1.2. Estação de Tratamento de Águas Residuais (ETAR)**

As águas residuais contêm substâncias contaminantes, desta forma, necessitam de tratamento adequado antes de serem devolvidas ao meio ambiente. Este tratamento é efetuado numa infraestrutura designada de ETAR <sup>18</sup>.

Historicamente, a problemática da recolha das águas residuais e do seu direcionamento teve início quando foram constituídas as primeiras comunidades. Em 3750 a.C. foram construídas galerias de esgoto em Nippur (Índia). Em 3100 a.C. há indícios históricos da utilização de manilhas cerâmicas <sup>19</sup>.

No Mohenjo-Daro, perto do rio Indo (Paquistão), também, foi construído um dos mais antigos sistemas de gestão de águas residuais, em cerca de 1500 a.C.. Alguns séculos mais tarde o rio mudou o seu curso, e a cidade foi abandonada e coberta por areia nas décadas seguintes <sup>20</sup>.

Na Roma imperial eram efetuadas ligações diretas das casas até aos canais, mas poucas casas apresentavam estas ligações <sup>19</sup>.

Durante a Idade Média não há registo de grandes avanços relativamente à descarga de águas residuais. Esta crescente despreocupação, aliada a um desconhecimento prático da Microbiologia, teve como consequência o surgimento de inúmeras epidemias que assolaram a Europa e que se mantiveram até ao século XIX <sup>20</sup>.

Somente em 1815 surgiram as primeiras redes coletoras em Londres, seguindo-se Hamburgo (1842) e Paris (1880). Os tratamentos de esgotos, praticamente inexistentes, limitavam-se à sua descarga nos corpos recetores, que por sua vez, se tornavam cada vez mais poluídos. A Inglaterra foi um dos países severamente afetado (1831 e 1848, registaram-se 50 mil e 25 mil vitimas fatais, devido a episódios graves de epidemias de cólera, respetivamente) devido à poluição, sendo pioneiro na resolução desta problemática, promulgando as primeiras leis de saneamento e saúde pública. Londres foi, igualmente, local de um marco importante na evolução do saneamento, pois John Snow provou cientificamente a relação entre a cólera e a qualidade deficitária das águas <sup>19,21</sup>.

Em 1860 surgiu o dispositivo de Mouras que tinha como finalidade tratar as lamas de depuração por um processo anaeróbio, e em 1865 realizaram-se as primeiras experiências sobre degradação microbiológica das lamas. Os fundamentos biológicos que acabariam por dar origem ao processo de tratamento de esgotos, através de lamas ativadas, começaram a ser investigados, em 1882, na Inglaterra, tendo culminado com o desenvolvimento do processo das lamas ativadas em 1914, por Edward Arden e William Lockett <sup>19,21</sup>.

Com o grande aumento das cidades, ocorrido a partir do século XIX e início do século XX, outros países seguiram o exemplo inglês, relativamente à problemática das águas residuais, criando as primeiras estações de tratamento. Disso são exemplo, os Estados Unidos da América onde foi construída, em 1887, a Estação Experimental Lawrence, em Massachusetts <sup>19</sup>.

Pode-se afirmar, que a partir daí, os países desenvolvidos, em especial a Inglaterra e a maioria dos outros países europeus, bem como, o Japão, os Estados Unidos da América, o Canadá e a extinta União Soviética, todos começaram a tratar os esgotos das suas cidades <sup>19</sup>.

A evolução da qualidade do serviço de saneamento, relacionada com os níveis de tratamento e população abrangida, revelam uma melhoria notória nos dados apresentados para os países do Sul da Europa. Em Portugal, já a partir de 1990 (Figura 1) <sup>22</sup>.

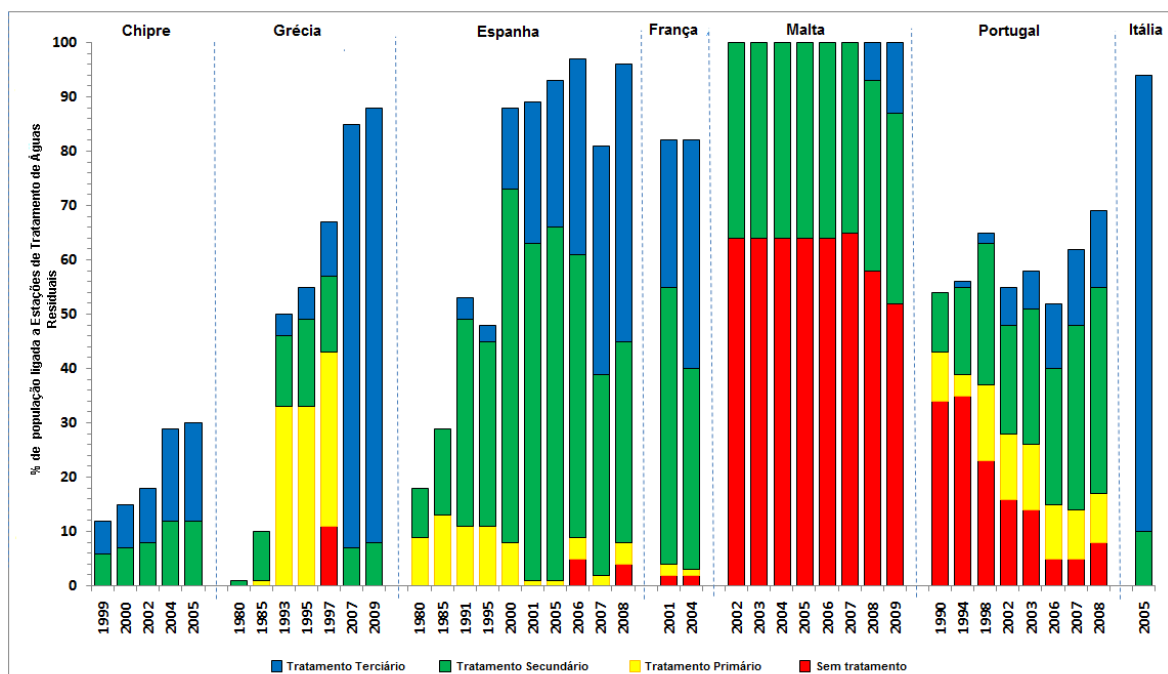


Figura 1 - Evolução no tratamento de águas residuais nos países do Sul Europeu (adaptado) <sup>22</sup>

O tratamento das águas residuais apresenta duas fases distintas: uma corresponde ao tratamento da fase líquida e a outra corresponde ao tratamento da fase sólida <sup>18,23</sup>.

O tratamento da fase líquida tem como objetivo tratar a água residual, de forma, a cumprir as condições exigidas na licença de descarga para posterior rejeição no meio recetor. Por outro lado, o tratamento da fase sólida tem como objetivo dar o tratamento adequado aos sólidos removidos da água residual, na fase líquida. Complementarmente pode ser necessário o adequado tratamento dos odores resultantes da degradação da matéria orgânica existente nas águas residuais, e que é removida ao longo do processo e tratamento das ETARs <sup>18</sup>.

### 1.2.1. Fase Líquida

Na fase líquida existem, de um modo geral, quatro fases de tratamento de águas residuais, designadas por tratamento preliminar, tratamento primário, tratamento secundário, tratamento terciário ou de afinação <sup>23</sup>.

A configuração de uma ETAR, ou seja, a escolha de um sistema de tratamento depende de vários fatores, nomeadamente as características qualitativas e quantitativas das águas residuais, a localização do sistema, bem como, os valores limite de emissão dos efluentes da ETAR que se pretendem, em função da qualidade da água do meio recetor onde será realizada a descarga da água residual tratada <sup>18</sup>.

#### 1.2.1.1. Fase Preliminar

Na fase preliminar é realizado um conjunto de operações físicas que permitem remover da água residual, por exemplo, areias, gorduras e materiais grosseiros. Fundamentalmente, esta etapa tem como objetivo proteger os órgãos e os processos de tratamento seguintes, bem como, evitar obstruções dos circuitos hidráulicos e contaminações das águas e lamas, de modo, a obter uma maior eficiência <sup>18</sup>.

As principais ações nesta fase são:

a) **Gradagem** – sistema de grelhas, colocado num ou mais canais por onde circula a água residual, que retém os sólidos de maiores dimensões (ex. paus, folhas, papéis, latas, etc.). Estes sólidos grosseiros são armazenados e, posteriormente, encaminhados para um destino final adequado <sup>18</sup>.

b) **Tamisação** – tem a mesma função que a gradagem, porém apresenta uma maior eficiência de remoção, pois possui uma malha mais fina que permite reter os sólidos de menores dimensões, desta forma, deve ser utilizado como complemento da gradagem <sup>18</sup>.

c) **Desarenação** – pode ser realizada de diversas formas e tem como objetivo retirar as areias do efluente. A título de exemplo, pode consistir num tanque onde o efluente passa a uma velocidade reduzida, permitindo que as areias assentem por gravidade, sendo removidas e encaminhadas para um classificador de areias. As operações de desarenação

e remoção de gorduras e óleos podem ser efetuadas no mesmo órgão de tratamento (desarenadores/ desengorduradores) <sup>18</sup>.

d) **Remoção de gorduras e óleos** – tem como objetivo retirar as gorduras e óleos presentes, podendo recorrer à injeção de um fluxo de ar ascendente no interior do efluente, levando à acumulação de gorduras na superfície. Depois da sua remoção, são direcionadas para um concentrador de gorduras e, posteriormente, encaminhadas para um destino final adequado <sup>18</sup>.

### **1.2.1.2. Fase Primária**

A fase primária pode ser constituída por processos físicos e químicos e tem como objetivo remover os sólidos que sedimentam facilmente, originando, assim, as lamas primárias. Com este tratamento pretende-se que o total de partículas sólidas em suspensão das águas recebidas seja reduzido, no mínimo, em 50% e a carência bioquímica de oxigénio (CBO<sub>5</sub>) das águas residuais seja reduzida, no mínimo, em 20% <sup>9,18</sup>.

A CBO representa o oxigénio consumido pelos microrganismos na oxidação da matéria orgânica presente numa água, em condições aeróbias. O método clássico consiste na medição do consumo de oxigénio, na total ausência de luz, à temperatura de 20°C, durante um determinado período de tempo (geralmente 5 dias – CBO<sub>5</sub>). Quanto maior o CBO<sub>5</sub>, maior a quantidade de matéria orgânica presente <sup>9</sup>.

O tratamento primário é realizado essencialmente através de sedimentação/decantação ou flotação:

a) **Sedimentação/ Decantação** – tem como finalidade remover os sólidos em suspensão, por ação da gravidade (decantação). A água permanece um período de tempo, num decantador, para permitir que as partículas suspensas sedimentem no fundo, sendo igualmente retiradas as escumas que se acumulam na superfície dos decantadores. Alternativamente, de forma a reduzir a área de ocupação dos decantadores, poderão ser utilizados sistemas de decantação lamelar e decantação assistida. Estes sistemas servem-se da coagulação e floculação, com a adição de reagentes químicos, aumentando assim a sua eficiência. No final desta operação, a água clarificada passa para o tratamento secundário, enquanto as lamas primárias são recolhidas para posterior tratamento na fase sólida e as escumas direcionadas para o concentrador de gorduras do tratamento preliminar <sup>18</sup>.

b) **Flotação** – operação cujo objetivo é remover os sólidos de dimensões muito reduzidas em que não é viável a sua separação por ação da gravidade. Consiste na injeção de um fluxo de ar ascendente no seio do tanque, sendo arrastados os sólidos para a superfície, juntamente com as bolhas de ar, onde são recolhidos e direcionados para o tratamento na fase sólida <sup>18</sup>.

### 1.2.1.3. Fase Secundária

A fase secundária é constituída, genericamente, por processos biológicos <sup>9</sup> e visa remover a matéria orgânica biodegradável presente no efluente, sob a forma coloidal, dissolvida ou suspensa, que não foi retirada na fase primária <sup>18</sup>.

Esta fase pode ser dimensionada para remover nutrientes como o azoto e o fósforo. A água residual é colocada em contacto com um meio “rico” em microrganismos que metabolizam a matéria orgânica, removendo-a da fase líquida e incorporando-a na sua biomassa. Os processos biológicos podem ser aeróbios ou anaeróbios. Existe uma grande diversidade de sistemas para esta fase, podendo ser de biomassa suspensa, fixa, híbridos ou sistemas combinados <sup>18</sup>.

Relativamente aos sistemas de tratamento biológico por biomassa suspensa, os microrganismos responsáveis pela metabolização da matéria orgânica encontram-se, como o próprio nome indica, em suspensão na água residual <sup>18</sup>. Estes podem ser:

a) **Lamas ativadas** – processo biológico mais utilizado no tratamento de águas residuais e tem como objetivo transformar matéria solúvel em matéria decantável. O efluente, procedente da fase primária, é conduzido para um reator artificialmente arejado, onde é disponibilizado o oxigénio necessário para que os microrganismos metabolizem a matéria orgânica <sup>13,18</sup>. Posteriormente, estes microrganismos são retirados através de um decantador secundário, onde ocorre a separação do efluente tratado (fase líquida) e das lamas secundárias (fase sólida) <sup>18</sup>.

As lamas ativadas são constituídas por vírus e por diversos microrganismos, nomeadamente bactérias (quantitativamente representam 95% dos microrganismos totais), protozoários, fungos e metazoários, que têm sido, recentemente, utilizados para avaliação das condições operacionais das instalações das ETAR <sup>24,25</sup>. Os protozoários ciliados são muito abundantes em todos os processos de tratamento aeróbios, alimentando-se de bactérias que entram continuamente no sistema, tendo sido observado que estes melhoram a qualidade do efluente <sup>24</sup>. A presença de bactérias filamentosas em demasia é um dos principais problemas que afeta os sistemas de lamas ativadas, devido ao *bulking* filamentosos. O fenómeno de *bulking* devido a microrganismos filamentosos representa uma dificuldade no processo de sedimentação dos flocos, pois devido aos filamentos, os flocos formados são retidos, e é formada uma espécie de lama superficial podendo ocorrer a saída de lamas pelo efluente final, diminuindo a qualidade deste <sup>25,26</sup>.

A concentração ideal de microrganismos é garantida pela recirculação das lamas recolhidas no fundo do decantador secundário <sup>18</sup>.



b) **Lagoas** – no tratamento por lagunagem ocorrem processos semelhantes aos que ocorreriam em meio natural. O efluente é encaminhado por ação da gravidade e em contínuo para lagos com profundidades e dimensões distintas, onde se realizam processos de degradação com recurso a microrganismos e microalgas. Existem lagoas anaeróbias (pré-tratamento de efluentes com elevada carga orgânica), lagoas facultativas (efluentes com carga orgânica intermédia e para afinação de efluentes de outras lagoas), e lagoas de maturação (remoção de microrganismos patogénicos através de condições ambientais adversas como por exemplo radiação ultravioleta, pH elevado). Também, poderão existir lagoas arejadas onde é fornecido oxigénio através de arejadores mecânicos, de forma, a aumentar a eficiência do tratamento <sup>18</sup>.

Por outro lado, no que diz respeito ao sistema de biomassa fixa, os microrganismos crescem num substrato inerte fixo. O substrato pode ser de areia, pedra ou plástico, produzindo um biofilme por onde passa a água residual, permitindo aos microrganismos degradarem a matéria orgânica existente <sup>18</sup>.

Os sistemas mais utilizados são:

a) **Leitos percoladores** – estes sistemas são constituídos por tanques circulares que possuem um material de enchimento (pedras ou material sintético granulado) que serve de suporte à biomassa. O efluente é injetado pela parte superior do leito e à medida que atravessa o enchimento, os microrganismos captam os nutrientes e decompõem a matéria orgânica. Para garantir o crescimento dos microrganismos e as necessidades de oxigénio é promovida a circulação do ar. Gradualmente a espessura da camada do biofilme vai aumentando e as camadas inferiores entram em anaerobiose, permitindo a desnitrificação do efluente. O efluente tratado que sai do leito percolador é, então, direcionado para um decantador secundário, que assegura a separação dos fragmentos de biofilme que se libertaram da superfície das partículas de enchimento <sup>18</sup>.

b) **Biofiltros** – este sistema é composto por tanques com enchimento de pequenas esferas (meio filtrante) mantidas em contacto com o efluente e arejadas com ar. A água residual a ser tratada circula por gravidade e o ar atravessa o meio filtrante com um movimento ascendente. Desta forma, graças à flora bacteriana existente no material filtrante é possível a eliminação de carbono solúvel e a filtração de sólidos em suspensão, bem como, a retenção simultânea de fósforo <sup>18</sup>.

c) **Discos biológicos** – este sistema consiste num conjunto de discos circulares dispostos paralelamente e unidos por um eixo horizontal. Como os discos possuem uma superfície rugosa, os microrganismos aderem constituindo um biofilme. Estes giram em torno do eixo e mergulham parcialmente num canal com o efluente a ser tratado, o que assegura que os microrganismos estão alternadamente em contacto com a



matéria orgânica e com o ar. De um modo geral, estas unidades são cobertas para evitar a incidência de radiação solar e o desenvolvimento de algas, bem como, perdas de calor<sup>18</sup>.

Nos sistemas híbridos, a biomassa encontra-se fixa a um meio de enchimento que se mantém em suspensão na água residual por intermédio de agitadores ou arejadores. Também se encontram disponíveis sistemas de tratamento em que a linha de tratamento dispõe de sistemas de biomassa fixa e sistemas de biomassa suspensa de forma sequencial<sup>18</sup>.

### **1.2.1.4. Fase Terciária**

A fase terciária ou de afinação visa complementar as etapas anteriores de tratamento, quer pela exigência de qualidade do meio recetor quer pelos usos previstos para o mesmo. Assim, nesta etapa poderá ocorrer a remoção de determinados poluentes que permaneceram na água após terem passado pelos tratamentos anteriores, como partículas dificilmente decantáveis, microrganismos patogénicos, nutrientes (azoto e/ou fósforo), ou outros compostos (herbicidas e/ou pesticidas) <sup>18</sup>.

Para a destruição/inativação parcial dos microrganismos patogénicos recorre-se ao processo de desinfeção, que poderá realizar-se pela adição de agentes químicos (ozono, cloro) e físicos (radiação ultravioleta) <sup>27</sup>. O cloro é um dos desinfetantes mais utilizados devido à sua capacidade de desinfeção, fácil manuseamento e baixo custo. Além disso, a presença de cloro residual pode inativar eficazmente as bactérias patogénicas durante um longo período de tempo. No entanto, o cloro livre pode reagir com os precursores de subprodutos da desinfeção (por exemplo, matéria orgânica natural) e originar subprodutos de desinfeção, tais como, trihalometanos, ácidos haloacéticos, haloacetonas e haloacetónitros. O trihalometanos estão associados à indução de danos no ADN e cancro <sup>28</sup>.

Anteriormente à desinfeção é, usualmente, necessário recorrer ao processo de filtração que elimina as partículas em suspensão não removidas nos tratamentos anteriores e que influenciam a eficiência da desinfeção <sup>18</sup>.

Quanto à remoção de azoto e fósforo, esta pode ser obtida por via biológica que, por norma, é associada ao tratamento secundário, ou por via química, que no caso do azoto é realizada por *air stripping* (método físico-químico que se baseia na transferência do azoto da água residual para o gás de arraste, por norma, o ar atmosférico. Os efeitos de arraste e a difusão molecular promovem a passagem do azoto para o meio atmosférico) <sup>29</sup>, e no caso do fósforo é, geralmente, realizada por precipitação <sup>18</sup>.

Relativamente à remoção de poluentes específicos, estes podem ser removidos por intermédio de operações físicas e/ou químicas, designadamente floculação e decantação, coagulação, adsorção sobre carvão ativado, osmose inversa e troca iónica <sup>18</sup>.

### **1.2.2. Fase Sólida**

Na fase sólida é realizado o tratamento das lamas geradas na ETAR, ou seja, o tratamento das lamas primárias e secundárias <sup>18</sup>.

Nas estações de tratamento convencionais, as lamas têm origem na operação de decantação primária e nos processos secundário e terciário. As etapas de tratamento, das lamas de ETAR, serão abordadas posteriormente no Subcapítulo 2.2.

## 2. Lamas de ETAR

Segundo o Decreto-Lei 276/2009, de 2 de Outubro, lamas de depuração são as lamas provenientes do tratamento das águas residuais domésticas, industriais ou urbanas <sup>30</sup>.

Na União Europeia (UE) estima-se que a produção, *per capita*, de lamas de depuração seja de 90 gramas/dia. Isto é, a produção anual de lamas de depuração é superior a 10 milhões de toneladas/ano <sup>31-33</sup>. Em 2020, estima-se que a produção aumente para os 13 milhões de toneladas anuais <sup>34</sup>.

Na Figura 2 apresentam-se as lamas produzidas nos diversos Estados-Membros nos anos de 1992, 1995 e 1998 e as projeções para os anos de 2000 e 2005, segundo a Agência Europeia do Ambiente <sup>35</sup>.

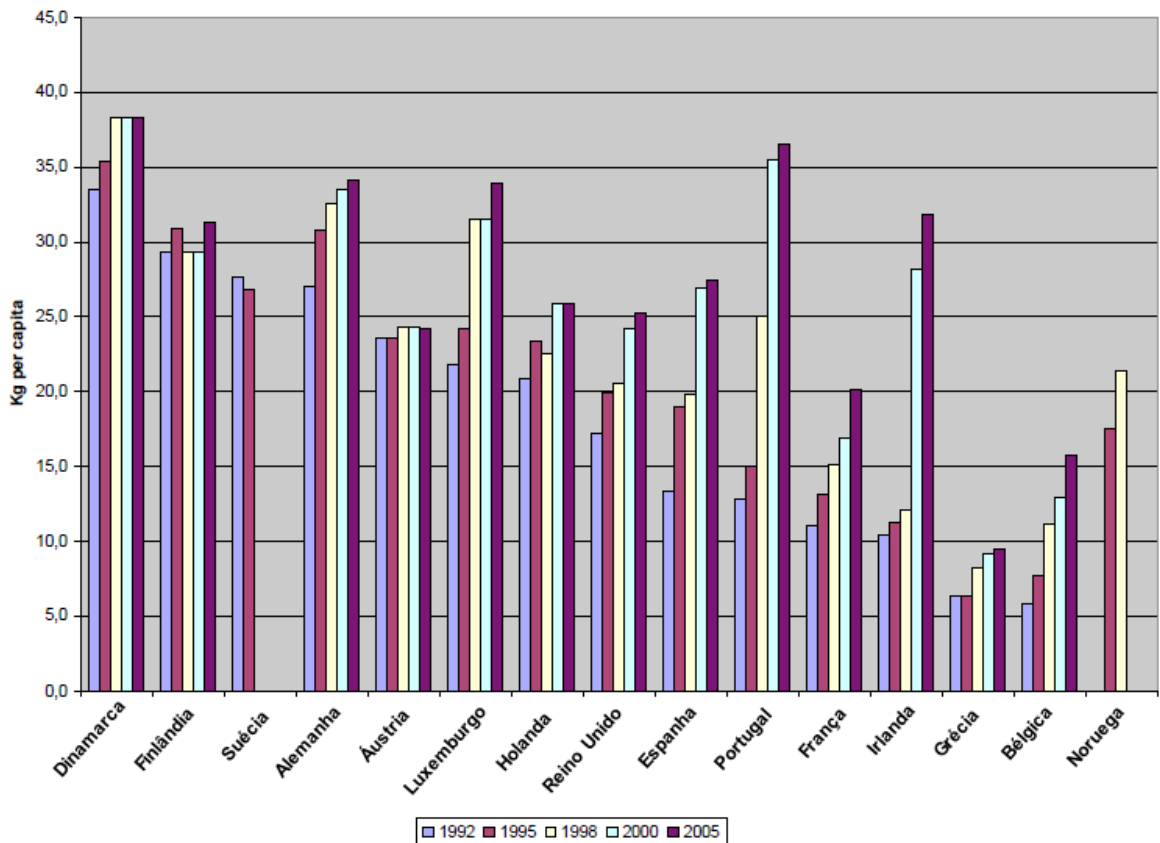


Figura 2 - Quantidades totais de lamas produzidas em diversos Estados-Membros, incluindo projeções para o ano 2000 e 2005 (expressas em matéria seca) (adaptado) <sup>35</sup>

Através da Figura 2 é perceptível o aumento significativo das quantidades de lamas produzidas em todos os Estados-Membros durante a década de 90, resultante da transposição para direito interno da Diretiva 91/271/CEE que define melhores níveis de atendimento e maiores exigências ao nível de tratamento <sup>35</sup>.

Atualmente, é extremamente complicado obter conhecimento concreto acerca da quantidade de lamas que são produzidas em Portugal. A Figura 3 apresenta a estimativa



de gestão das lamas, promovendo a sua valorização através de um processo de reciclagem e, simultaneamente evitar os riscos para a saúde pública <sup>39</sup>.

## **2.1. Composição de Lamas de ETAR**

A composição e a qualidade das lamas, ou seja, as suas características físicas, químicas e biológicas são variáveis, não dependem exclusivamente da composição das águas de que provêm, dependem também da tecnologia de tratamento a que foram sujeitas <sup>40</sup>.

De modo geral, numa ETAR podem obter-se lamas primárias, respetivas às lamas recolhidas no decantador primário, lamas biológicas ou secundárias, resultantes dos processos de tratamento biológico após a decantação secundária <sup>41</sup>.

As lamas primárias são constituídas essencialmente por sólidos sedimentáveis que apresentam um elevado teor de matéria orgânica como fezes, frutas, legumes, têxteis etc. <sup>41</sup>. A sua consistência é de um líquido espesso com uma percentagem de água entre 92 e 96%, apresentando uma coloração cinzenta, na maioria dos casos acompanhada por um odor extremamente forte. As lamas primárias, contendo entre 60 a 70% de sólidos suspensos voláteis (SSV, relaciona-se com a quantidade de biomassa presente), são separadas da água residual através de um processo físico (decantador primário) e são posteriormente digeridas por processos aeróbios e anaeróbios <sup>42</sup>.

As lamas secundárias, também denominadas por lamas biológicas, são obtidas através de processos biológicos, onde ocorre a transformação da matéria orgânica por intermédio do metabolismo microbiano. Estas contêm entre 60 a 80% SSV, também são digeridas com facilidade por via dos processos aeróbios e/ou anaeróbios. Este tipo de lamas apresenta na sua constituição, sólidos biológicos de aspeto acastanhado que quando frescas têm um odor a terra. Mas rapidamente se tornam sépticas e escuras e ficam com um desagradável odor a putrefação <sup>42</sup>.

Todos os tipos de lamas apresentam uma quantidade considerável de nutrientes, tais como, azoto, fósforo, potássio e um elevado teor de matéria orgânica, e em menor extensão, cálcio, enxofre e magnésio. Estes elementos representam um potencial valorizável que se pretende recuperar e reutilizar durante e/ou após o tratamento <sup>14</sup>.

No entanto, as lamas também apresentam poluentes, tais como, metais pesados, poluentes orgânicos e agentes patogénicos <sup>14</sup>.

### **2.1.1. Matéria orgânica**

A matéria orgânica das lamas de ETAR representa na maioria dos casos um valor superior a 50% da matéria seca presente nas mesmas, podendo variar consoante o tipo

de tratamento e/ou condicionamento. É majoritariamente constituída por hidrocarbonetos, aminoácidos e pequenas porções de proteínas e lípidos <sup>14</sup>, existindo apenas um pequeno teor em lenhina e celulose na sua composição <sup>43</sup>.

Este constituinte quando aplicado no solo serve de fonte de energia para a atividade microbiológica, aumentando a população de microrganismos que conseqüentemente contribuem para o reforço da capacidade de mineralização do solo <sup>14</sup>.

A aplicação de lamas nos solos tem uma grande vantagem relativamente ao uso de adubos minerais, pois os seus componentes vão-se libertando de uma forma mais lenta e duradoura. O aproveitamento da matéria orgânica das lamas de depuração para o uso agrícola traz melhorias para os solos em termos de propriedades físicas, estrutura e capacidade de retenção de água e minerais, bem como, redução do escoamento superficial e erosão hídrica <sup>14</sup>.

### **2.1.2. Nutrientes**

As concentrações de nutrientes, presentes nas lamas de ETAR, variam consoante o tipo de tratamento das águas residuais, bem como, o tratamento aplicado sobre a lama <sup>14</sup>.

Na constituição das lamas de ETAR podem identificar-se macronutrientes, tais como, azoto, fósforo, magnésio, cálcio, ou enxofre, e ainda alguns micronutrientes como o boro, ferro, cobalto, molibdénio e manganésio <sup>14,44</sup>.

O azoto e fósforo fazem parte dos principais nutrientes requisitados pelas plantas ao solo durante o seu ciclo de vida. O azoto surge nas lamas predominantemente na forma orgânica, e em menor grau na forma mineral (amoniacal). Grande parte do azoto amoniacal está localizado na fase líquida das lamas e sofre uma grande redução após os processos de espessamento e desidratação, podendo ainda sofrer perdas no teor, na ordem de 30%, após o armazenamento das respetivas lamas em fase líquida durante pelo menos 4 meses. Como as plantas só assimilam o azoto mineral, o valor agrícola da lama neste caso depende da capacidade do azoto orgânico ser mineralizado <sup>14</sup>.

O fósforo é um nutriente extremamente precioso e sendo um recurso natural limitado e não renovável, as lamas residuais que contêm fósforo desencadeiam um elevado interesse <sup>45</sup>. As plantas servem-se do fósforo para o seu crescimento, assegurando o desenvolvimento do sistema radicular e a sua resistência às doenças <sup>40</sup>. O fósforo está presente nas lamas majoritariamente sob a forma mineral, podendo representar entre 30 a 98% do fósforo total, de acordo com o tipo de lama <sup>14</sup>.

### 2.1.3. Metais Pesados

As lamas de ETAR, em termos orgânicos apresentam, na sua constituição, componentes húmicos. Este tipo de matéria orgânica confere às lamas elevada capacidade de retenção de água e de troca iónica, sendo responsável pela retenção de metais pesados <sup>43</sup>.

Numerosos metais pesados estão presentes nas lamas de ETAR, essencialmente são sete os principais: cádmio, cobre, níquel, chumbo, zinco, mercúrio e crómio <sup>46</sup>. Estes, a partir de uma determinada concentração, podem afetar o processo de crescimento das plantas, deteriorar as propriedades do solo, inibir a atividade benéfica dos microrganismos e prejudicar gravemente o equilíbrio ambiental e saúde humana <sup>14,44</sup>.

A presença de metais pesados nas lamas efluentes residuais derivam da mistura de águas residuais domésticas com as águas pluviais (especialmente de escoamento sobre rodovias), e com as águas residuais industriais. A concentração de metais pesados pode ser muito variável para cada origem, dependendo ainda do contexto industrial de cada zona ou país <sup>14</sup>.

Relativamente aos valores limite de concentração de metais pesados aceitáveis nas lamas de ETAR, estes encontram-se regulamentados pelo quadro jurídico europeu, através da Diretiva 86/278/CEE <sup>14</sup>, transposta para a ordem jurídica interna pelo Decreto-Lei n.º 276/2009, de 2 Outubro <sup>30</sup>. A Tabela 2 apresenta uma análise comparativa das taxas médias praticadas nos Estados-Membros e da taxa máxima permitida em Portugal.

Tabela 2 - Concentração média dos 7 metais pesados nos Estados-Membros e valores limite de concentração em Portugal (adaptado) <sup>14,30</sup>

Designação do Metal	Directiva 86/278/CEE (mg/kg de matéria seca)	Média nos Estados-Membros (mg/kg de matéria seca)	Decreto-Lei n.º 276/2009, Portugal (mg/ kg de matéria seca)
<b>Cádmio</b>	20-40	0,4-3,8	20
<b>Cobre</b>	1000-1750	39-641	1000
<b>Níquel</b>	300-400	9-90	300
<b>Chumbo</b>	750-1200	13-221	750
<b>Zinco</b>	2500-4000	142-2000	2500

<b>Mercúrio</b>	16-25	0,3-3	16
<b>Crómio</b>	1000-1750	16-275	1000

#### 2.1.4. Poluentes orgânicos

Uma grande variedade de compostos orgânicos e dioxinas são frequentemente detetados nas lamas de ETAR. Estes podem provocar um impacto negativo sobre o meio ambiente <sup>14,47</sup>.

Na Tabela 3 apresentam-se os poluentes orgânicos mais comuns e os valores limite de concentração de poluentes orgânicos nas lamas destinadas à agricultura <sup>46-48</sup>.

Tabela 3 - Valores limite de concentração de compostos orgânicos nas lamas destinadas à agricultura (adaptado)<sup>30</sup>

<b>Compostos Orgânicos</b>	<b>Valores Limite (matéria seca)</b>
<b>LAS (alquilo benzenossulfonatos lineares)</b>	5000 mg/kg
<b>NPE (nonilfenóis e nonilfenóis etoxilados)</b>	450 mg/kg
<b>PAH (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos)</b>	6 mg/kg
<b>PCB (compostos bifenilos policlorados)</b>	0,8 mg/kg
<b>PCDD (policlorodibenzodioxinas)</b>	100 ng TEQ/kg
<b>PCDF (furanos)</b>	100 ng TEQ/kg

Os poluentes orgânicos devem ser objeto de ações preventivas devido à:

- Degradação lenta destes compostos pelos microrganismos do solo, constituindo um risco de acumulação no solo <sup>40</sup>;
- Propensão de bioacumulação em organismos animais podendo afetar consequentemente os organismos dos seres humanos <sup>40</sup>;
- Toxicidade superior dos produtos (resultantes da degradação dos compostos orgânicos), em relação aos compostos iniciais <sup>40</sup>.



### 2.1.5. Características biológicas

Como as lamas são um produto que resulta do tratamento das águas residuais, estas apresentam características biológicas semelhantes às águas residuais, tais como bactérias, vírus <sup>49</sup>, protozoários, helmintas (vermes parasitas) <sup>14,44,50</sup>.

No entanto, em termos de saúde pública, uma das singularidades, que inspira especial preocupação é a transferência horizontal de genes entre os microrganismos, promovida pelo tratamento das águas residuais <sup>51</sup>.

Segundo o Decreto-Lei 276/2009, de 2 de Outubro, os valores limite para microrganismos, nas lamas destinadas à agricultura, são inferior a 1000 células/g de matéria fresca para a *Escherichia coli* (*E. coli*) e ausente em 50g de material original para a *Salmonella* spp. <sup>30</sup>.

## 2.2. Tratamento das Lamas de ETAR

As lamas são um produto inevitável do tratamento de águas residuais, provenientes essencialmente da acumulação dos produtos em suspensão na água residual afluyente, geralmente transformados, pelos microrganismos, durante o tratamento <sup>40</sup>.

Essencialmente, as lamas de ETAR são sujeitas a cinco fases de tratamento: tratamento preliminar, espessamento, estabilização, condicionamento e desidratação <sup>40</sup>. Este conjunto de técnicas pode representar um custo na ordem dos 30 a 50%, do custo total das atividades de uma ETAR. Este custo está dependente do grau de tratamento pretendido <sup>52,53</sup>.

### 2.2.1. Tratamento preliminar

Tal como no tratamento da fase líquida, no tratamento da fase sólida também é realizado um tratamento preliminar. Esta etapa tem como objetivos garantir um caudal homogéneo e constante, facilitar os tratamentos a efetuar posteriormente, bem como, salvaguardar o bom funcionamento do equipamento das operações subsequentes <sup>40</sup>.

Nas operações de tratamento prévio das lamas, incluem-se:

a) **Trituração** – garante a desintegração parcial do material de grandes dimensões ou filamentosos, diminuindo o risco de obstrução do equipamento <sup>40</sup>.

b) **Gradagem** – realiza a separação da fase mineral (areia) e orgânica das lamas <sup>40</sup>.

c) **Mistura prévia** – proporciona um conteúdo homogeneizado e uniformizado dos diversos tipos de lamas (primárias e secundárias), otimizando o funcionamento dos processos biológicos nas etapas subsequentes <sup>18</sup>. Esta pode ocorrer nos decantadores primários, nas condutas ou ainda nos tanques de mistura, implementados especialmente para o efeito <sup>40</sup>.

### 2.2.2. Espessamento

O processo de espessamento de lamas tem como objetivo reduzir o volume de lamas afluente aos órgãos seguintes. Desta forma, é possível reduzir as dimensões desses órgãos e, conseqüentemente, a diminuição do custo de investimento <sup>18</sup>.

As principais operações, existentes nesta fase, consistem no:

a) **Espessamento gravítico** – opera de forma simples, separando a água da lama através da decantação num tanque, geralmente de forma cilíndrica (Figura 4). Este tanque pode operar em regime *batch*, ou seja, o líquido sobrenadante é escoado após algumas horas de decantação e antes da bombagem das lamas espessadas. Em alternativa, o tanque pode operar em regime contínuo que consiste na alimentação contínua de lamas, bem como, na remoção contínua do sobrenadante e das lamas espessadas <sup>40</sup>.

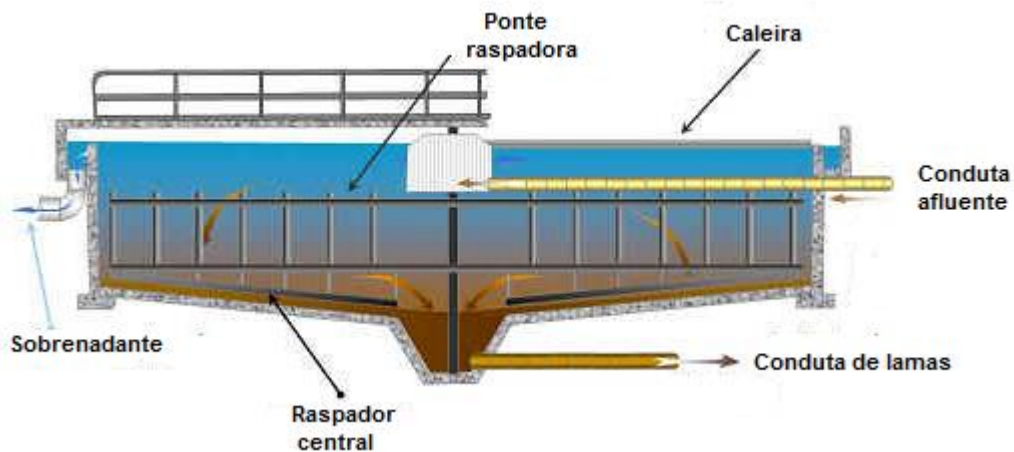


Figura 4 - Espessamento gravítico (adaptado) <sup>54</sup>

b) **Espessamento por flotação por ar dissolvido** – nesta operação o ar é injetado na lama afluente e mantido a uma pressão (superior à pressão atmosférica), antes das lamas serem transferidas para um tanque (Figura 5). O ar dissolvido é libertado imediatamente sob a forma de bolhas finas que aderem às partículas de lama. Estas partículas são arrastadas pelas bolhas e formam um manto de lamas à superfície do flotador <sup>55</sup>.

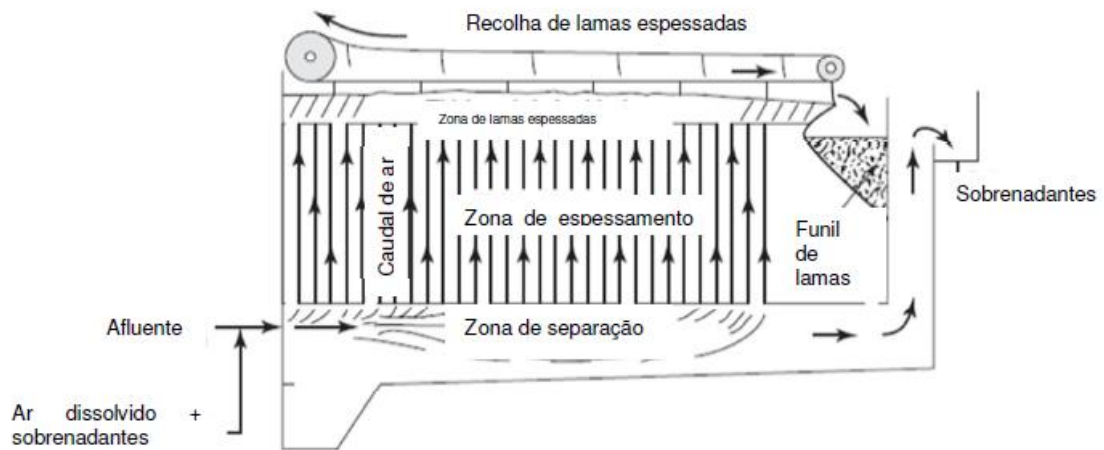


Figura 5 - Espessamento por flotação por ar dissolvido <sup>55</sup>

c) **Espessamento por centrifugação** – utilizado para espessar e desidratar lamas <sup>40</sup>. No tipo de centrífuga mais comum, o *solid bowl-scroll*, a lama é inserida continuamente, normalmente, com a adição de polímeros, sendo a centrífuga montada na horizontal e afunilada no final em forma de cone. A estrutura rotativa faz com que a lama se deposite na periferia do rolo interno, que roda a velocidades ligeiramente distintas, deslocando a lama para a zona afunilada <sup>56</sup>. Este método é mais adequado para utilização nas ETARs de grandes dimensões, dado a necessidade de processo contínuo de grandes quantidades de lamas residuais <sup>40</sup>.

d) **Espessamento por gravidade em filtros banda** – técnica mais recente de espessamento. O filtrado é escoado através de uma banda em movimento, enquanto os sólidos são retidos na superfície. A lama, ao permanecer na banda, é constantemente agitada e forçada a colidir com as saliências alinhadas desta superfície. A velocidade da banda é variável <sup>40</sup>.

e) **Espessamento em tambor rotativo** – o dispositivo é composto por tambores cilíndricos, colocados horizontalmente, um sobre outro. Geralmente, o tambor superior, com paredes impermeáveis, é responsável pelo acondicionamento e agitação das lamas. O tambor inferior, que é alimentado com a lama condicionada, em mistura com polieletrólito (aumenta taxa de sedimentação), tem paredes semipermeáveis, permitindo devido ao movimento rotacional do sistema, o escoamento por uma das extremidades <sup>40</sup>.

A água removida das lamas, em todos os tipos de espessamento, é direcionada para a etapa inicial do tratamento da fase líquida <sup>18</sup>.

### 2.2.3. Estabilização

A digestão/estabilização tem como principais objetivos evitar, reduzir ou eliminar o potencial de putrefação, remover microrganismos patogénicos e eliminar odores. Estes

fenómenos ocorrem quando os microrganismos têm capacidade de sobreviver e de se multiplicar na camada de matéria orgânica das lamas <sup>18</sup>.

Quando o destino das lamas passa pela utilização na agricultura, a redução de microrganismos patogênicos por qualquer método de estabilização, deve ser um dos principais aspetos a considerar. Por outro lado, quando o destino das lamas é a incineração, estas são previamente desidratadas, e opta-se frequentemente por não proceder à sua estabilização <sup>40</sup>.

O processo de estabilização pode ser realizado por diversas formas:

a) **Digestão aeróbia** – compreende o processo de mineralização biológica da matéria orgânica, a partir de uma fonte externa de oxigénio, da qual resultam lamas estabilizadas e dióxido de carbono <sup>18</sup>. Recentemente, a digestão aeróbia termofílica autotérmica (DATA) tem conquistado terreno no que concerne à estabilização de lamas, devido à rápida degradação do substrato orgânico, eficiente inativação dos agentes patogênicos, elevada capacidade de redução dos sólidos voláteis, baixo consumo de energia e requisitos de controlo simples <sup>57,58</sup>. A DATA é um processo exotérmico onde as lamas são submetidas a temperaturas superiores a 55°C durante um período de 6-15 dias. Os sólidos orgânicos são degradados e o calor libertado, durante a degradação por ação dos microrganismos, mantém as temperaturas termófilas <sup>59</sup>.

b) **Digestão anaeróbia** – método de estabilização mais antigo e o mais empregue nas estações de tratamento <sup>60</sup>. Compreende o processo de mineralização biológica da matéria orgânica, na ausência de oxigénio, sendo umas das principais características a valorização do biogás para produção de calor (utilizado na ETAR), e eletricidade (para uso interno e venda à rede de distribuição de eletricidade) <sup>18,31</sup>. A digestão anaeróbia ocorre em três fases sequenciais: a fase hidrolítica, a fase acidogénea e a fase metanogénea <sup>9</sup>. Na fase hidrolítica ocorre a hidrólise dos complexos orgânicos sólidos, celulose, proteínas e lípidos que pela ação de enzimas extracelulares são degradados a formas solúveis, ácidos gordos orgânicos, álcoois, dióxido de carbono e amónia. Na fase acidogénea, as bactérias acidogéneas transformam os compostos da fase hidrolítica em ácido acético, ácido propiónico, hidrogénio, dióxido de carbono, sulfureto de hidrogénio e em compostos orgânicos de baixo peso molecular. Na fase metanogénea, por ação das bactérias metanogéneas, ocorre a conversão dos compostos obtidos na fase anterior em dióxido de carbono e metano. Assim, o biogás produzido, devido ao metano, permite a valorização energética das lamas <sup>39,61</sup>.

c) **Esterilização química por adição de cal** – a aplicação de cal não reduz a matéria orgânica das lamas. Mas a sua ação de estabilização/desinfecção dos microrganismos, presentes nas lamas, é evidenciada quer pela simples elevação de pH

das mesmas (para valores superiores a 12) com a utilização de cal hidratada, quer pela conjugação deste fenómeno com o aumento da temperatura (para valores superiores a 60°C) com a utilização de cal viva<sup>18</sup>. A estabilização de lamas via química com a utilização de cloro, ozono, peróxido de hidrogénio e permanganato de potássio, também é possível, porém em pequena escala<sup>40</sup>.

d) **Esterilização térmica** – consiste em reduzir o teor de humidade das lamas por adição de calor (através da evaporação da água), até um teor desejado que pode chegar aos 90%. Desta forma, alcança-se um produto quase sólido com cerca de 75 a 95% de matéria seca, de textura geralmente granular, adequado a vários finais. Além disso, também permite estabilizar e higienizar as lamas, bem como, facilitar a sua valorização orgânica ou a sua incineração, e custos associados ao tratamento das lamas<sup>18</sup>.

e) **Compostagem** – consiste no processo de degradação biológica aeróbia de resíduos até à sua estabilização, produzindo uma substância húmica (composto) que permite a correção de solos<sup>18</sup>. Assim sendo, além da obtenção de um produto estável (que não seja suscetível de repentina evolução biológica), obtém-se um produto maturado e que seja compatível (não fitotóxico) com a sua aplicação na agricultura como corretivo orgânico dos solos; a compostagem, também, deve permitir a eliminação de maus odores, a redução de volume e de massa e a inativação de microrganismos patogénicos (higienização) da matriz inicial<sup>40,62,63</sup>.

### 2.2.4. Condicionamento

O condicionamento de lamas consiste num tratamento utilizado para otimizar a eficiência do espessamento e da desidratação<sup>64</sup>. Esta operação pode ser realizada da seguinte forma:

a) **Condicionamento químico** – é o mais conhecido e frequentemente aplicado em condicionamento de lamas. Consiste na adição de produtos químicos inorgânicos ou polieletrólitos<sup>65</sup>, cujo mecanismo de ação é a destabilização da carga iónica dos sólidos contidos na lama, permitindo a agregação das partículas de menores dimensões em flocos maiores com subsequente libertação de água adsorvida<sup>40</sup>.

b) **Condicionamento térmico** – é processado em autoclaves, sujeitando as lamas a uma pressão fixa e a temperaturas na ordem dos 200°C durante períodos de tempo variáveis, de 30 a 90 minutos, conseguindo-se com este tratamento a destruição da estrutura coloidal das lamas e a solubilização de algumas matérias em suspensão. Este tipo de condicionamento é o menos utilizado devido a sua complexidade técnica e o rigor no controlo dos parâmetros<sup>40</sup>.

c) **Congelação** – muito eficaz, porém é considerada uma solução com um custo muito elevado <sup>65</sup>.

### **2.2.5. Desidratação**

A desidratação tem como finalidade retirar o máximo de água presente nas lamas, tendo em atenção a relação custo/benefício. As vantagens relacionam-se com as facilidades de manuseamento e com o menor custo de transporte das lamas para o destino final. As lamas desidratadas são provisoriamente armazenadas em silos ou contentores até que estas sejam encaminhadas para valorização ou destino final adequado <sup>18</sup>.

Diversos tipos de processos são aplicados para a desidratação de lamas, tais como, processos naturais (baseados nos fenómenos de evaporação e/ou de percolação), ou processos mecânicos (baseados em utilização de meios físicos) que requerem a utilização de energia externa <sup>40</sup>.

## **2.3. Destinos Finais de Lamas de ETAR**

Como mencionado anteriormente, o tratamento das águas residuais gera, como subproduto, grandes quantidades de resíduos, as lamas residuais <sup>66</sup>. Desta forma, é imperativo a correta gestão destes subprodutos quer a nível ambiental, quer a nível de saúde pública <sup>67</sup>.

Tal como no tratamento de águas residuais, o destino final (ou destinos finais) deve determinar o método a utilizar para o condicionamento e tratamento das lamas. No passado era prática comum a deposição no mar de lamas provenientes de estações situadas na orla costeira. Esta prática foi abolida, a partir de 1998, pela Diretiva 91/271/CEE <sup>64</sup>.

Assim foi necessário encontrar outras alternativas. Atualmente são conhecidas e praticadas, em larga escala, as seguintes soluções <sup>40,66</sup>:

- ❖ Deposição em aterros sanitários;
- ❖ Valorização agrícola:
  - Solos agrícolas (recuperação / melhoramento);
  - Florestas (recuperação de solos e /ou reflorestação);
  - Estradas (recuperação/sementeira de taludes), outras áreas verdes;
  - Recobrimento de aterros sanitários (recuperação paisagística).
- ❖ Valorização energética (valor calorífico para a produção de energia);
- ❖ Construção civil (cimento, fabrico de tijolos ou cerâmica, incorpora 20% de lama).

### 2.3.1. Deposição em aterro sanitário

Os aterros sanitários foram, até recentemente, o destino final de eleição de muitas lamas de ETAR, produzidas tanto em Portugal como em outros países europeus (Figura 6) <sup>61</sup>.

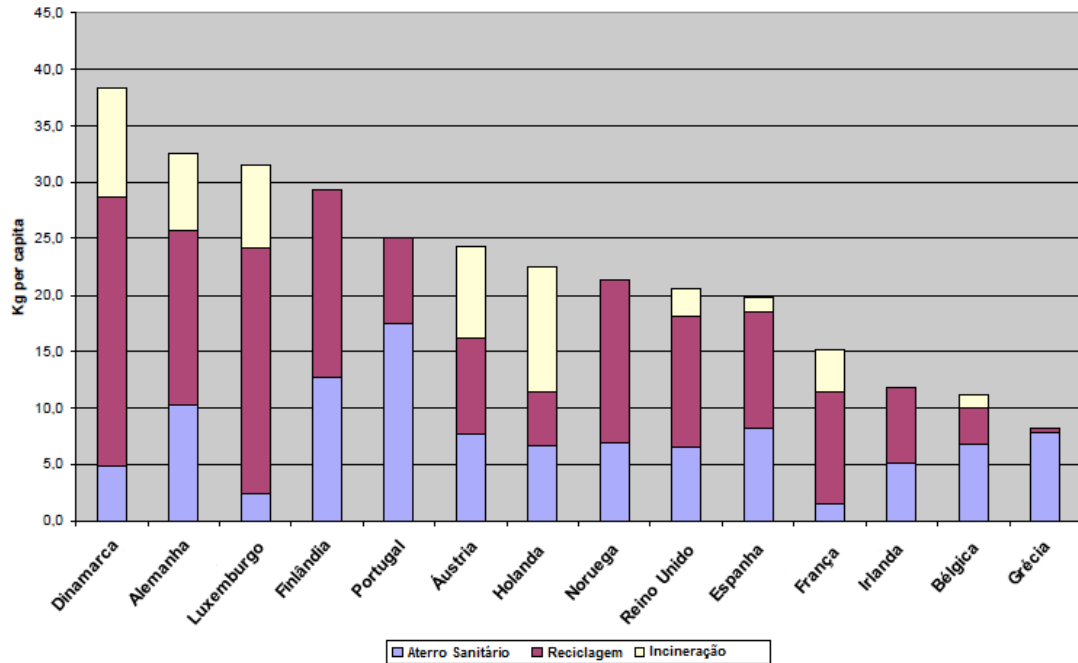


Figura 6 - Destino final de lamas de ETAR produzidas em diversos Estados-Membros, em 1998 (adaptado)<sup>35</sup>

Contudo, a deposição de lamas em aterros sanitários entrou em declínio “induzido”, tanto em Portugal como na maior parte dos países europeus <sup>61</sup>. Uma vez que atravessamos uma Era em que o desenvolvimento sustentável é um conceito primordial, a tendência é a de limitar cada vez mais o depósito em aterros, de materiais eventualmente recicláveis ou valorizáveis por outras vias <sup>40,68</sup>. Nomeadamente os resíduos orgânicos e, em particular as lamas de ETAR, que imposto pelo Decreto-Lei 152/2002, de 23 de Maio, tem fixado um limite de redução em 50% em 2009 e 35% em 2016 <sup>69</sup>.

A opção de deposição de lamas em aterro só deverá ser considerada quando a presença de substâncias tóxicas ou metais pesados inviabilizem a sua valorização <sup>40</sup>.

Todo este processo, de depósito em aterro, exige uma correta monitorização, devido aos riscos associados. Designadamente riscos de contaminação das águas subterrâneas por lixiviação e a produção de odores desagradáveis, pela geração de condições anaeróbias e sépticas, bem como, a produção de gases com efeito de estufa <sup>50,70</sup>.

### 2.3.2. Incineração

A incineração, embora represente, um destino final de lamas de ETAR, não o será na íntegra, pois há geração de um outro resíduo: as cinzas. Assim, esta opção poderá ser



vista como uma forma incompleta de eliminação do resíduo, ainda que seja um método que permita uma redução significativa do volume do material e origine a destruição dos organismos patogênicos e substâncias orgânicas perigosas, transformando a lama em cinzas<sup>71,72</sup>. Cinzas estas, que deverão ser posteriormente submetidas a um tratamento complementar, que quando concluído podem ser incorporadas em alguns produtos, nomeadamente em materiais de construção, tais como, tijolos e/ou outros materiais cerâmicos<sup>71,73</sup>.

### 2.3.3. Valorização agrícola

Em resultado da menor disponibilidade e viabilidade de outras opções de destino final, tem sido prática comum, há várias décadas, a utilização de lamas tratadas na agricultura<sup>66,74,75</sup>.

As lamas, devidamente tratadas e tipificadas, que garantam um conjunto de requisitos de qualidade para aplicação em solos agrícolas, podem designar-se por bioestabilizados. Os bioestabilizados, de acordo com a regulamentação US EPA (*United States Environmental Protection Agency*), podem ser classificados, em função da presença de microrganismos patogênicos, em bioestabilizados de classe A e os bioestabilizados de classe B<sup>66,74</sup>.

De acordo com os processos de tratamento da fase líquida e dos processos de tratamento da fase sólida, as lamas de depuração podem ser tipificadas (Figura 7)<sup>40</sup>.

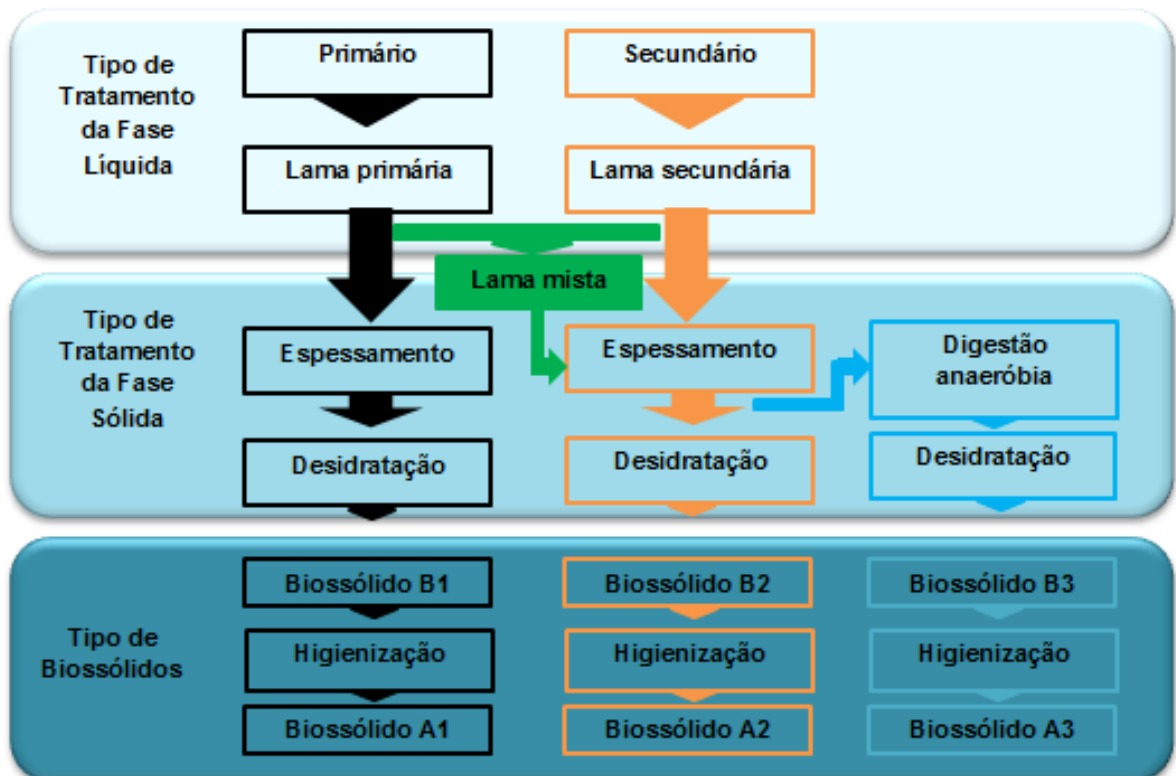


Figura 7 - Classes de bioestabilizados em função dos tratamentos a que são submetidas as lamas (adaptado)<sup>40</sup>



No caso dos bioossólidos de classe A, estes devem ser sujeitos a tratamentos que promovam a redução dos patogénicos para valores não detetáveis. Por outro lado, os bioossólidos de classe B devem ser sujeitos a tratamentos que promovam a redução dos microrganismos patogénicos para valores que não afetem a saúde pública e o ambiente em geral. Desta forma, o grau de segurança da aplicação dos bioossólidos de classe A é mais elevado <sup>57,76</sup>.

O interesse acrescido da agricultura, pelos bioossólidos provenientes das lamas de ETAR devidamente tratadas, assenta fundamentalmente no potencial de utilização da sua matéria orgânica e valorização do seu poder nutritivo <sup>62,76</sup>. Assim, são várias as ações benéficas proporcionadas pela aplicação de bioossólidos, nomeadamente a correção dos solos, que passa pela melhoria da estrutura do solo, aumento da sua estabilidade, bem como, a contribuição para intensificação da capacidade de troca catiónica do solo, melhorando a atividade microbiana com efeitos benéficos na dinâmica de alguns nutrientes, especialmente o azoto e o enxofre <sup>44,77</sup>.

Além disso, impulsiona, o aumento da eficácia da adubação, origina inativação de alguns metais pesados e, proporcionando um acréscimo de matéria orgânica, melhora consideravelmente a fertilidade e produtividade dos solos <sup>47,62,78</sup>. Desta forma, aumenta o seu campo de utilizações, nomeadamente, em áreas como silvicultura, sobretudo na reflorestação de zonas consumidas pelos fogos florestais, recuperação de solos nas zonas de exploração mineira, jardinagem e cultivo de plantas ornamentais <sup>63</sup>, obras de estabilização de taludes, revestimento vegetal da cobertura dos aterros sanitários e outras aplicações, assegurando a proteção contra a degradação erosiva <sup>40</sup>.

Relativamente a Portugal, o uso de bioossólidos como fertilizante orgânico é considerado um destino final de eleição, pois o solo manifesta características ácidas (Figura 8) e é maioritariamente pobre em matéria orgânica <sup>79</sup>. Escassos são os solos em Portugal com boa aptidão agrícola sendo a principal causa da degradação do solo, em Portugal Continental, a erosão provocada pela precipitação (o clima mediterrâneo é caracterizado por distribuição irregular de chuva e ocorrência de secas, geralmente ocorrendo a precipitação mais intensa em períodos não vegetativos). A maioria dos solos em Portugal Continental, com exceção das áreas de agricultura mais intensiva, como por exemplo a região de Entre Douro e Minho, apresenta baixos níveis de matéria orgânica, o que resulta dos sistemas de agricultura praticados e das técnicas culturais <sup>80</sup>.

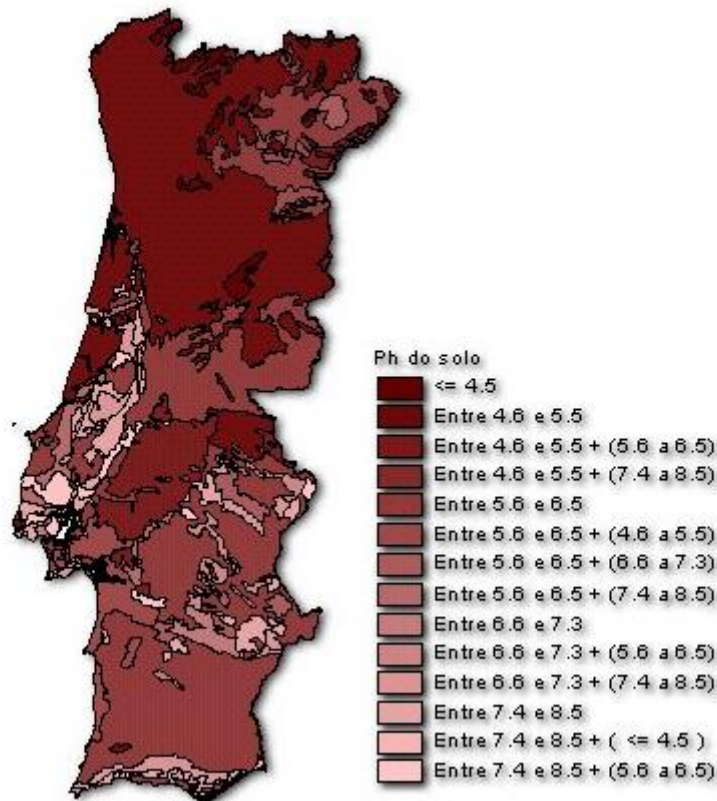


Figura 8 - Acidez e alcalinidade dos solos em Portugal Continental <sup>81</sup>

No entanto, as lamas de ETAR, apesar de possuírem muitos compostos de interesse agrícola – matéria orgânica, azoto, fósforo e potássio, ou em menor escala, cálcio, enxofre, magnésio, também contêm poluentes. Estes poluentes estão, geralmente, associados a metais pesados, compostos orgânicos e microrganismos patogénicos. Concentrações excessivas destes poluentes em lamas, bem como, no solo (quando aplicadas), acarretam graves riscos para a saúde pública e ambiente em geral <sup>40,78</sup>.

No sentido de prevenir estes riscos, a utilização agrícola dos biossólidos está devidamente regulamentada por parte das diretivas comunitárias, bem como, pela legislação portuguesa, nomeadamente pelo Decreto-Lei 276/2009, de 2 de Outubro <sup>30</sup>.

#### 2.3.4. Valorização energética

No que diz respeito a recursos energéticos, Portugal, em comparação com a maioria dos países desenvolvidos que asseguram a generalidade das necessidades energéticas através do petróleo, do carvão e do gás natural, apresenta-se como um país com escassos recursos energéticos de fonte endógena <sup>40</sup>. Em 2013, Portugal foi o 8º país com maior dependência energética do exterior em relação ao conjunto de países da UE –

28 (Figura 9). Desta forma, um dos principais desafios e objetivos da atual política energética prende-se com a redução da dependência energética do exterior <sup>82</sup>.

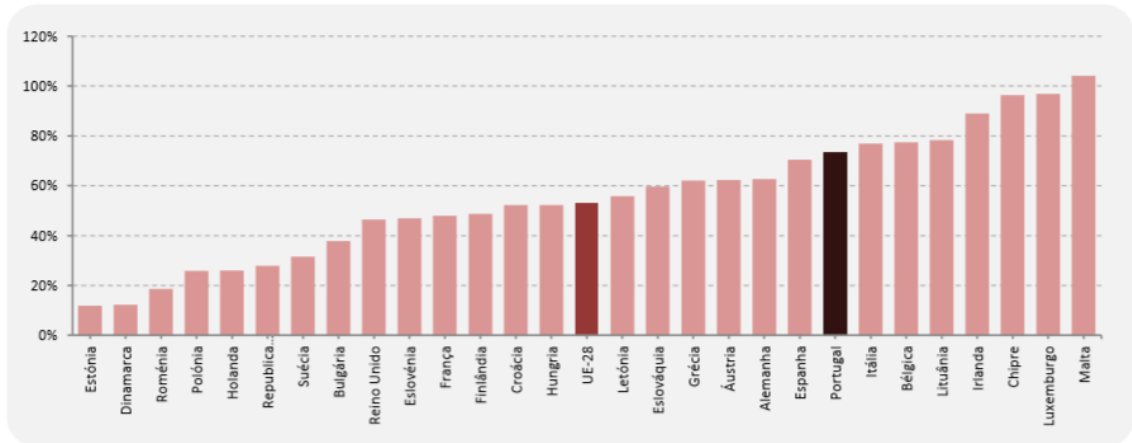


Figura 9 - Dependência Energética na UE-28 em 2013 <sup>82</sup>

Historicamente, Portugal apresenta uma dependência energética elevada, entre 80 e 90%, consequência da inexistência de produção nacional de fontes de energia fósseis que têm um peso muito significativo no consumo de energia. O investimento progressivo em energias renováveis e na eficiência energética, realizado no país desde meados da década de 2000, tem contribuído para a diminuição do grau de dependência energética face ao exterior. Segundo as estatísticas divulgadas pela Direcção-Geral de Energia e Geologia (DGEG) no seu balanço energético sintético relativo ao ano de 2013, o índice de dependência energética, em 2013, foi de 73,9% (Figura 10) o que representa uma descida de 5,5 pontos percentuais face a 2012 e uma descida de 14,9 pontos percentuais face a 2005. Esta redução deveu-se à diminuição do consumo de fontes de energia fósseis e consequentemente ao aumento da produção de energia doméstica. Os maiores contributos vieram da produção hídrica e eólica <sup>82</sup>.

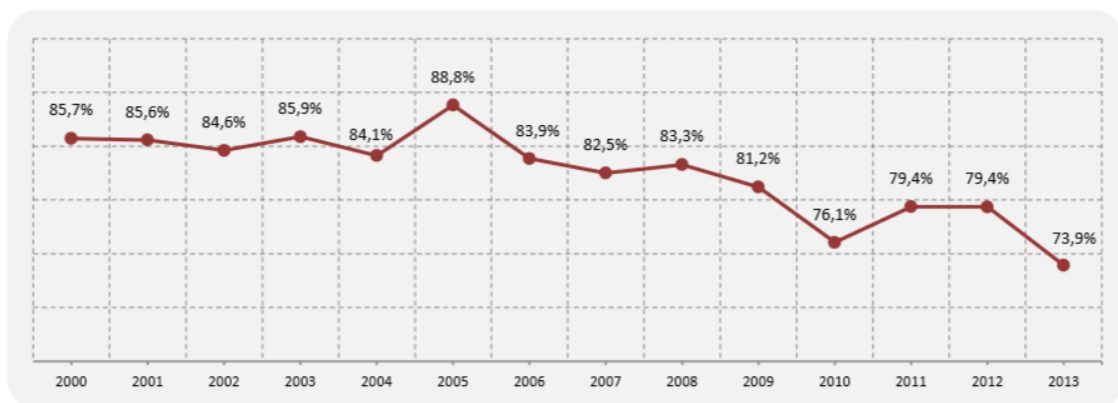


Figura 10 - Evolução da dependência energética de Portugal <sup>82</sup>

Nesta perspetiva, a valorização energética das lamas de ETAR, através da produção de biogás, assume-se como um eventual destino alternativo de escoamento, bem como, um processo verde sustentável que converte resíduos em energia. <sup>83,84</sup>.

### 2.4. Legislação

Como já referido anteriormente, as lamas de ETAR apresentam várias propriedades benéficas, no entanto, também apresentam propriedades prejudiciais. Desta forma, é imperativo uma legislação adequada para obter o maior benefício possível das lamas.

A legislação que regulamenta as lamas de ETAR, a nível comunitário e nacional, é:

- Diretiva 86/278/CEE;
- Decreto-lei nº. 446/1991, de 22 de Novembro e Decreto-lei nº. 118/2006, de 21 de Junho;
- Decreto-lei nº. 276/2009, de 2 de Outubro.

#### 2.4.1. Diretiva 86/278/CEE

A Diretiva 86/278/CEE referente à proteção do ambiente, e em especial dos solos, na utilização agrícola de lamas de depuração, foi implementada há 29 anos, tendo como objetivo incentivar a aplicação correta de lamas de depuração na agricultura, bem como, regular o seu uso de forma a diminuir os efeitos nocivos nos solos, vegetação, animais e seres humanos <sup>85</sup>. As principais disposições da Diretiva são:

- **Artigo 4º:** valores relativos às concentrações de metais pesados nos solos recetores de lamas, às concentrações de metais pesados nas lamas e às quantidades máximas anuais destes metais pesados que podem ser introduzidas nos solos de utilização agrícola <sup>85</sup>.
- **Artigo 5º:** proibição da utilização de lamas sempre que a concentração de um ou vários metais pesados nos solos ultrapasse os valores-limite <sup>85</sup>.
- **Artigo 6º:** obrigatoriedade do tratamento das lamas <sup>85</sup>.
- **Artigo 7º:** proibição da aplicação das lamas em determinadas culturas e antes de expirar um certo prazo <sup>85</sup>.
- **Artigo 8º:** utilização das lamas deve ter em conta as necessidades nutricionais das plantas <sup>85</sup>.
- **Artigo 9º:** métodos de referência de amostragem e de análise dos solos e das lamas <sup>85</sup>.
- **Artigo 10º:** obrigação de os estados-membros em manterem registos atualizados sobre as quantidades de lamas produzidas e as entregas à agricultura, os locais de utilização das lamas e outras informações <sup>85</sup>.
- **Artigo 17º:** requisitos respeitantes à apresentação de relatórios <sup>85</sup>.

#### **2.4.2. Decreto-lei nº. 446/91, de 22 de Novembro e Decreto-lei nº. 118/2006, de 21 de Junho**

Inicialmente, o Decreto-lei nº. 446/91, de 22 de Novembro transpôs para a ordem jurídica interna a Diretiva nº. 86/278/CEE, do Conselho, de 12 de Junho, sendo posteriormente atualizado pelo Decreto-lei nº. 118/2006, de 21 de Junho e mais tarde atualizado, pelo atual decreto-lei em vigor, Decreto-lei nº. 276/2009, de 2 de Outubro <sup>30,86,87</sup>.

Estas atualizações foram importantes por forma a adequar e tornar mais simples o procedimento de licenciamento da utilização agrícola das lamas de depuração nele previsto e a harmonizá-lo com outros regimes jurídicos entretanto aprovados, designadamente o regime geral dos resíduos, aprovado pelo Decreto- Lei n.º 178/2006, de 5 de Setembro, e o regime de proteção das albufeiras de águas públicas de serviço público e das lagoas ou lagos de águas públicas, aprovado pelo Decreto-Lei n.º 107/2009, de 15 de Maio <sup>30</sup>.

#### **2.4.3. Decreto-lei nº. 276/2009, de 2 de Outubro**

O Decreto-lei nº. 276/2009, de 2 de Outubro, é o atual diploma que legisla a lamas de ETAR e a alteração mais significativa introduzida consubstancia -se na simplificação e agilização do procedimento de licenciamento da atividade, facilitando o respetivo exercício, sem, no entanto, descuidar as exigências crescentes do ponto de vista da salvaguarda dos valores ambientais e da saúde humana <sup>30</sup>.

O licenciamento da utilização agrícola das lamas de depuração passa a ter por base o plano de gestão de lamas que, entre outros aspetos, identifica as explorações onde se prevê realizar as respetivas aplicações. O referido plano é complementado pela declaração anual do planeamento das operações, que define as parcelas a utilizar. A introdução destes instrumentos e planeamento e gestão, cujo cumprimento fica a cargo de um técnico responsável acreditado de acordo com um conjunto concreto de requisitos, obvia a necessidade de licenciamento por proveniência e destino das lamas – o que, de resto, se traduzia, na prática, numa multiplicidade de processos autorizativos. O novo modelo de licenciamento permite ainda antecipar e prevenir situações de deposição de lamas incompatíveis com os objetivos de salvaguarda do ambiente e da saúde pública <sup>30</sup>.

### **2.5. ETARI, um luxo ou uma precaução?**

As águas residuais hospitalares resultam do funcionamento dos serviços e instalações dos hospitais, e podem dividir-se em:

- **Águas residuais hospitalares domésticas** – são todas as que são produzidas nas zonas de Serviços de Apoio, nomeadamente Serviços Administrativos, Conselhos de Administração, Bares e Refeitório <sup>88</sup>.

- **Águas residuais hospitalares poluídas** – incluem todos os efluentes em que é comum o aparecimento de compostos químicos, nomeadamente gorduras, metais, etc., os

quais alteram significativamente as características típicas de um efluente doméstico, obrigam à aplicação de tratamentos físico e/ou químicos específicos <sup>88</sup>.

- **Águas residuais hospitalares infetadas** – incluem todos os efluentes em que existem componentes biológicos e/ou microbiológicos, que alteram significativamente as características típicas de um efluente doméstico, tais como restos de sangue e outros fluídos orgânicos, onde podem existir agentes patogénicos, e estirpes multirresistentes <sup>88</sup>.

Em Portugal, não existe legislação específica relativamente à gestão das águas residuais hospitalares, existindo apenas legislação no que concerne aos resíduos hospitalares.

Segundo o estudo da Caracterização Quantitativa e Qualitativa das Águas Residuais dos Hospitais do Serviço Nacional de Saúde, elaborado pelo Laboratório Nacional de Engenharia Civil (LNEC), em 2003: “ (...) não foram obtidos dados ou informações que indiquem, que na atual situação, os efluentes hospitalares devam ser motivo de preocupação quanto aos seus impactos no ambiente e saúde pública, sempre que as respetivas descargas sejam devidamente tratadas nas ETARs municipais, ou noutras, antes de serem libertadas para o meio ambiente.” <sup>88</sup>.

Mas será que este estudo espelha a atual realidade, tendo em consideração a evolução da resistência dos microrganismos aos antibióticos? Será que as atuais configurações das ETARs estão preparadas para tratar eficientemente as águas residuais hospitalares poluídas e infecciosas? Em que medida estes microrganismos e agentes químicos influenciam o tratamento biológico?

São inúmeras as questões relativamente à gestão das águas residuais hospitalares, primeiramente seria de extrema importância a realização de estudos que permitam obter um maior conhecimento sobre esta temática. A partir destes estudos, iniciar a adequada regulamentação. Além disso, ter em consideração a contribuição da colonização intestinal com isolados multirresistentes dos pacientes, não considerando apenas os efluentes com restos de sangue e fluídos orgânicos, mas no geral as águas negras das instituições de prestação de cuidados de saúde.

Em 2005, foram elaboradas recomendações para a gestão das águas residuais hospitalares pela Direção-Geral das Instalações e Equipamentos da Saúde que não estão completamente em prática, e não havendo legislação específica, alguns hospitais (senão a maioria) acabam por não dar a devida importância, devido, em muito, à atual conjuntura económica que o País atravessa <sup>88</sup>.

O primeiro passo (tendo em conta a falta de informação, seria uma medida de precaução) podia passar pela instalação da Estação de Tratamento de Águas Residuais

Infetadas (ETARI) nos hospitais com a valência de doenças infecto-contagiosas. Assim, estas águas seriam sujeitas a um pré-tratamento e só depois lançadas na rede urbana.

## **2.6. Lamas de ETAR como via de disseminação de bactérias resistentes aos antibióticos**

A libertação de fármacos para o meio ambiente tem ocorrido há várias décadas, porém só recentemente foi iniciado o estudo dos seus possíveis efeitos. A lista dos fármacos detetados é extensa e envolve praticamente todo o tipo de compostos (tais como os antibióticos). Devido à sua ocorrência em quantidades vestigiais, a presença de fármacos como poluentes, no meio ambiente, tem sido negligenciada nos últimos anos <sup>89,90</sup>. No entanto, pesquisas recentes sugerem que mesmo em baixas concentrações, os fármacos, podem exercer efeitos adversos, tanto na saúde humana como nos ecossistemas <sup>89,91</sup>.

Parte dos fármacos ou produtos resultantes do seu metabolismo ou da sua degradação, após administração em humanos, são excretados nas fezes e urina, sendo encaminhados para a ETAR. Uma ETAR a funcionar normalmente, apesar de reduzir a carga microbiana (cuja eficiência depende da configuração da ETAR), pode não eliminar as bactérias resistentes aos antibióticos e estes locais de tratamento podem contribuir para a disseminação/proliferação destes microrganismos e/ou dos seus genes <sup>92-94</sup>. Para além da seleção das bactérias resistentes aos antibióticos, também a transferência horizontal de genes pode contribuir para a obtenção de elevadas percentagens de bactérias resistentes a antibióticos em águas residuais <sup>92,93,95</sup>.

Assim, os efluentes das ETARs poderão ser a mais importante via de entrada de bactérias resistentes nos meios recetores hídricos. Para além dos efluentes, as lamas produzidas nas ETARs são também passíveis de conter elevados níveis destes poluentes que, ao serem aplicadas nos solos, podem por sua vez contaminar os aquíferos <sup>89,92</sup>.

## **3. *Enterobacteriaceae***

A *Enterobacteriaceae* é a maior e mais heterogénea família de bacilos Gram-negativos (a principal diferença entre bactérias Gram-negativas e Gram-positivas centra-se na parede celular) (Figura 11). Cinquenta géneros e centenas de espécies e subespécies foram descritas <sup>96,97</sup>.

Os membros desta família apresentam as seguintes características <sup>96</sup>:

- Bacilos Gram-negativos de tamanho moderado (0.3 a 1.0 × 1.0 a 6.0 µm);
- Podem ser móveis (com flagelos peritricos uniformemente distribuídos pela célula) ou imóveis;
- Não esporulados;



- Podem apresentar cápsula (por exemplo, *Klebsiella*);
- Podem crescer rapidamente, aerobicamente ou anaerobicamente (anaeróbios facultativos), em meios não-seletivos (por exemplo, gelose de sangue) e em meios seletivos (por exemplo, MacConkey agar);
- Requerimentos nutricionais muito simples;
- Fermentam a glicose;
- Reduzem nitratos a nitritos;
- Catalase positiva;
- Oxidase negativa;
- Algumas estirpes fermentam a lactose (por exemplo, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Serratia*).

A distribuição das *Enterobacteriaceae* é ubíqua, presente globalmente, em vários nichos como solo, água e plantas, e é colonizadora do trato intestinal de vários animais, incluindo o Homem <sup>96</sup>.

Esta família é responsável por uma grande variedade de patologias humanas e animais, nomeadamente infeções no trato urinário e intestinal, meningite, pneumonia e septicemia <sup>96,97</sup>. No tratamento de infeções, por *Enterobacteriaceae*, os antibióticos mais utilizados são os  $\beta$ -lactâmicos <sup>98</sup>.

As espécies desta família com maior relevância clínica são *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), geralmente, associadas a infeções nosocomiais e na comunidade <sup>98</sup>. Estas espécies têm demonstrado uma crescente resistência aos antibióticos, devido, essencialmente, à produção de  $\beta$ -lactamases de espectro alargado (ESBLs) e carbapenemases <sup>98-100</sup>.



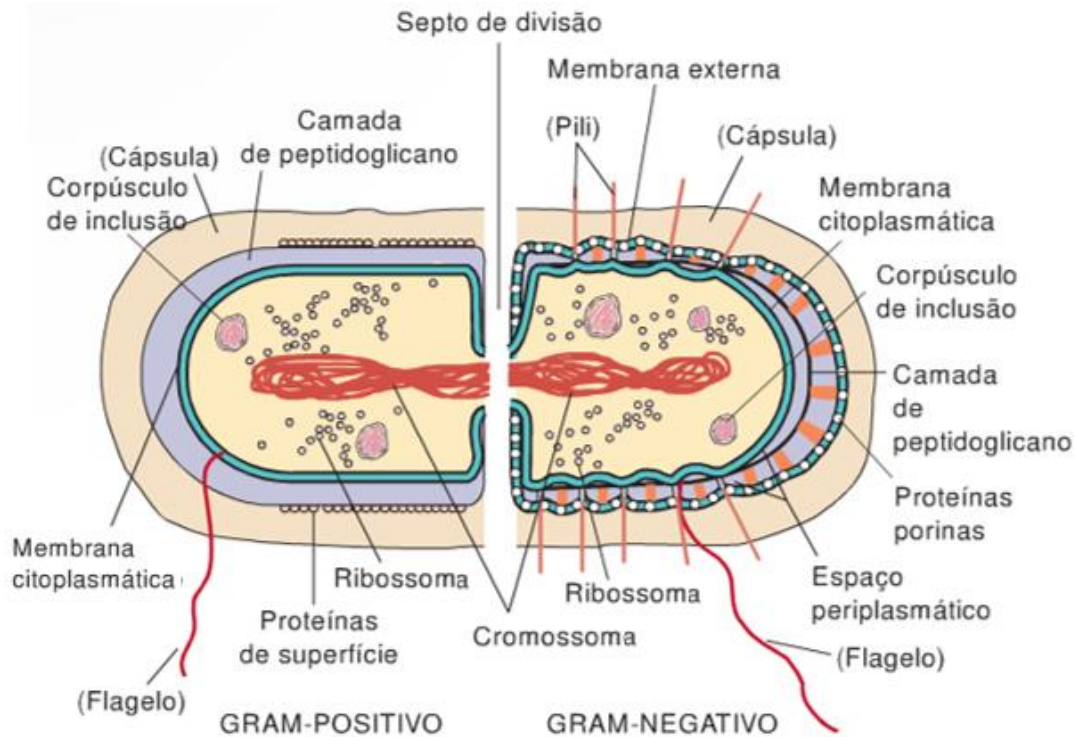


Figura 11 - Diferença entre bactérias Gram-positivas (esquerda) e Gram-negativas (direita). A bactéria Gram-positiva tem uma camada espessa de peptidoglicano (cor púrpura). A bactéria Gram-negativa apresenta uma fina camada de peptidoglicano (linha preta) e uma membrana externa. As estruturas entre parênteses não são encontradas em todas as bactérias (adaptado)<sup>96</sup>

### 3.1. *Escherichia coli*

*E. coli* é a mais comum e o membro mais importante do género *Escherichia*, sendo uma colonizadora comensal do trato gastrointestinal do Homem e de muitos animais. Esta relação entre bactéria e hospedeiro é simbiótica, no entanto, a perda e ganho de genes conferiu, a este microrganismo, fatores de virulência, tornando-o num agente patogénico oportunista<sup>96,101</sup>.

Algumas estirpes patogénicas de *E. coli* podem originar infeções no sistema gastrointestinal, designadas por *E. coli* intestinais, enquanto outras podem originar infeções extraintestinais, designadas por *E. coli* extraintestinais (ExPEC)<sup>101</sup>.

*E. coli* é a principal causa de infeções no trato urinário, seja nosocomial ou adquirida na comunidade. É, também, frequentemente associada a infeções nos tecidos moles (por exemplo, peritonite) e no sistema nervoso central (por exemplo, meningite neonatal). O impacto destas infeções, a nível mundial, é muito relevante, com centenas de milhões de pessoas afetadas anualmente e com considerável morbidade e mortalidade em casos de complicação, como a septicemia<sup>96,101</sup>.

Uma das principais preocupações, relativamente às estirpes patogénicas de *E. coli*, é o aumento constante, ao longo dos últimos 20 anos, da resistência aos antibióticos devido à produção de ESBLs. Evidências sugerem que o aumento da resistência está relacionado

com a disseminação mundial, desde 2008, de um clone específico de *E. coli* – *E. coli* sequence type 131<sup>101,102</sup>.

### **3.2. *Klebsiella pneumoniae***

*K. pneumoniae* apresenta uma distribuição ubíqua sendo encontrada em vários nichos como solo, águas e plantas, e é colonizadora do trato gastrointestinal, da pele e da nasofaringe do Homem<sup>103,104</sup>. É um dos principais agentes responsáveis por infecções nosocomiais como pneumonia, sépsis neonatal, infecção dos tecidos moles e do trato urinário<sup>103</sup>. É também um importante agente associado a infecções na comunidade, incluindo abscesso hepático piogénico, pneumonia e meningite<sup>103,104</sup>.

Os principais fatores de virulência associados são sideróforos, cápsula polisacarídica, lipopolissacarídeos e fímbrias<sup>103,105</sup>.

A resistência aos antibióticos da *K. pneumoniae* representa um grave problema para a saúde humana, devido a uma elevada prevalência da resistência aos  $\beta$ -lactâmicos (por intermédio, das ESBLs) e aos carbapenemos (por intermédio, das carbapenemases)<sup>103</sup>.

## **4. Antibióticos**

Em 1928, Alexander Fleming fez uma descoberta importante na área farmacológica, ao verificar a inibição de uma cultura bacteriana de *Staphylococcus aureus* pela ação do fungo *Penicillium notatum*. Surgiu assim a penicilina que algumas décadas depois, passou a ser produzida em larga escala, inaugurando uma nova era para a medicina, denominada a “era dos antibióticos”<sup>9,106</sup>.

A maior parte dos antibióticos naturais são produzidos por espécies de *Streptomyces* (bactérias filamentosas, geralmente presentes no solo). Uma pequena fração é produzida a partir de bactérias formadoras de endosporos, como *Bacillus*, e outros a partir de fungos (geralmente do género *Penicillium* e *Cephalosporium*)<sup>9</sup>.

Os antibióticos podem ser classificados segundo a sua atividade bactericida ou bacteriostática<sup>107</sup>. Ou podem ser agrupados segundo o seu mecanismo de ação, ou seja, sobre o local da bactéria onde é exercido o seu efeito antibacteriano (Figura 12)<sup>9</sup>.

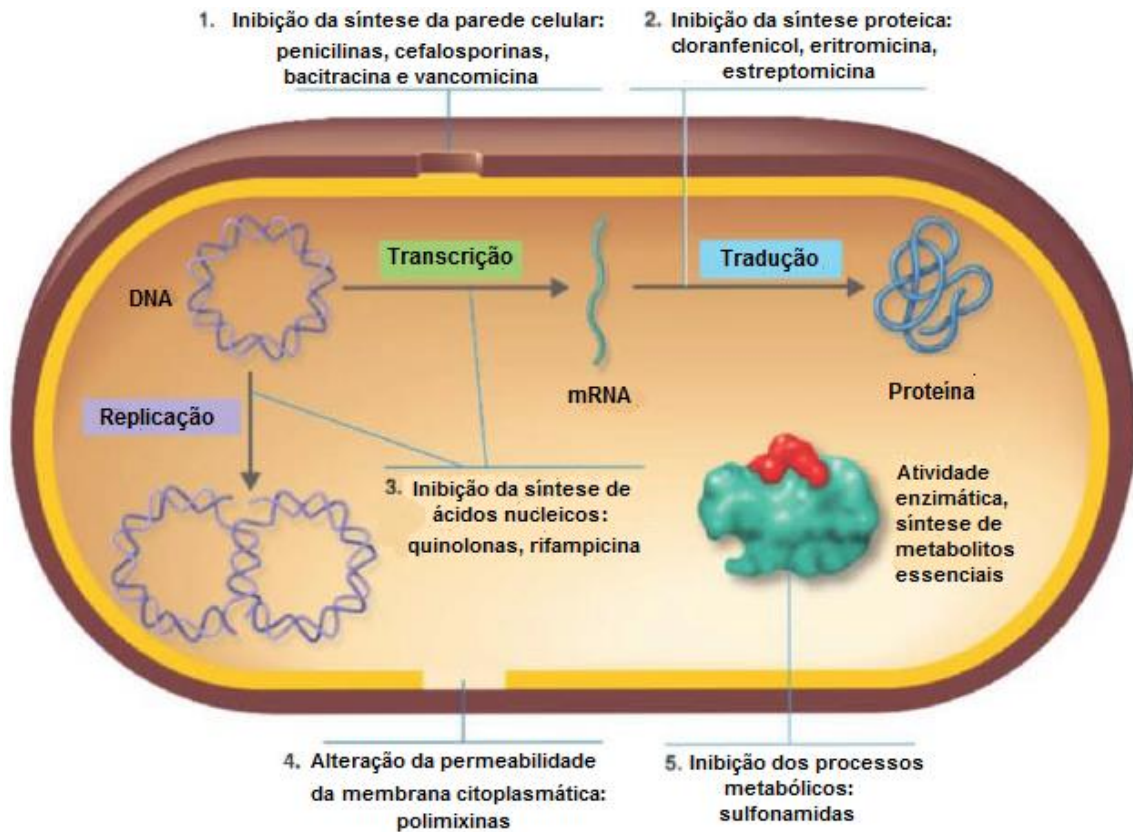


Figura 12 - Mecanismos de ação dos agentes antimicrobianos (adaptado)<sup>9</sup>

**i. Inibição da síntese da parede celular:** A maioria das bactérias é revestida por uma parede celular, em que um dos seus constituintes é designado de peptidoglicano. O peptidoglicano está presente exclusivamente nas bactérias, tornando-o num alvo de toxicidade seletiva. Desta forma, a ação farmacológica destes antibióticos (penicilinas, cefalosporinas, bacitracina, vancomicina) relaciona-se com a inibição da síntese do peptidoglicano. Ou seja, impedem a síntese do peptidoglicano, e consequentemente a parede celular é muito enfraquecida e a célula sofre lise<sup>9</sup>.

**ii. Alteração da permeabilidade da membrana citoplasmática:** Certos antibióticos, especialmente polipéptidos, alteram a permeabilidade da membrana citoplasmática, resultando na perda de metabolitos importantes para a célula bacteriana<sup>9</sup>.

**iii. Inibição da síntese proteica:** É nos ribossomas das bactérias, que é realizada a tradução do ARNm, que permite a síntese das proteínas. Os ribossomas das bactérias são estruturalmente diferentes dos ribossomas dos eucariotas. As bactérias possuem duas subunidades 30S e 50S (70S), enquanto os ribossomas dos eucariotas consistem em duas subunidades 40S e 60S (80S)<sup>9</sup>. Os antibióticos, cujo mecanismo de ação consiste em interferir na síntese de proteínas, ligam-se às duas subunidades ribossomais, interferindo com uma das quatro fases da síntese proteica (iniciação,

elongação, translocação e terminação). Como as mitocôndrias possuem ribossomas 70S, similares aos das bactérias, os antibióticos deste grupo podem provocar efeitos adversos<sup>9</sup>.

**iv. Inibição da síntese de ácidos nucleicos:** Certos antibióticos interferem com os processos de replicação e transcrição de ADN, nos microrganismos. O mecanismo de ação centra-se nas enzimas ADN girase e topoisomerase IV bacteriana<sup>9</sup>.

**v. Inibição dos processos metabólicos:** O ácido fólico é uma vitamina que funciona como coenzima, na síntese das purinas e das pirimidinas. As bactérias necessitam de ácido fólico, mas não possuem um sistema de obtenção deste do ambiente que as rodeia, tendo, necessariamente, de o sintetizar. Desta forma, os antibióticos deste grupo atuam imitando o substrato de duas enzimas (o ácido para-aminobenzóico, PABA, e o dihidrofolato, DHF) que produzem a forma ativa do ácido fólico, o ácido tetraidrofolico (THF)<sup>9</sup>.

### 4.1. Antibióticos $\beta$ -lactâmicos

O componente estrutural major da parede celular da maioria das bactérias é a camada de peptidoglicano<sup>96,108,109</sup>. Esta camada define a morfologia bacteriana e mantém a integridade celular, preservando a elevada pressão osmótica intracelular<sup>110-112</sup>.

A estrutura básica do peptidoglicano consiste numa cadeia de 10 a 65 resíduos dissacarídeos formados por moléculas de *N*-acetilglucosamina (NAG) que alternam com moléculas de ácido *N*-acetilmurâmico (NAM). Estas cadeias estão interligadas por pontes peptídicas, originando uma estrutura rígida<sup>96</sup>. A formação das cadeias e das pontes são catalisadas por umas enzimas específicas (por exemplo, transpeptidases, transglicosilases, carboxipeptidases) que pertencem a uma ampla família de proteínas, as serina-proteases<sup>96,113</sup>. Estas enzimas são também designadas por *Penicilin-Binding-Proteins* (PBPs), uma vez que, são o local de ação dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos ligam-se especificamente às PBPs (Figura 13), inibindo a biossíntese do peptidoglicano<sup>96,108</sup>. Por sua vez, este processo ativa autolisinas, que degradam a parede celular e destroem a bactéria. Portanto, os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos apresentam uma atividade bactericida das culturas em crescimento<sup>96,113</sup>.

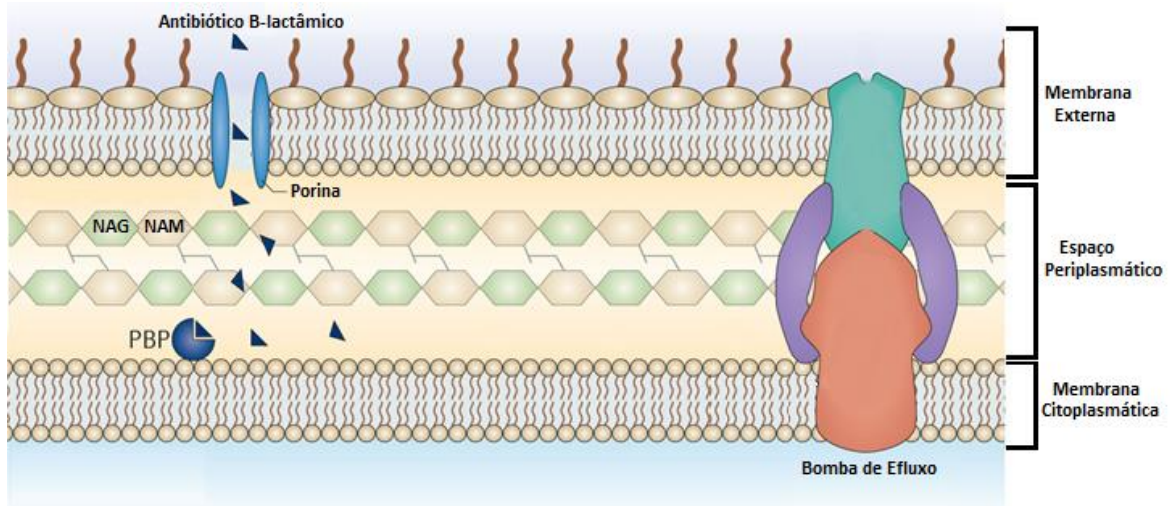


Figura 13 - Mecanismo de ação dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos numa bactéria Gram-negativa (adaptado) <sup>114</sup>

Os  $\beta$ -lactâmicos representam a classe de antibióticos mais utilizada na terapêutica clínica <sup>115,116</sup>, representam mais de 50% do consumo mundial de antibióticos <sup>106,116,117</sup>. Caracterizam-se pela elevada eficácia terapêutica e baixa toxicidade evidenciando-se das restantes classes de antibióticos <sup>118</sup>.

As principais subclasses, desta classe de antibióticos, incluem as penicilinas, cefalosporinas, carbapenemos e monobactâmicos, e definem-se pela presença comum do anel  $\beta$ -lactâmico, constituído por três átomos de carbono e um átomo de azoto, diferindo nas cadeias laterais (Figura 14) <sup>119,120</sup>.

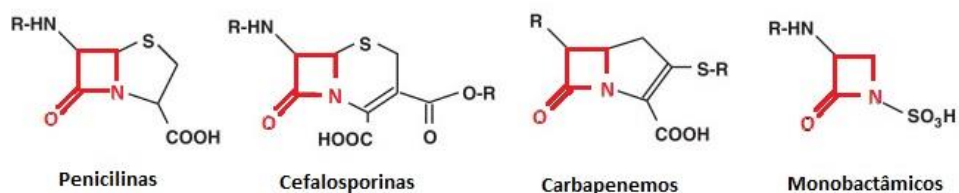


Figura 14 - Estrutura química das principais subclasses dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. A vermelho está representado o anel  $\beta$ -lactâmico em comum (adaptado) <sup>121</sup>

## 5. Resistência bacteriana

Os agentes antimicrobianos têm sido amplamente prescritos para a profilaxia e tratamento de doenças infecciosas em todo o mundo. A sua utilização tem sido vantajosa e quando prescritos e tomados corretamente, apresentam enormes benefícios para o paciente <sup>122</sup>. Contudo, a sua utilização excessiva e errónea praticada ao longo de décadas conduziram ao agravamento das resistências <sup>122,123</sup>. Portugal ocupa o nono lugar numa lista com 29 países europeus (Figura 15), no que concerne ao consumo de antibióticos <sup>124</sup>.



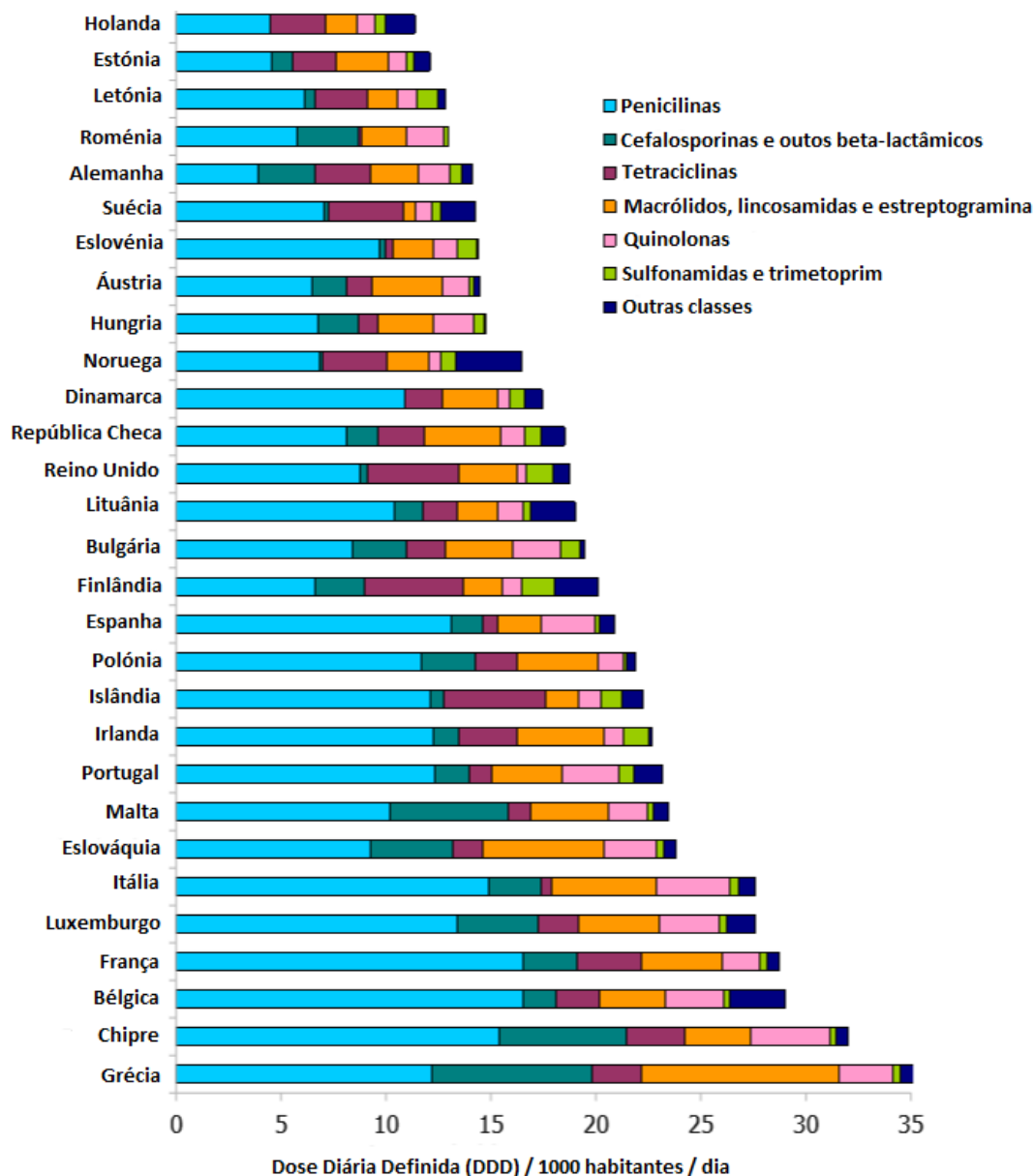


Figura 15 - Consumo de Antibióticos em 29 Países da UE, no ano 2011, expresso em Dose Diária Definida/1000 habitantes/dia (adaptado)<sup>124</sup>

Considera-se que uma bactéria é resistente a um ou vários agentes antimicrobianos quando estes agentes perdem a capacidade de controlar o crescimento bacteriano<sup>125</sup>.

O desenvolvimento da resistência é um processo evolutivo normal, porém a utilização indiscriminada de agentes antimicrobianos, tem acelerado este processo devido à pressão seletiva exercida<sup>122</sup>. Desta forma, os microrganismos adaptaram-se, por mecanismos de aquisição e transferência de genes de resistência presentes em plasmídeos e transposões, diminuindo a eficácia dos agentes antimicrobianos<sup>126,127</sup>. A título de exemplo, *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs<sup>128,129</sup>, *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina<sup>127,130</sup> e *Enterococcus* resistentes à vancomicina<sup>127,131</sup>.

Atualmente, os vírus, fungos e parasitas, também são resistentes a uma grande parte dos fármacos anti-infecciosos <sup>122</sup>. Contudo, esta situação é particularmente relevante nas bactérias e agrava-se com o aparecimento de novas estirpes resistentes a vários antibióticos, em simultâneo, designadas por multirresistentes <sup>132</sup>. Segundo Magiorakos, A.-P. *et al.*, multirresistência define-se como resistência adquirida a pelo menos um agente em três ou mais categorias antimicrobianas <sup>133</sup>.

Além do impacto na saúde, as resistências também apresentam um impacto económico, pois as infeções causadas por microrganismos resistentes tendem a responder cada vez menos à terapêutica, resultando em tratamentos mais longos, com custos mais elevados, e maior risco de morte. Por exemplo, na UE, o custo anual, relacionado com a resistência dos microrganismos aos agentes antimicrobianos, é estimado em 1.6 biliões de euros, acompanhados por mais 2.5 milhões de euros que resultam dos dias adicionais de permanência no hospital. Por outro lado, o prolongamento da doença aumenta o risco de contágio e o desenvolvimento de multirresistências <sup>134</sup>.

As bactérias possuem mecanismos para se defenderem e resistirem aos efeitos dos agentes antimicrobianos. Desta forma, os mecanismos de resistência podem ser intrínsecos (ou naturais) ou adquiridos <sup>9</sup>.

### 5.1. Bases genéticas da resistência aos antibióticos

A resistência ocorre através de dois grandes mecanismos: mutação num *loci* do cromossoma ou transferência horizontal de genes (Figura 16) <sup>135</sup>.

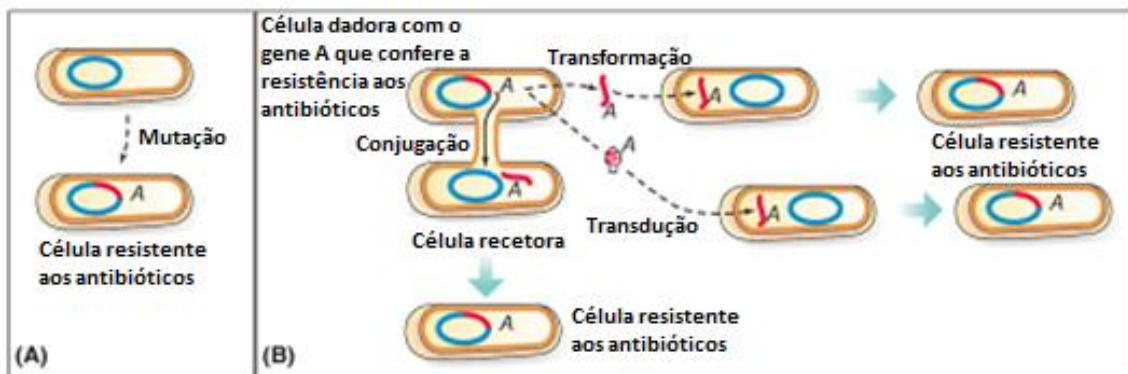


Figura 16 - Mecanismos de resistência. A resistência aos antibióticos pode ser resultado de uma mutação benéfica (A) ou (B) transferência do gene com resistência aos antibióticos por transformação, conjugação ou transdução (adaptado) <sup>135</sup>

Os genes responsáveis pela resistência contidos em plasmídeos, normalmente codificam enzimas que reduzem a permeabilidade das células ou inativam os antibióticos. Em contraste, a resistência conferida por mutações cromossômicas normalmente envolve a modificação do alvo <sup>136,137</sup>.

Quando se aborda a evolução das bactérias é imprescindível referir as mutações que possam ocorrer, quer sejam induzidas quer sejam espontâneas. As mutações induzidas devem-se à ação da radiação, como por exemplo a ultravioleta ou ionizante, os agentes alquilantes, a hidroxilamina ou a presença de espécies reativas de oxigênio. Se a mutação for de carácter benéfico para a bactéria, como no caso da resistência aos antibióticos, então tenderá a predominar naquela espécie. Assim, o maior problema da resistência mediada por mutação é a sua transmissão às gerações seguintes, o que torna a bactéria resistente, predominante <sup>9</sup>.

A transferência horizontal de genes é um processo de aquisição de material genético entre bactérias da mesma espécie ou espécies diferentes. Pode ocorrer por mecanismos de transformação, conjugação e transdução <sup>135</sup>.

### 5.1.1. Transformação

Na transformação a bactéria recebe fragmentos de ADN presentes no meio envolvente, que resultam da morte ou lise de outra bactéria. Assim, a bactéria recetora irá englobar no seu material genético as frações de ADN adquiridas. Este mecanismo foi descoberto em 1928, por Frederick Griffith, em *Streptococcus pneumoniae*, tendo sido mais tarde encontrado em *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus* spp. <sup>9,138</sup>. Esta capacidade de englobar material genético extracelular e sofrer transformação é designada de competência <sup>9</sup>.

### 5.1.2. Conjugação

A conjugação é um processo que ocorre entre células bacterianas, da mesma ou de diferentes espécies, que ao entrarem em contacto direto transferem pequenos fragmentos de material genético, como por exemplo plasmídeos. Este processo foi descoberto por J. Lederberg e E. Tatum, em 1946, ao observarem a transferência de genes cromossómicos entre duas estirpes de *E. coli* <sup>9</sup>. O plasmídeo apresenta-se como uma porção de ADN extracromossómico, que contém genes que permitem a sua replicação autónoma e transferência para outras células. Alguns plasmídeos contêm um grupo de genes, designados de *tra*, que significa *transfer*, e que têm a capacidade de realizar a transferência do mesmo da bactéria dadora para a recetora, por formação do *pili* conjugativo <sup>9,139</sup>.

### 5.1.3. Transdução

A transdução envolve a presença de bacteriófagos (também designados de fagos), que funcionam como vetores do ADN, do dador para o hospedeiro <sup>9</sup>. Cada fago transporta um pequeno fragmento de ADN da bactéria destruída anteriormente, protegendo a sua integridade das nucleases existentes no meio envolvente <sup>140</sup>. Ao infetar uma nova bactéria, a porção de ADN irá integrar-se no ADN da bactéria infetada. Este mecanismo explica a



rápida propagação e aumento das  $\beta$ -lactamases que conferem resistência em algumas bactérias como em *Staphylococcus aureus*. Pensa-se que a resistência adquirida em *Staphylococcus aureus* à meticilina advém do mecanismo de transdução. Tal é fundamentado pelo tamanho reduzido da porção cromossômica que pode ser transportada pelo bacteriófago <sup>141</sup>.

### 5.2. Resistência intrínseca

A resistência intrínseca ou natural é uma característica intrínseca de um microrganismo, que ocorre sem uma exposição prévia ao antibiótico <sup>142</sup>.

A resistência das bactérias a determinados antibióticos deve-se a três possíveis razões: a ausência de um processo metabólico influenciável pelo antibiótico; existência de enzimas que apresentem a capacidade de inativar o antibiótico; e a presença de particularidades inerentes à morfologia bacteriana <sup>143</sup>.

Desta forma, na instituição de terapêutica empírica é fundamental conhecer as resistências intrínsecas do agente patogênico, de modo a escolher o tratamento mais eficaz e adequado com base no provável diagnóstico clínico <sup>142</sup>.

### 5.3. Resistência adquirida

Existem quatro grandes mecanismos de resistência aos antibióticos, nomeadamente, produção enzimática, alteração genética do alvo, alteração da permeabilidade e bombas de efluxo (Figura 17) <sup>9</sup>.

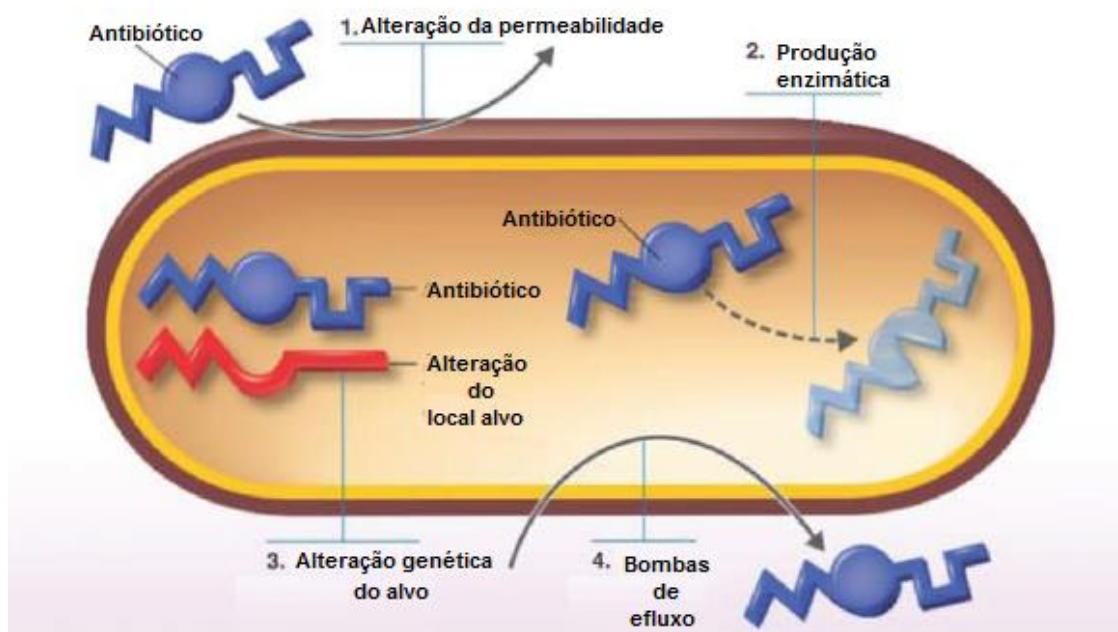


Figura 17 - Mecanismos de resistência adquirida (adaptado) <sup>9</sup>

Na resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, as bactérias podem expressar estes mecanismos independentemente ou em simultâneo. Assim sendo, os mecanismos expressos incluem <sup>144</sup>:

### **i. Alteração da permeabilidade**

A alteração da permeabilidade encontra-se associada a bactérias Gram-negativas que, ao contrário das Gram-positivas, apresentam membrana externa. As porinas, também designadas por proteínas de membrana externa (*Outer Membrane Proteins* - *OMPs*), existentes na membrana das Gram-negativas, são um canal para a entrada de nutrientes e outros elementos como os antibióticos, para o espaço periplasmático. Modificações genéticas (ausência ou expressão diminuída) nestas proteínas diminuem a entrada dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos para o espaço periplasmático da célula, promovendo a resistência <sup>9,144</sup>.

### **ii. Produção de $\beta$ -lactamases**

A produção de enzimas  $\beta$ -lactamases é o mecanismo mais importante e mais comum de resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos em *Enterobacteriaceae* <sup>116,144,145</sup>. As  $\beta$ -lactamases são enzimas com capacidade de hidrolisar o anel  $\beta$ -lactâmico dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, inativando-os antes de atuarem nas PBPs <sup>123</sup>.

### **iii. Modificações no local ativo das PBPs**

A modificação do local ativo das PBPs permite a diminuição da afinidade com os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, aumentando conseqüentemente a resistência a estes. Esta diminuição da afinidade pode ser efetuada, por exemplo, através de aquisição de novas PBPs <sup>116,145</sup>.

### **iv. Bombas de efluxo**

As bombas de efluxo são um dos tipos de resistência bacteriana que resulta da atividade de proteínas que promovem o efluxo do antibiótico do espaço periplasmático para o meio extracelular, observando-se uma diminuição da sua concentração no interior da célula <sup>9</sup>. São determinantes de resistência importantes de Gram-negativos, especialmente em *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp.<sup>144</sup>.

#### **5.3.1. $\beta$ -lactamases**

A primeira  $\beta$ -lactamase foi identificada, antes do uso generalizado das penicilinas, num isolado de *Bacillus coli* (agora conhecido por *E. coli*), em 1940, por Abraham e Chain, <sup>144,146</sup>. Este representa o mecanismo mais importante de resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos em *Enterobacteriaceae* <sup>116,144,145</sup>.

Existem dois sistemas principais de classificação de  $\beta$ -lactamases: classificação molecular de Ambler baseada na homologia de seqüências de aminoácidos e classificação

funcional de Bush-Jacoby-Medeiros baseada nas características funcionais das enzimas (Figura 18) <sup>144,147</sup>.

A classificação molecular de Ambler divide as  $\beta$ -lactamases em classes A (penicilinases), B (metalo- $\beta$ -lactamases), C (cefalosporinases) e D (oxacilinases). As classes A, C e D incluem as enzimas com o resíduo serina no centro ativo, por outro lado, a classe B inclui enzimas que apresentam íons metálicos no centro ativo (por exemplo, o zinco) <sup>144,148,149</sup>.

A classificação funcional de Bush-Jacoby-Medeiros agrupa as  $\beta$ -lactamases em quatro grupos funcionais (1 – 4) e em vários subgrupos, de acordo com a similaridade funcional (perfil de substrato e inibição) das enzimas incluídas em cada classe do esquema de classificação de Ambler <sup>144,147,148</sup>.

Classe de Ambler	Grupo Bush-Jacoby-Medeiros	Características	Número de Enzimas
C	1	Compreende principalmente as enzimas cromossômicas. Algumas são codificadas por plasmídeos. Resistentes ao ácido clavulânico.	51
A	2a	Penicilinases presentes em enterococos e estafilococos.	23
	2b	Beta-lactamases de espectro alargado, incluindo TEM-1 e SHV-1, ocorre principalmente em Gram-negativos.	16
	2bc	Beta-lactamases de espectro alargado (ESBLs).	200
	2br	Beta-lactamases TEM resistentes aos inibidores.	24
	2c	Hidrólise enzimática da carbenicilina.	19
	2d	Hidrólise enzimática da cloxacilina.	31
	2e	Cefalosporinases inibidas pelo ácido clavulânico.	20
	2f	Hidrólise enzimática dos carbapenemos inibida pelo ácido clavulânico.	4
B	3	Metalo-beta-lactamases que hidrolisam os carbapenemos e outros beta-lactâmicos, exceto monobactâmicos. Não inibidas pelo ácido clavulânico.	24
D	4	Enzimas variadas.	9

Figura 18 – Sistemas principais de classificação de  $\beta$ -lactamases (adaptado) <sup>149</sup>

### 5.3.1.1. $\beta$ -lactamases de Espectro Alargado

As ESBLs são enzimas que apresentam capacidade de hidrolisar as penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos, e são inativas nas cefamicinas e carbapenemos. Além disso são inibidas pelos inibidores clássicos das  $\beta$ -lactamases como ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam <sup>149–151</sup>.

A primeira  $\beta$ -lactamase de espectro alargado (ESBL) foi identificada em 1983 na Alemanha, mas foi na França (em 1985) e nos Estados Unidos da América (nos finais da década de 1980 e inícios da década de 1990) que surgiram os primeiros surtos nosocomiais. Mais tarde foi descoberto que muitas das estirpes de *K. pneumoniae* que

causaram infecções nosocomiais, na França, eram produtoras de ESBLs <sup>151</sup>. Até à década de 1990, o principal produtor de ESBLs foi *K. pneumoniae*, porém após o início do século XXI, o número de isolados de *E. coli* produtores de ESBLs aumentou drasticamente <sup>152</sup>.

Segundo Ambler, as ESBLs pertencem à classe A e incluem três grandes grupos: as TEM, SHV e CTX-M <sup>152</sup>.

- **β-lactamases do tipo TEM**

A primeira β-lactamase mediada por um plasmídeo em Gram-negativos, a TEM-1, foi descrita no início de 1960. A TEM-1 foi originalmente encontrada numa estirpe de *E. coli*, isolada de um paciente chamado Temoniera na Grécia, daí a designação de TEM <sup>153</sup>. A TEM-1 é a β-lactamase mais frequentemente encontrada em *Enterobacteriaceae*. A localização do gene que a codifica em plasmídeos e transposões facilitou a disseminação da TEM-1 em *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* e *Neisseria gonorrhoeae* <sup>153</sup>. A primeira variante de TEM com um aumento da atividade contra cefalosporinas de espectro alargado foi a TEM-3. A TEM-3, originalmente descrita em 1989, foi a primeira β-lactamase do tipo TEM com fenótipo de ESBL. Em retrospectiva, a TEM-3 pode não ter sido a primeira TEM com fenótipo de ESBL. Em 1982, em Inglaterra, foi obtido um isolado de *Klebsiella oxytoca* portador de um plasmídeo com um gene que conferia resistência à ceftazidima, a β-lactamase responsável é agora designada por TEM-12. Curiosamente, a estirpe veio de uma unidade neonatal que tinha sido atingida por um surto de *Klebsiella oxytoca* portadora de uma TEM-1. Este é um bom exemplo do surgimento de ESBLs, como resposta à pressão seletiva induzida por cefalosporinas de espectro alargado <sup>151</sup>.

- **β-lactamases do tipo SHV**

A família de β-lactamases do tipo SHV pensa-se que são derivadas da *Klebsiella* spp. O progenitor da classe de enzimas SHV, SHV-1, é universalmente encontrado em *K. pneumoniae*. Em muitas estirpes desta espécie, o gene que codifica SHV-1 ou o seu aparente precursor (LEN-1) integra o cromossoma bacteriano, assim é possível que o gene que codifica a β-lactamase SHV-1 tenha evoluído como um gene cromossómico em *Klebsiella* que depois tenha sido incorporado num plasmídeo e disseminado para outras espécies da família *Enterobacteriaceae*. A SHV-1 confere resistência às penicilinas <sup>151</sup>. Em 1983, na Alemanha, foi descrita a primeira β-lactamase do tipo SHV com fenótipo ESBL, SHV-2, num isolado de *K. pneumoniae* resistente à cefotaxima <sup>153,154</sup>.

- **β-lactamases do tipo CTX-M**

A primeira β-lactamases do tipo CTX-M com fenótipo de ESBL foi descrita em Munique, no ano de 1990, num isolado de *E. coli* (isolado do pus de ouvido de uma

criança de 4 meses com otite média) que apresentava resistência à cefotaxima e era sensível à ceftazidima. A enzima responsável por este fenótipo de ESBL, em particular, foi designada por CTX-M-1 devido à atividade hidrolítica exercida preferencialmente sobre a cefotaxima (CTX de cefotaxima e o – M de Munique) <sup>155</sup>.

Na primeira década do século XXI, observou-se uma expansão extraordinária das  $\beta$ -lactamases do tipo CTX-M, sobre as  $\beta$ -lactamases clássicas TEM e SHV, tanto em ambiente hospitalar como comunitário, sendo o tipo de ESBL predominante em *Enterobacteriaceae* <sup>156,157</sup>.

Estas enzimas podem ser divididas em cinco grupos de acordo com o alinhamento das sequências de aminoácidos: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 e CTX-M-25. Recentemente foram identificados dois grupos adicionais: CTX-M-74 e CTX-M-75. A análise filogenética sugere que a CTX-M resultou da mobilização dos genes cromossômicos *bla*, da *Kluyvera* spp., quando foram integrados em elementos genéticos móveis. Os genes *bla*<sub>CTX-M</sub> originalmente mobilizados apresentavam uma capacidade de hidrólise superior na cefotaxima, comparativamente com a ceftazidima. No entanto, e num ponto de vista evolutivo, a enzima CTX-M, através de mutações pontuais, aumentou a atividade hidrolítica sobre a ceftazidima, tendo sido identificadas novas variantes <sup>156</sup>.

Mais de 150 CTX-M foram identificadas, sendo a CTX-M-15 e a CTX-M-14 as variantes mais frequentemente isoladas em humanos, animais e ambiente <sup>156</sup>.

Uma questão preocupante foi observado em muitas regiões do mundo, o estado de portador intestinal de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs do tipo CTX-M em indivíduos saudáveis <sup>157</sup>.

## 6. Detecção laboratorial de $\beta$ -lactamases de Espectro Alargado

O aumento da prevalência de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs implicou a grande necessidade de testar métodos laboratoriais cada vez mais precisos e rápidos, que permitam a deteção destas enzimas <sup>153</sup>. Desta forma, é possível otimizar a terapêutica antimicrobiana e melhorar a assistência ao paciente <sup>158</sup>.

A deteção de ESBLs pode ser realizada através de métodos fenotípicos e genotípicos <sup>151</sup>.

A deteção fenotípica de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs consiste na deteção de sinergismo de ácido clavulânico com oximino- $\beta$ -lactâmicos pelo método de difusão em agar e/ou pela utilização de sistemas automatizados para determinação da Concentração Mínima Inibitória. Caso se verifique a redução da suscetibilidade aos oximino- $\beta$ -lactâmicos, deve ser realizado um teste confirmatório através do uso de um inibidor clássico das ESBLs, como o ácido clavulânico <sup>159</sup>. A técnica e a avaliação do perfil de suscetibilidade

devem ser realizadas conforme as diretrizes do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) ou *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) <sup>160,161</sup>.

Existem outras metodologias bioquímicas que permitem a detecção rápida e presuntiva de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL, como por exemplo o Teste ESBL NDP (Nordmann/Dortet/Poirel). Este teste consiste na detecção da hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico da cefotaxima que é inibida pela adição do tazobactam. A atividade da ESBL é evidenciada pela mudança de cor (vermelho para amarelo) do indicador de pH (vermelho de fenol) pela formação do ácido carboxílico, que resultou da hidrólise da cefotaxima. Esta hidrólise é inibida pela adição do tazobactam (teste positivo) <sup>162</sup>.

Os métodos genotípicos como PCR (*Polimerase Chain Reaction*), PCR em tempo real, *microarray* e sequenciação, permitem a detecção de genes codificadores de ESBLs. Estes apresentam-se como uma alternativa vantajosa devido ao elevado nível de especificidade e sensibilidade. No entanto apresentam custos elevados e requerem profissionais especializados <sup>151,163,164</sup>.



## **OBJETIVOS**

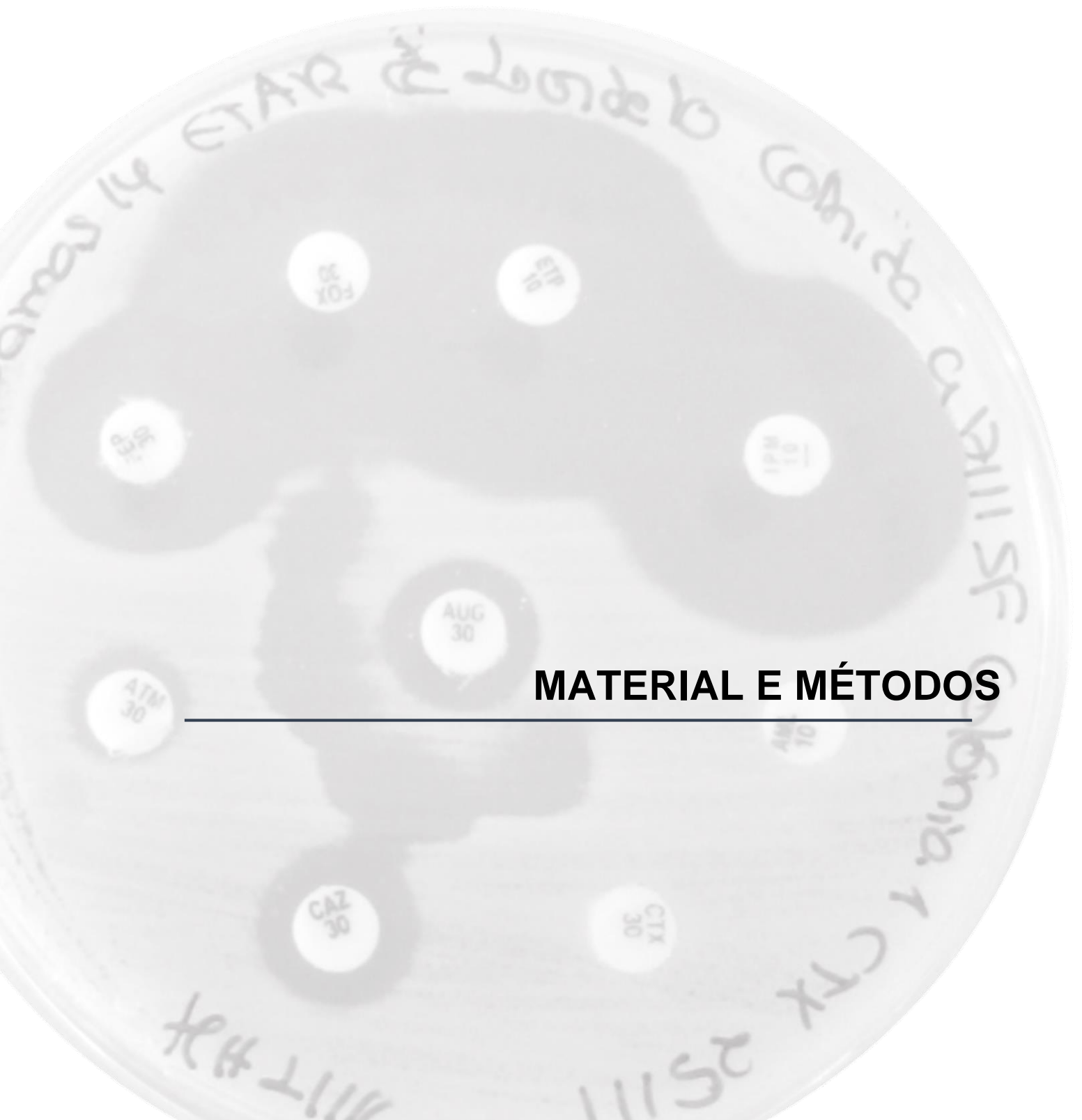
---

## Objetivos

---

O objetivo deste estudo consistiu na detecção de *Enterobacteriaceae* produtoras de  $\beta$ -lactamases de espectro alargado em lamas de ETAR, da zona Norte. Simultaneamente, apesar de não ser o objetivo primordial, foi também dada atenção à presença de bactérias Gram-negativas que apresentaram redução da suscetibilidade aos carbapenemos.





## MATERIAL E MÉTODOS

---

## 1. Origem das amostras de lamas de ETAR

As amostras de lamas de ETAR, utilizadas neste estudo, foram disponibilizadas por nove ETARs (Figura 19), da zona Norte. Sendo elas: ETAR de Agra, ETAR de Serzedelo, ETAR de Lordelo, ETAR da Rabada, ETAR de Sobreiras, ETAR do Freixo, ETAR da Madalena, ETAR de Febros e ETAR da Ponte da Ribeira.

Cada ETAR forneceu uma amostra de lama de ETAR desidratada. A ETAR de Sobreiras, além da amostra de lama de ETAR desidratada, também forneceu uma amostra de lama de ETAR estabilizada com cal.

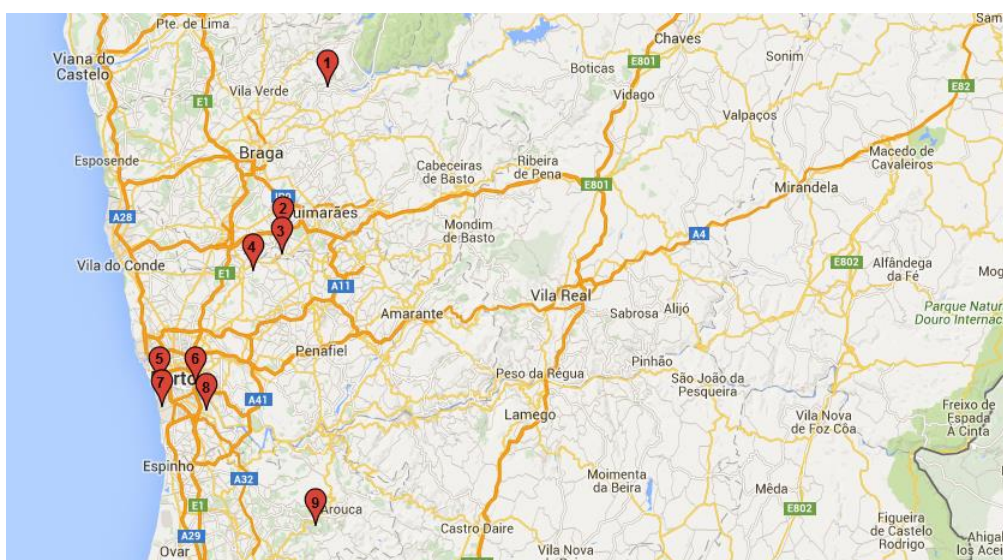


Figura 19 – Distribuição geográfica das ETARs que cederam amostras de lamas de ETAR

**Legenda:** 1 ETAR de Agra, 2 ETAR de Serzedelo, 3 ETAR de Lordelo, 4 ETAR da Rabada, 5 ETAR de Sobreiras, 6 ETAR do Freixo, 7 ETAR da Madalena, 8 ETAR de Febros, 9 ETAR da Ponte da Ribeira.

Com esta distribuição geográfica podemos compreender se a problemática das *Enterobacteriaceae* produtoras de ESKAP, presentes em lamas de ETAR, é uma realidade na zona Norte. Uma vez que, estas infraestruturas situam-se nos distritos mais populosos (Porto, Braga e Aveiro) da zona Norte de Portugal, servindo um total de mais de 1.5 milhões de habitantes. Além disso, verificar se existem diferenças de acordo com o tipo de população de cada zona – mais urbana ou mais rural.

## 2. Processamento das amostras de lamas

As dez amostras de lamas residuais (com cerca de 200 g) foram recolhidas para frascos estéreis e transportadas à temperatura ambiente no prazo de 24h após colheita. Uma vez no laboratório, as amostras foram imediatamente processadas.

Inicialmente foram testadas três metodologias, de modo, a escolher qual a metodologia que melhor se adequava ao tipo amostra:

- **1ª Metodologia:** pesou-se 1g de cada amostra e suspendeu-se em 40 ml de água peptonada estéril. A partir desta suspensão (previamente incubada a 37°C, durante 18h a 24h) inoculou-se 100 µl pela técnica de espalhamento em meio de cultura de MacConkey agar (Liofilchem, Itália) – meio de cultura seletivo e diferencial para diferenciação de bacilos de Gram-negativo fermentadores e não fermentadores da lactose –, sem e com antibiótico: ampicilina (100 µg/ml), ciprofloxacina (2 µg/ml), cefotaxima (2 µg/ml), e meropenemo (2 µg/ml). A avaliação e seleção de isolados de bacilos Gram-negativo, de diversos morfotipos em cada meio de cultura, realizou-se após a incubação a 37°C durante 18h a 24h.

- **2ª Metodologia:** pesou-se 1g de cada amostra e suspendeu-se em 20 ml de caldo TSB (caldo triptona de soja) estéril. A partir desta suspensão (previamente incubada a 37°C, durante 18h a 24h) inoculou-se 100 µl pela técnica de espalhamento em meio de cultura de MacConkey agar (Liofilchem, Itália), sem e com antibiótico: ampicilina (100 µg/ml), ciprofloxacina (2 µg/ml), cefotaxima (2 µg/ml), e meropenemo (2 µg/ml). A avaliação e seleção de isolados de bacilos Gram-negativo, de diversos morfotipos em cada meio de cultura, realizou-se após a incubação a 37 °C durante 18h a 24h.

- **3ª Metodologia:** pesou-se cerca de 1g de cada amostra e suspendeu-se em 10 ml de soro fisiológico. A partir desta suspensão (sem incubação) inoculou-se 100 µl pela técnica de espalhamento em meio de cultura de MacConkey agar (Liofilchem, Itália), sem e com antibiótico: ampicilina (100 µg/ml), ciprofloxacina (2 µg/ml), cefotaxima (2 µg/ml), e meropenemo (2 µg/ml). A avaliação e seleção de isolados de bacilos Gram-negativo, de diversos morfotipos, em cada meio de cultura realizou-se após a incubação a 37 °C durante 18h a 24h.

Em todas as metodologias, a seleção incidu preferencialmente em bacilos Gram-negativo fermentadores da lactose, tendo em atenção o crescimento relevante de bacilos Gram-negativos não fermentadores da lactose.

Como não existiram diferenças entre as metodologias, não havendo necessidade de enriquecimento, a escolha recaiu na utilização de soro fisiológico. Desta forma, o processamento da amostra não influencia o crescimento dos microrganismos ao prover nutrientes e condições, que à priori, os microrganismos não possuem quando são aplicados nos solos em conjunto com as lamas.

Através do conhecimento obtido, ao testar as três metodologias, a metodologia foi otimizada: pesou-se cerca de 1g de cada amostra e suspendeu-se em 10 ml de soro fisiológico. A partir desta suspensão inoculou-se 100 µl pela técnica de espalhamento em

meio de cultura de MacConkey agar (Liofilchem, Itália), sem e com antibiótico  $\beta$ -lactâmico: cefotaxima (2  $\mu\text{g/ml}$ ), e meropenemo (2  $\mu\text{g/ml}$ ). A avaliação e seleção de isolados de bacilos Gram-negativo, de diversos morfotipos, em cada meio de cultura realizou-se após a incubação a 37 °C durante 24h. A seleção incidiu preferencialmente em bacilos Gram-negativo fermentadores da lactose, tendo em atenção o crescimento relevante de bacilos Gram-negativos não fermentadores da lactose.

De modo, a confirmar o crescimento e a obtenção de culturas puras, os isolados selecionados a partir do meio de cultura de seleção, foram novamente isolados no respetivo meio de seleção.

A capacidade seletiva dos meios de cultura de MacConkey agar, sem e com antibiótico de seleção: cefotaxima (2  $\mu\text{g/ml}$ ) e meropenemo (2  $\mu\text{g/ml}$ ) foram avaliados através da estirpe controlo, *E. coli* ATCC (*American Type Culture Collection*) ® 25922 (ATCC, Estados Unidos da América). A estirpe controlo cresce em meio de cultura sem antibiótico  $\beta$ -lactâmico, no entanto, o seu crescimento é inibido em meios de cultura com antibiótico  $\beta$ -lactâmico, garantindo a capacidade de seleção dos respetivos meios.

### **3. Determinação do fenótipo de resistência aos antibióticos em isolados de lamas de ETAR**

#### **3.1. Teste de suscetibilidade aos antibióticos pelo método de difusão em agar**

A determinação do fenótipo de resistência aos antibióticos em isolados de lamas de ETAR foi efetuada através do teste de suscetibilidade aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, pelo método de difusão em agar (também conhecido pelo método de Kirby-Bauer), conforme as diretrizes do CLSI. Também a avaliação do perfil de suscetibilidade foi interpretada de acordo com o CLSI.

Assim, para a realização do teste de suscetibilidade foi preparada uma suspensão bacteriana com turvação de 0,5 na escala de McFarland. Para tal, ressuspenderam-se três a cinco colónias, bem isoladas e morfologicamente semelhantes, em cerca de 5ml de soro fisiológico estéril. A suspensão bacteriana preparada foi inoculada no meio de cultura Müeller-Hinton (Liofilchem, Itália), em três direções, perpendiculares entre si, por toda a superfície do meio de cultura (Figura 20).

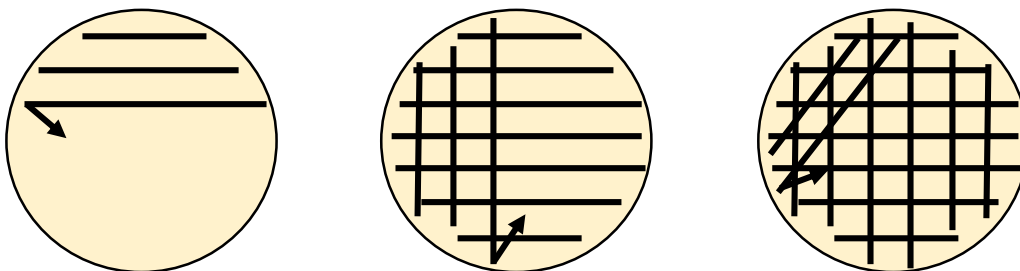


Figura 20 - Inoculação da suspensão bacteriana no meio de cultura

Após 10 minutos da inoculação do meio de cultura, foram aplicados os seguintes antibióticos (Liofilchem, Itália), representativos do grupo dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos: **(a) Penicilinas** – ampicilina (AML) (10 $\mu$ g), amoxicilina e ácido clavulânico (AUG (30 $\mu$ g); **(b) Cefalosporinas** – cefoxitina (FOX) (30 $\mu$ g), ceftazidima (CAZ) (30 $\mu$ g), cefotaxima (CTX) (30 $\mu$ g), cefepime (FEP) (30 $\mu$ g); **(c) Monobactâmicos** – aztreonamo (ATM) (30 $\mu$ g); **(d) Carbapenemos** – imipenemo (IMI) (10 $\mu$ g), ertapenemo (ETP) (10 $\mu$ g).

Os diâmetros dos halos de inibição de crescimento bacteriano foram medidos para cada um dos antibióticos e foi observada a presença de sinergismo e/ou antagonismo, após 18h a 24h de incubação, a 37°C. Os resultados foram analisados de acordo com as normas do CLSI, segundo as quais o diâmetro do halo de inibição analisado, classifica as estirpes nas categorias, sensível (S), resistente (R) ou intermédio (I). Utilizou-se a estirpe controlo *E. coli* ATCC® 25922 (ATCC, Estados Unidos da América) para verificação da suscetibilidade a todos os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos.

### 3.2. Deteção fenotípica de $\beta$ -lactamases de Espectro Alargado

#### 3.2.1. Sinergismo de oximino- $\beta$ -lactâmicos com ácido clavulânico no teste de suscetibilidade aos antibióticos $\beta$ -lactâmicos pelo método de difusão em agar

A deteção fenotípica da expressão de ESBLs foi avaliada pela presença de sinergismo entre o disco da associação amoxicilina com ácido clavulânico e os discos de oximino- $\beta$ -lactâmicos, pelo método de difusão em agar.

Um aumento do halo de inibição do(s) oximino- $\beta$ -lactâmico(s) originado pelo sinergismo do ácido clavulânico, do disco da associação amoxicilina com ácido clavulânico, é indicado como um resultado positivo, ou ainda a formação de uma terceira zona de inibição de crescimento designada por “*ghost zone*” (Figura 21).



Figura 21 - Fenótipo típico de um isolado produtor de ESBL

### 3.2.2. Teste de adição de ácido clavulânico

O teste de adição de ácido clavulânico foi realizado para detetar e/ou confirmar a presença de ESBLs. Assim, foi adicionado 10uL de uma solução de ácido clavulânico (1000 µg/µl) (inibidor de β-lactamases) ao disco de oximino-β-lactâmico que apresentou maior redução da suscetibilidade, no método de difusão em agar.

Um aumento igual ou superior a 5mm entre o halo de inibição do oximino-β-lactâmico com ácido clavulânico, comparativamente ao halo de inibição de oximino-β-lactâmico sem ácido clavulânico indica a presença de produção de ESBL (Figura 22).



Figura 22 – Presença de ESBL detetada pela adição de ácido clavulânico. Aos discos de oximino-β-lactâmicos marcados com um ponto preto foi adicionado ácido clavulânico



#### **4. Identificação dos isolados de lamas residuais com perfil de suscetibilidade relevante aos agentes antimicrobianos**

A identificação presuntiva dos isolados de lamas residuais, que apresentaram um perfil de suscetibilidade relevante aos agentes antimicrobianos, foi realizada com recurso ao *CHROmagar™ Orientation* (CHROmagar, França). Sendo confirmada através da galeria API®20E (Biomérieux, França) e/ou galeria de identificação ID32 GN (Biomérieux, França).

#### **5. Determinação do genótipo de resistência aos antibióticos em isolados de lamas residuais**

##### **5.1. Extração de ADN bacteriano**

Para a caracterização genotípica dos isolados em estudo foi inicialmente realizada a extração de ADN por fervura (*boiling-centrifugation*) que consiste, como o próprio nome indica, na lise da suspensão bacteriana por fervura.

Assim, os isolados foram novamente isolados em meio de cultura CLED (Liofilchem, Itália), de forma a obter colónias puras e recentes. Após a incubação a 37°C durante um período de 18h a 24h, foram ressuspendidas 2 a 5 colónias em 100µl de água destilada estéril. Posteriormente realizou-se, tal como referido anteriormente, a extração de ADN por fervura a 100°C durante 10 minutos. Seguidamente foram removidos os resíduos celulares por centrifugação, durante 5 minutos a 10000 rpm. Os sobrenadantes obtidos, contendo ADN bacteriano, foram conservados a -20°C para serem submetidos à reação de amplificação por PCR.

##### **5.2. Determinação dos genes que codificam β-lactamases**

Nos isolados de lamas residuais que apresentaram produção de ESBL, no teste de suscetibilidade aos antibióticos β-lactâmicos e/ou na adição de ácido clavulânico ao disco de oximino-β lactâmico com maior redução de suscetibilidade, foi realizada a determinação dos genes produtores de β-lactamases. Esta determinação foi efetuada pelo método de amplificação por PCR.

Preparou-se, então, uma mistura constituída pelos seguintes componentes: tampão da reação, cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>), *primers* específicos (*forward* e *reverse*), desoxirribunucleotídeos (dNTP's) e Taq polimerase. A esta mistura adicionou-se 2µl de ADN bacteriano e água ultra pura estéril de modo a perfazer um volume final de 25µl. As concentrações dos componentes e condições das reações de amplificação foram ajustadas de acordo com o descrito na bibliografia para os *primers* utilizados, reagentes e tamanho do fragmento a amplificar. As reações de PCR foram realizadas no termociclador T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad, Estados Unidos da América).

O estudo incidiu na detecção molecular das famílias da classe A das ESBLs mais frequentes e da classe D, utilizando *primers* e condições de amplificação específicas, para detecção dos genes *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub> e *bla*<sub>OXA</sub>. A pesquisa dos genes foi efetuada através de duas reações de PCR distintas, PCR multiplex utilizando *primers* (Tabela 4) e condições de amplificação específicos para detecção dos genes *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> e *bla*<sub>OXA</sub><sup>165</sup> e PCR multiplex utilizando *primers* (Tabela 4) e condições de amplificação específicos para detecção dos genes *bla*<sub>CTX-M grupo 1</sub>, *bla*<sub>CTX-M grupo 2</sub> e *bla*<sub>CTX-M grupo 25</sub><sup>166</sup>. Além disso, no sentido de averiguar a possível produção de carbapenemases, pelos isolados que apresentaram redução da suscetibilidade aos carbapenemos no teste de suscetibilidade aos antibióticos β-lactâmicos pelo método de difusão em agar, foi realizado por PCR multiplex utilizando *primers* (Tabela 4) e condições de amplificação específicos a detecção dos genes *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>NDM</sub> e *bla*<sub>KPC</sub><sup>167</sup>.

Tabela 4 - Grupo de *primers* específicos utilizados nas reações de PCR

Gene	Primers	Sequência do Primer (5' → 3')	Tamanho de produto amplificado (pares de base)	Referência
<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	TEM forward	5'-CATTTCCGTGTCGCCCTTATTC-3'	800	165
	TEM reverse	5'-CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC-3'		
<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	SHV forward	5'-AGCCGCTTGAGCAAATTA AAC-3'	713	165
	SHV reverse	5'-ATCCCGCAGATAAATCACCAC-3'		
<i>bla</i> <sub>OXA</sub>	OXA forward	5'-GGCACCAGATTCAACTTTCAAG-3'	564	165
	OXA reverse	5'-GACCCCAAGTTTCCTGTAAGTG-3'		
<i>bla</i> <sub>CTX-M grupo 1</sub>	CTX-M Grupo 1 forward	5'-AAAAATCACTGCGCCAGTTC-3'	415	166
	CTX-M Grupo 1 reverse	5'-AGCTTATTCATCGCCACGTT-3'		
<i>bla</i> <sub>CTX-M grupo 2</sub>	CTX-M Grupo 2 forward	5'-CGACGCTACCCCTGCTATT-3'	552	166



	CTX-M Grupo 2 reverse	5'- CCAGCGTCAGATTTTTCAGG-3'		
<i>bla</i> <sub>CTX-M grupo 25</sub>	CTX-M Grupo 25 forward	5'- GCACGATGACATTCCGGG -3'	327	166
	CTX-M Grupo 25 reverse	5'- AACCCACGATGTGGGTAGC -3'		
<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	IMP forward	5'-GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC-3'	232	167
	IMP reverse	5'-GGTTTAAAYAAAACAACCACC-3'		
<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	VIM forward	5'-GATGGTGTGGTTCGCATA-3'	390	167
	VIM reverse	5'-CGAATGCGCAGCACCAG-3'		
<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	OXA-48 forward	5'-GCGTGGTTAAGGATGAACAC-3'	438	167
	OXA-48 reverse	5'-CATCAAGTTCAACCCAACCG-3'		
<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	NDM forward	5'-GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC-3'	621	167
	NDM reverse	5'-CGGAATGGCTCATCACGATC-3'		
<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	KPC forward	5'-CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG-3'	798	167
	KPC reverse	5'- CTTGTCATCCTTGTTAGGCG-3'		

### 5.3. Identificação dos produtos de PCR por eletroforese

Os amplicões obtidos nas reações de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2%. Assim, pesou-se 2 gramas de agarose e dissolveu-se em 100 ml de tampão TAE (National Diagnosis, Estados Unidos da América), com o auxílio de calor, resultando numa solução transparente e homogênea. Depois de ligeiramente arrefecida a solução (sem solidificar), adicionou-se 5 µl de Midori Green Advance DNA Stain (Nippon Genetics, Japão) para posterior visualização no transiluminador Gel Doc™ XR+System (Bio-Rad, Estados Unidos da América). Numa tina de electroforese colocou-se o gel, o pente, e esperou-se até o gel solidificar. Nos poços, com recurso a uma micropipeta, colocou-se 5µl dos amplicões, e deixou-se correr a 100 Volts durante cerca de 60 minutos. O tamanho dos fragmentos obtidos foi estimado por comparação com o marcador de peso

molecular e com o tamanho do fragmento do controlo positivo utilizado nas reações de PCR.



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 1. Isolados obtidos no processamento das amostras de lammas de ETAR

Do processamento das dez amostras de lammas de ETAR, 55 isolados apresentaram resistência a pelo menos um oximino- $\beta$ -lactâmico ou a um carbapenemo, pelo método de difusão em agar (Anexo 1).

Todos os isolados foram obtidos, exclusivamente, do processamento de lammas de ETAR desidratadas. Do processamento da amostra de lama de ETAR estabilizada com cal não foi obtido crescimento.

A Figura 23 apresenta a distribuição geográfica das ETARs e o número dos respectivos isolados que apresentaram resistência a pelo menos um oximino- $\beta$ -lactâmico ou a um carbapenemo, pelo método de difusão em agar.

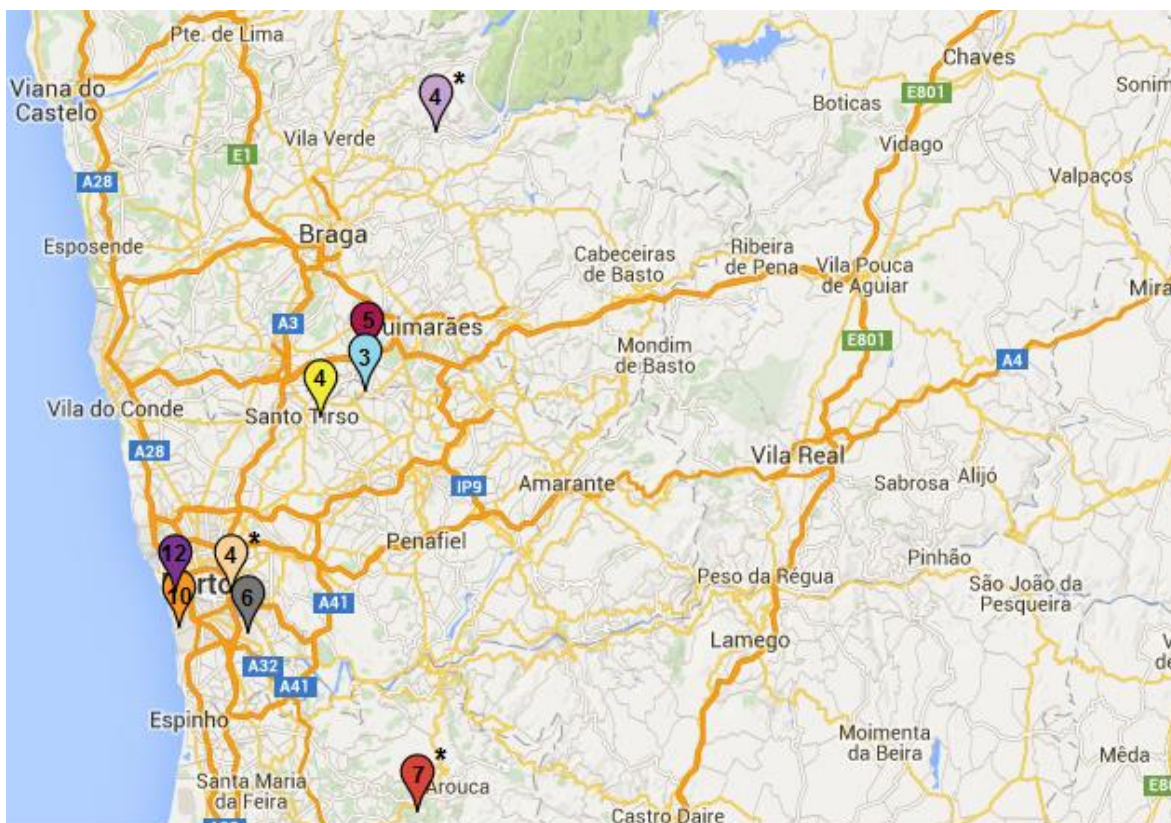


Figura 23 - Distribuição geográfica das ETARs e número dos respectivos isolados que apresentaram resistência a pelo menos um oximino- $\beta$ -lactâmico ou carbapenemo

**Legenda:** ETAR de Agra, ETAR de Serzedelo, ETAR de Lordelo, ETAR da Rabada, ETAR de Sobreiras, ETAR do Freixo, ETAR da Madalena, ETAR de Febros, ETAR da Ponte da Ribeira, \* Não foram detetados isolados produtores de ESBLs.

A partir da Figura 23 verificamos que o maior número de isolados pertencem a ETARs de zonas urbanas (ETAR de Sobreiras – 12 isolados e ETAR da Madalena – 10 isolados). Seguindo-se a ETAR de Ponte da Ribeira com 7 isolados, ETAR de Febros com 6 isolados,

ETAR de Serzedelo com 5 isolados. As ETARs de Agra, da Rabada e do Freixo apresentaram o mesmo número de isolados (4). E por último a ETAR de Lordelo apresentou 3 isolados. Assim, podemos deduzir que a presença de bactérias resistentes aos agentes antimicrobianos, presentes em lamas de ETAR, não é exclusiva das zonas urbanas. As zonas rurais também apresentam elevados níveis de resistência superando mesmo uma ETAR da zona urbana (ETAR do Freixo), demonstrando a disseminação deste tipo de bactérias.

### 1.1.Lamas de ETAR estabilizadas com cal

A metodologia do processamento da amostra de lama de ETAR estabilizada com cal foi igual à metodologia do processamento das amostras de lamas de ETAR desidratadas. No entanto, como não foi obtido crescimento (Figura 24), e de forma a garantir/ confirmar a ausência de crescimento bacteriano, recorreu-se a uma metodologia ligeiramente diferente. Esta metodologia, em relação à inicial, só difere na suspensão da amostra que foi realizada com caldo de TSB (em substituição do soro fisiológico). Assim, este meio nutritivo facilitaria o crescimento bacteriano, caso existisse a presença de bactérias na amostra.

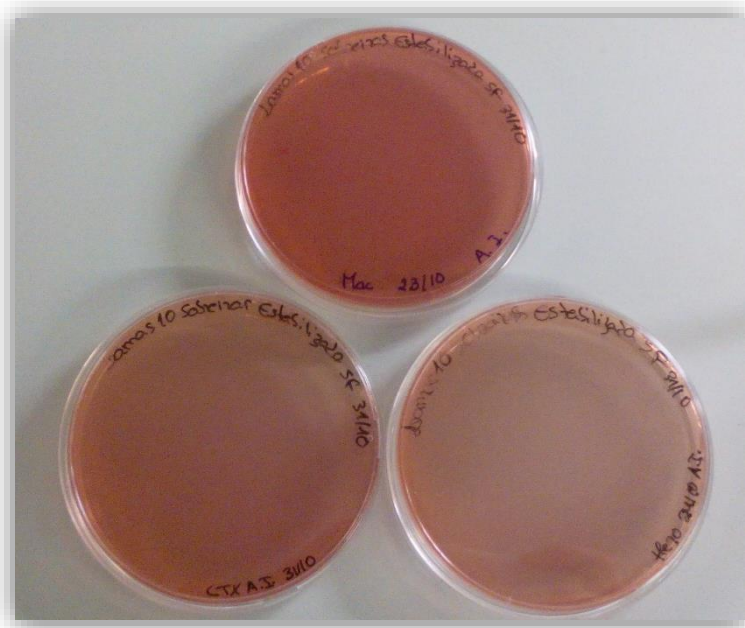


Figura 24 - Resultado do processamento da amostra da lama de ETAR estabilizada com cal, suspensa em soro fisiológico

Contudo, a ausência de crescimento bacteriano (Figura 25) foi confirmada através desta metodologia alternativa. Este resultado está de acordo com estudos internacionais<sup>168,169</sup>, que demonstraram que a estabilização das lamas com cal diminui significativamente a presença de bactérias resistentes aos antibióticos (bem como, bactérias Gram-negativas no geral pois não houve crescimento em meio de MacConkey agar) em lamas de ETAR,

em comparação com outros métodos. Portanto, este método pode ser uma medida eficaz no controle da disseminação de bactérias resistentes aos antibióticos por lamas de ETAR.

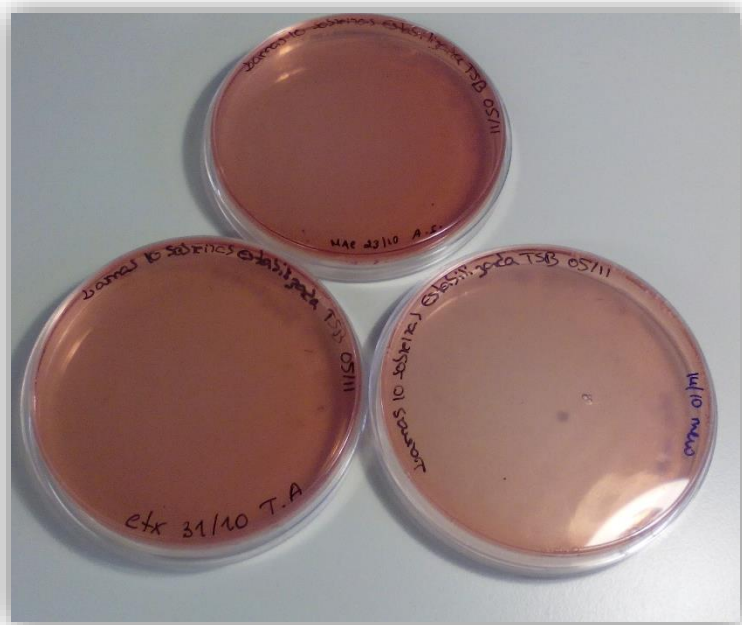


Figura 25 - Resultado do processamento da amostra da lama de ETAR estabilizada com cal, suspensa em TSB

### 1.2. Lamas de ETAR desidratadas

Dos 55 isolados, provenientes das amostras de lamas de ETAR desidratadas que apresentaram resistência a pelo menos um oximino- $\beta$ -lactâmico ou carbapenemo, 25 isolados foram selecionados em MacConkey agar com cefotaxima e 30 isolados foram selecionados em MacConkey agar com meropenemo.

## 2. Deteção fenotípica de ESBLs nos isolados de lamas residuais

A deteção fenotípica da expressão de ESBLs foi avaliada pela presença de sinergismo entre o disco da associação amoxicilina com ácido clavulânico e os discos de oximino- $\beta$ -lactâmicos, pelo método de difusão em agar. Na Figura 26 está representado um exemplo deste tipo de isolados.





Figura 26 – Fenótipo típico de um isolado produtor de ESBL. Isolado oriundo da amostra de lama de ETAR de Lordelo, selecionado com cefotaxima

Na ausência de sinergismo ou confirmação da suspeita de sinergismo, a detecção de ESBLs foi efetuada pelo teste de adição de ácido clavulânico ao disco de oximino- $\beta$ -lactâmico com maior redução de suscetibilidade apresentada no teste de suscetibilidade aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. Neste teste verificou-se um aumento igual ou superior a 5mm entre o halo de inibição do oximino- $\beta$ -lactâmico (cefotaxima/ ceftazidima) com ácido clavulânico, comparativamente ao halo de inibição do oximino- $\beta$ -lactâmico (cefotaxima/ceftazidima) sem ácido clavulânico (Figura 27).



Figura 27 – Teste de adição do ácido clavulânico positivo. Isolado oriundo da amostra de lama de ETAR de Serzedelo

Foram detetados fenotipicamente 8 isolados produtores de ESBL (5 *E. coli* e 3 *K. pneumoniae*). Estes foram selecionados em MacConkey agar com cefotaxima, tal como expectável, uma vez que estas enzimas hidrolisam esta cefalosporina.

O perfil de suscetibilidade aos antibióticos destes isolados encontra-se na Tabela 5:

## Resultados e Discussão

Tabela 5 - Caracterização do fenótipo de resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos dos isolados produtores de ESBLs detetados através da observação do sinergismo entre os oximino- $\beta$ -lactâmicos e o ácido clavulânico com amoxicilina ou pelo teste de adição do ácido clavulânico

Isolado	Origem	Suscetibilidade aos antibióticos $\beta$ -lactâmicos (halo em mm) *									Identificação
		AML 10 $\mu$ g	AUG 30 $\mu$ g	CTX 30 $\mu$ g	CAZ 30 $\mu$ g	FEP 30 $\mu$ g	ATM 30 $\mu$ g	FOX 30 $\mu$ g	IMI 10 $\mu$ g	ETP 10 $\mu$ g	
8CTXC	ETAR de Sobreiras	6	15	7 (sy)	12 (sy)	18 (sy)	11	22	>30	28	<i>K. pneumoniae</i>
9CTXD	ETAR de Madalena	6	16	14 (sy)	20	20	16 (sy)	25	30	30	<i>E. coli</i> **
13CTXA	ETAR de Serzedelo	6	18	9 (sy)	18	21	15	26	28	28	<i>E. coli</i> **
14CTXA	ETAR de Lordelo	6	11	6 (sy)	11 (sy)	18 (sy)	9 (sy)	28	26	>30	<i>K. pneumoniae</i>
16CTXA	ETAR da Rabada	6	16	14 (sy)	22	>30	20	28	>30	30	<i>K. pneumoniae</i> **
16CTXB	ETAR da Rabada	6	20	19 (sy)	28	>30	28	>30	>30	>30	<i>E. coli</i> **
18CTXA	ETAR de Febros	6	6	6 (sy)	20	23	15	25	30	26	<i>E. coli</i> **
18CTXC	ETAR de Febros	6	6	22 (sy)	25	28	24	30	>30	30	<i>E. coli</i> **

**Legenda:** \* antibióticos  $\beta$ -lactâmicos: AUG - amoxicilina com ácido clavulânico, AML - ampicilina, CTX - cefotaxima, CAZ - ceftazidima, FEP - cefepime, ATM - aztreonamo, FOX - cefoxitina, IMP - imipenemo, ETP – ertapenemo. sy – sinergismo entre o oximino- $\beta$ -lactâmico e amoxicilina com ácido clavulânico. \*\* halo superior a 5 mm no teste de adição do ácido clavulânico. Avaliação qualitativa da resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos segundo diretrizes do CLSI (2014): **Isolado resistente**; **Isolado com sensibilidade intermédia**; **Isolado sensível**.



Através do perfil de suscetibilidade dos isolados podemos depreender que todos os 8 isolados são resistentes a dois ou mais oximino- $\beta$ -lactâmicos. Como seria de esperar, pois é uma característica das ESBLs. A resistência dos isolados 14CTXA, 18CTXA e 18CTXC e a sensibilidade intermédia dos isolados 8CTXC, 9CTXD e 16CTXA à combinação de  $\beta$ -lactâmico/ inibidor das  $\beta$ -lactamases (amoxicilina com ácido clavulânico) pode ser explicada pela presença simultânea de outros mecanismos de resistência. Como por exemplo, produção de enzimas AmpC, produção de enzimas OXA, hiperprodução de TEM ou diminuição da permeabilidade<sup>170,171</sup>. No entanto, os 8 isolados apresentaram sensibilidade em relação aos carbapenemos, o que foi também demonstrado por Zarfel, G *et al.*<sup>172</sup>, podendo indicar a ausência de produção de carbapenemases.

Curiosamente foram detetados mais isolados produtores de ESBLs em ETARs de zonas rurais (ETAR da Rabada com 2 isolados e ETAR de Febros com 2 isolados).

A Figura 28 apresenta a localização das ETARs onde foram detetados isolados produtores de ESBLs, bem como, os hospitais e as unidades de cuidados continuados integrados (UCCI) circundantes a estas.

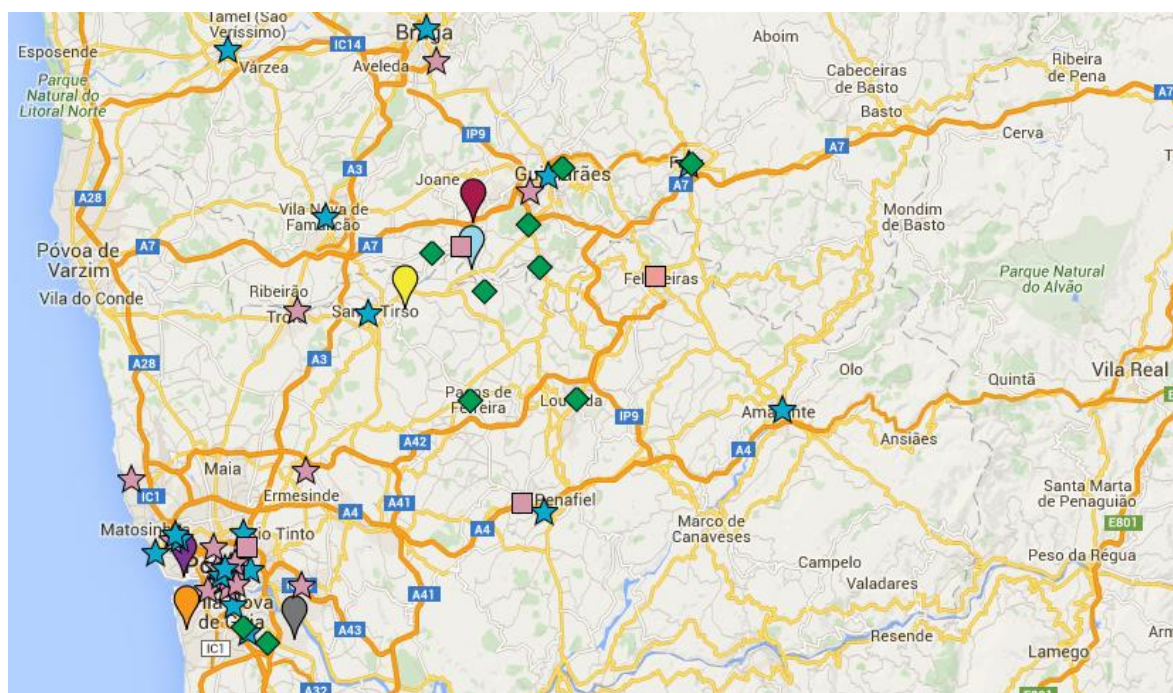









Figura 28 - Distribuição geográfica das ETARs onde foram detetados isolados produtores de ESBLs, bem como, hospitais e UCCI circundantes

**Legenda:** ETAR de Serzedelo, ETAR de Lordelo, ETAR da Rabada, ETAR de Sobreiras, ETAR da Madalena, ETAR de Febros, Hospitais Públicos, Hospitais Privados, Hospitais privados com valência de Unidade de Cuidado Continuado Integrado, UCCI.

Através da Figura 28 podemos verificar que as ETARs de zonas urbanas (ETAR de Sobreiras e ETAR da Madalena) apresentam um elevado número de hospitais nas



Terceira de São Francisco,  Hospital do Terço,  Hospital Privado dos Clérigos,  Hospital da Ordem do Carmo,  Hospital da Ordem da Trindade,  Centro Hospitalar do Porto – Hospital Maria Pia,  Hospital da Lapa,  Hospital de Santa Maria.

A Figura 30 apresenta uma perspetiva com maior pormenor dos hospitais e UCCI que rodeiam as ETARs da Rabada, de Lordelo e de Serzedelo.

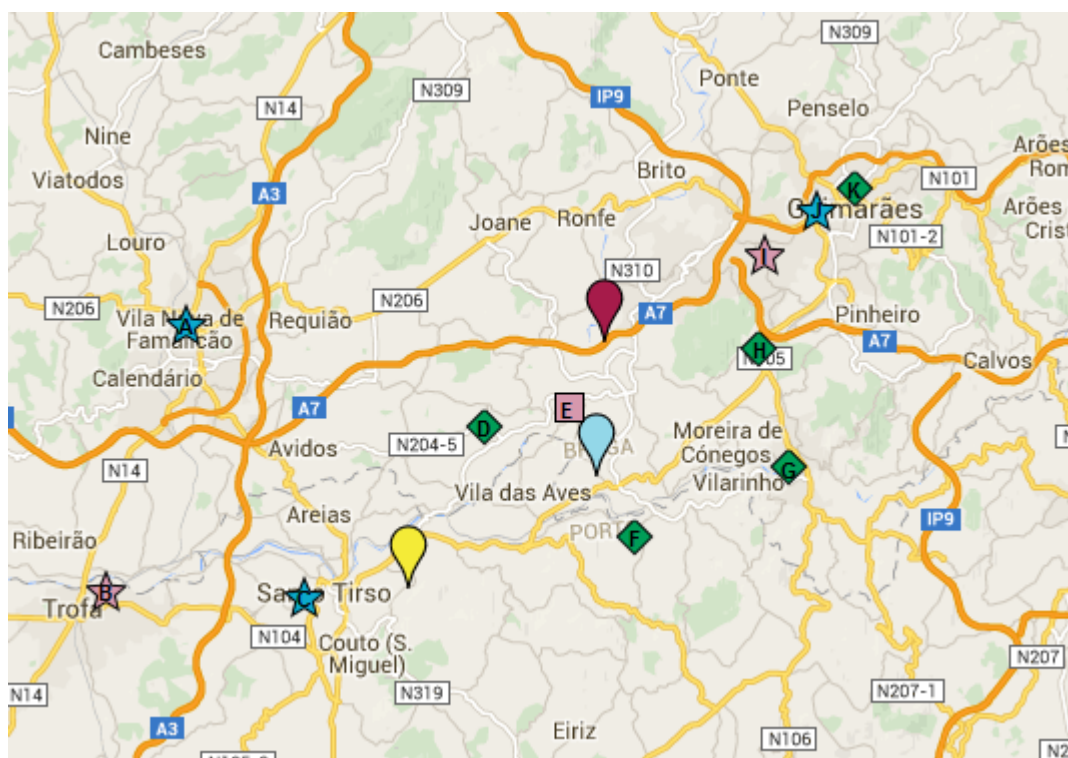


Figura 30 - Distribuição geográfica pormenorizada das ETARs da Rabada, de Lordelo e de Serzedelo onde foram detetados isolados produtores de ESBLs, bem como, distribuição dos hospitais e UCCI circundantes

**Legenda:**  ETAR da Rabada,  ETAR de Lordelo,  ETAR de Serzedelo,  Hospitais Públicos,  Hospitais Privados,  Hospitais privados com valência de Unidade de Cuidado Continuado Integrado,  UCCI,  Centro Hospitalar do Médio Ave – Unidade de Famalicão,  Hospital Privado da Trofa,  Centro Hospitalar do Médio Ave – Unidade de Santo Tirso,  Divino Salvador,  Hospital Narciso Ferreira – Irmandade da Santa Casa da Misericórdia de Riba de Ave,  Celestial Ordem Terceira da Santíssima Trindade,  Santa Casa da Misericórdia de Vizela,  Centro Social da Paróquia de Santa Eulália de Nespereira,  Hospital Privado de Guimarães,  Centro Hospitalar do Alto Ave – Unidade de Guimarães,  Santa Casa da Misericórdia de Guimarães.

A presença de isolados produtores de ESBLs em lamas de ETARs de zonas urbanas pode ser explicada pelo facto das ETARs provavelmente receberem as águas residuais



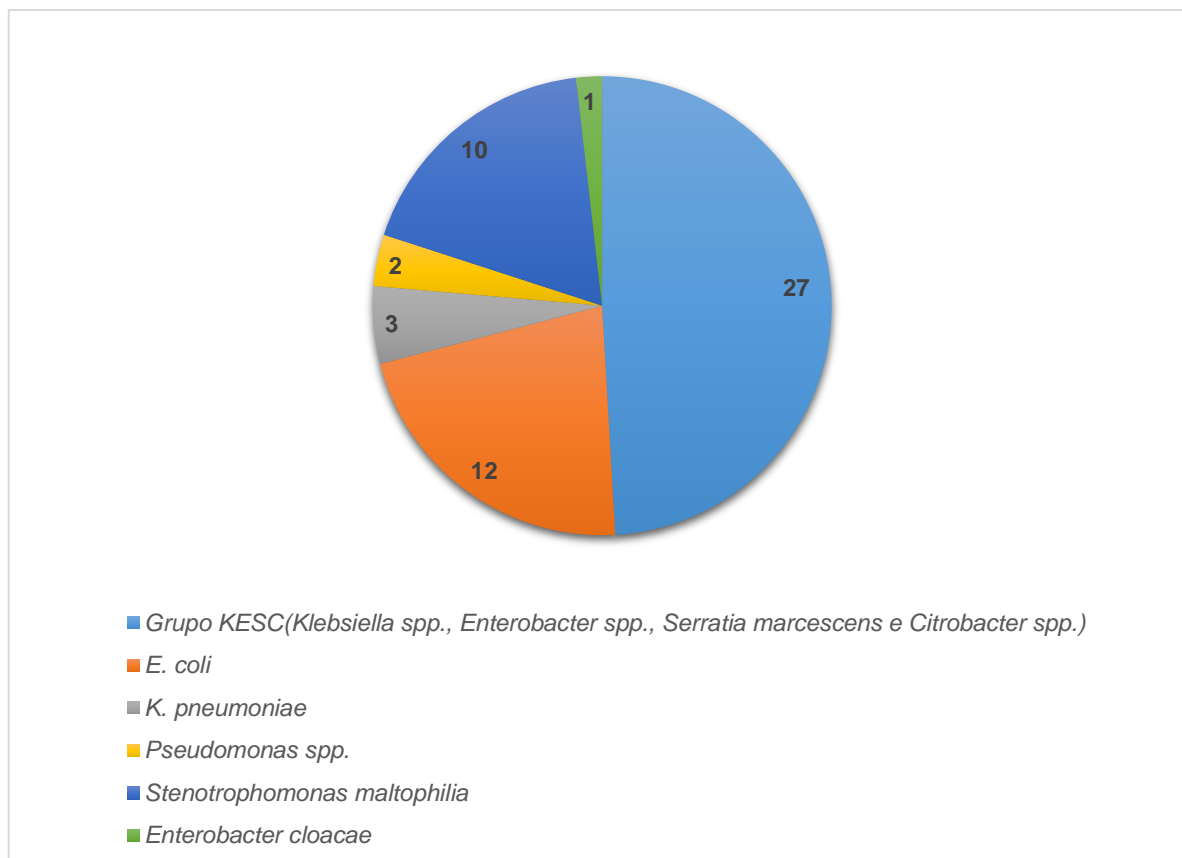
provenientes dos hospitais, tanto públicos como privados. Através da Figura 29 pode-se visualizar o elevado número de hospitais que estão nas proximidades da ETAR de Sobreiras. No caso da ETAR de Madalena o número de hospitais nas proximidades é inferior (quando comparada com a ETAR de Sobreiras), no entanto as águas residuais destes podem contribuir para a presença deste tipo de isolados.

Por outro lado, nas ETARs de zonas rurais (ETAR de Serzedelo, ETAR de Lordelo, ETAR da Rabada e ETAR de Febros), onde foram detetados um maior número de isolados produtores de ESBLs, a presença deste tipo de bactérias pode relacionar-se com as UCCI circundantes (que estão em maior número em relação aos hospitais) (Figura 29 e Figura 30). Não há indicações acerca do percurso das águas residuais das UCCI, no entanto, tendo em conta a sua localização supõe-se que são as ETARs das proximidades que fazem a gestão das águas residuais. Assim, as unidades de cuidados continuados integrados podem apresentar um papel preponderante na presença de ESBLs nas lamas destas ETARs. Deverá realizar-se estudos futuros no sentido de avaliar esta realidade.

### **3. Identificação dos isolados de lamas residuais**

A identificação presuntiva, através do *CHROMagar™ Orientation*, foi realizada em todos os 55 isolados. No entanto, nos 8 isolados que apresentaram um fenótipo de ESBL, a identificação foi confirmada através da galeria API®20E e/ou galeria de identificação ID32 GN.

O Gráfico 1 apresenta a identificação em função do número de isolados:



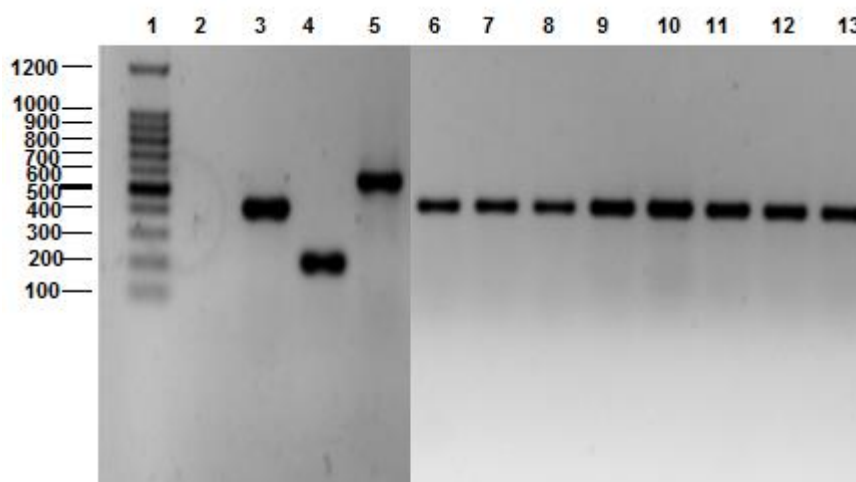
**Gráfico 1- Identificação dos 55 isolados de lamas residuais desidratadas em função do número de isolados**

Através do Gráfico 1 podemos verificar a predominância da família *Enterobacteriaceae*, tal como esperado, tendo em consideração a origem das amostras, bem como, a metodologia concebida. Merecendo especial destaque as principais representantes desta família, *E. coli* com 12 isolados – sendo 5 isolados produtores de ESBLs – e *K. pneumoniae* com 3 isolados – em que 3 isolados são produtores de ESBLs.

No entanto, tal como referido anteriormente, também foi dada a devida atenção às bactérias Gram-negativas não fermentadoras da lactose, como é o caso da *Stenotrophomonas maltophilia* (10 isolados). Recentemente, este bacilo aeróbio Gram-negativo emergiu como um importante agente patogénico oportunista multirresistente. A crescente incidência de infeções nosocomiais e adquiridas na comunidade, provocadas por *Stenotrophomonas maltophilia*, está a suscitar uma elevada preocupação, especialmente em pacientes imunodeprimidos, devido às elevadas taxas de mortalidade associadas a este agente<sup>173</sup>. A sua presença em lamas de ETAR, com um perfil relevante de resistência aos agentes antimicrobianos, poderá indicar a disseminação deste agente patogénico oportunista multirresistente na população portuguesa.

#### 4. Determinação do genótipo de resistência aos antibióticos em isolados de lamas residuais

Nos 8 isolados de lamas residuais que apresentaram produção de ESBL, no teste de suscetibilidade aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e na adição de ácido clavulânico ao disco de oximino- $\beta$ -lactâmico com maior redução de suscetibilidade, foi realizada a determinação dos genes produtores de  $\beta$ -lactamases. Esta determinação, por PCR, incidiu nos genes das principais famílias das ESBLs, da classe A, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>, segundo Ambler. A pesquisa dos genes *bla* permitiu detetar *bla*<sub>CTX-M grupo 1</sub> nos 8 isolados (Figura 31).



**Figura 31 - Visualização dos produtos de amplificação, resultantes da PCR multiplex para pesquisa dos genes *bla*<sub>CTX-M</sub>, em gel de agarose**

**Legenda:** 1 – Marcador de peso molecular (pares de base), 2 – Controle negativo, 3 – Controle positivo *bla*<sub>ctx-m grupo 1</sub>, 4 – Controle positivo *bla*<sub>ctx-m grupo 25</sub>, 5 - Controle positivo *bla*<sub>ctx-m grupo 2</sub>, 6 – Isolado 8CTXC, 7 – Isolado 9CTXD, 8 – Isolado 13CTXA, 9 – Isolado 14CTXA, 10 – Isolado 16CTXA, 11 – Isolado 16CTXB, 12 – Isolado 18CTXA, 13 – Isolado 18CTXC.

Através da Figura 31, podemos verificar que a pesquisa dos genes *bla*<sub>CTX-M</sub> permitiu detetar *bla*<sub>CTX-M grupo 1</sub> nos 8 isolados. A presença de bactérias *E. coli* e *K. pneumoniae*, que transportam o gene CTX-M, tem sido frequentemente demonstrado em lamas de ETAR<sup>172,174,175</sup>. Vários estudos, também, apontam para a presença simultânea do gene CTX-M e do gene TEM, que podem ser responsáveis pelos fenótipos com elevado nível de resistência<sup>174,176</sup>. No entanto, esta particularidade não ficou demonstrada neste estudo, pois a pesquisa dos genes *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> e *bla*<sub>OXA</sub> foi negativa nos 8 isolados.

A pesquisa dos genes *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>NDM</sub> e *bla*<sub>KPC</sub>, nos 22 isolados que apresentaram redução da suscetibilidade aos carbapenemos testados (ertapenemo e imipenemo) no teste de suscetibilidade aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos pelo método de difusão em agar (Tabela 6), foi negativa. A pesquisa de carbapenemases neste estudo foi importante, pois vários estudos detetaram a presença de carbapenemases no meio ambiente<sup>177-179</sup>, como por exemplo, em águas residuais (“matéria-prima” das lamas de

ETAR)<sup>180</sup>. Além disso, um estudo nacional descreveu em Portugal a primeira *E. coli* portadora do gene *bla*<sub>KPC-2</sub>, em amostras de água do rio de Santo Tirso<sup>177</sup>. Como a ETAR da Rabada recebe as águas residuais de Santo Tirso, era interessante cruzar esta informação, e verificar se esta ou outras carbapenemases estão presentes nas águas residuais e nas lamas desta ETAR. No entanto, neste estudo não foi confirmada a presença de carbapenemases nem nas lamas da Rabada, nem nas restantes ETARs analisadas.

Resultados e Discussão

Tabela 6 - Caracterização do fenótipo de resistência aos antibióticos β-lactâmicos dos isolados submetidos à pesquisa de carbapenemases

Isolado	Origem	Suscetibilidade aos antibióticos β-lactâmicos (halo em mm) *									Identificação**
		AML 10 µg	AUG 30 µg	CTX 30 µg	CAZ 30 µg	FEP 30 µg	ATM 30 µg	FOX 30 µg	IMI 10 µg	ETP 10 µg	
8MEROA	ETAR de Sobreiras	6	6	>30	20	28	20	6	12	6	KESC
8MEROB	ETAR de Sobreiras	6	6	23	18	>30	>30	6	17	8	KESC
8MERO C	ETAR de Sobreiras	6	6	25	14	30	>30	6	14	8	KESC
8MEROD	ETAR de Sobreiras	6	6	24	16	>30	>30	6	18	14	KESC
8MEROE	ETAR de Sobreiras	6	6	30	23	>30	29	6	21	6	KESC
8MERO F	ETAR de Sobreiras	6	9	30	13	>30	29	6	15	6	KESC
8MERO G	ETAR de Sobreiras	6	6	28	22	>30	>30	6	21	21	KESC
8MERO H	ETAR de Sobreiras	6	6	24	17	>30	>30	6	13	8	KESC
9MEROA	ETAR da Madalena	6	6	27	23	28	22	13	13	6	KESC
9MERO C	ETAR da Madalena	6	6	26	22	28	>30	24	15	6	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
9MEROD	ETAR da Madalena	6	6	18	21	23	30	8	14	6	<i>E. coli</i>



### Resultados e Discussão

9MEROF	ETAR da Madalena	6	6	22	12	27	26	6	18	6	KESC
13MEROA	ETAR de Serzedelo	6	6	23	11	>30	28	6	18	9	KESC
13MEROB	ETAR de Serzedelo	6	6	23	11	>30	28	6	18	9	KESC
13MEROC	ETAR de Serzedelo	6	6	8	11	28	14	6	10	6	KESC
13MEROD	ETAR de Serzedelo	6	6	8	11	>30	14	6	10	6	KESC
15MEROA	ETAR de Agra	6	6	12	14	28	23	6	19	17	<i>E. coli</i>
15MEROB	ETAR de Agra	6	6	6	15	11	6	6	6	6	<i>Pseudomonas</i> spp.
16MEROB	ETAR da Rabada	6	6	6	6	13	6	6	6	6	<i>Stenotrophomonas</i> <i>maltophilia</i> ***
17MEROA	ETAR Ponte da Ribeira	17	10	17	22	26	17	10	20	19	<i>Stenotrophomonas</i> <i>maltophilia</i>
18MEROA	ETAR de Febros	14	6	12	16	18	12	11	19	14	<i>Stenotrophomonas</i> <i>maltophilia</i> ***
18MEROB	ETAR de Febros	14	6	12	21	25	15	6	21	15	<i>Stenotrophomonas</i> <i>maltophilia</i>

**Legenda:** \* antibióticos  $\beta$ -lactâmicos: AUG - amoxicilina com ácido clavulânico, AML - ampicilina, CTX - cefotaxima, CAZ - ceftazidima, FEP - cefepime, ATM - aztreonamo, FOX - ceftoxitina, IMP - imipenemo, ETP – ertapenemo. \*\* identificação presuntiva por *CHROMagar™ Orientation* – KESC (*Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia marcescens* e *Citrobacter* spp.). \*\*\* identificação confirmada com ID32 GN. Avaliação qualitativa da resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos segundo diretrizes do CLSI (2014): **Isolado resistente**; **Isolado com sensibilidade intermédia**; **Isolado sensível**.



## CONCLUSÃO

---

Os antibióticos são, provavelmente, a família mais bem-sucedida de fármacos no que concerne à melhoria da saúde humana. Contudo, nos últimos anos tem-se assistido a um grave aumento das taxas de resistência bacteriana.

A presença de bactérias resistentes aos antibióticos na comunidade e em ambiente hospitalar, bem como, os seus efeitos ecotóxicos continuam a ser uma problemática muito atual. Ao longo da última década, a prevalência de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL tem atraído a atenção das autoridades de saúde, uma vez que a sua presença não é exclusiva em pacientes, podendo ser encontradas em indivíduos saudáveis, animais e ambiente (como nas lamas de ETAR) <sup>175</sup>.

A partir das lamas de ETARs analisadas (ETAR de Agra, ETAR de Serzedelo, ETAR de Lordelo, ETAR da Rabada, ETAR de Sobreiras, ETAR do Freixo, ETAR da Madalena, ETAR de Febros e ETAR da Ponte da Ribeira) obtivemos conhecimento acerca da presença de bactérias resistentes aos antibióticos. Verificou-se que a presença deste tipo de bactérias não é exclusiva das zonas urbanas, em que à partida o elevado número de hospitais presentes nestas zonas poderá apresentar um contributo superior na disseminação deste tipo de bactérias quando comparado com zonas rurais, que apresentam um menor número de hospitais. Porém, a realidade é ligeiramente diferente, pois de acordo com as localizações das UCCIs, estas instalações também poderão apresentar um papel importante na disseminação de bactérias resistentes aos antibióticos, com maior impacto nas ETARs das zonas rurais.

No presente estudo ficou demonstrada a presença de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs nas lamas de ETAR. Dos 55 isolados selecionados, 8 isolados apresentaram fenótipo de ESBL, sendo 5 isolados *E.coli* e 3 isolados *K. pneumoniae*. Portanto, as lamas de ETAR podem ser um importante reservatório de bactérias resistentes aos antibióticos, principalmente as lamas de ETAR desidratadas. No entanto, apesar de ser um dado preocupante a presença de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs nas lamas desidratadas fornecidas pelas ETARs, por regra estas devem ser submetidas a um processo de estabilização que fica à responsabilidade do comprador, antes de serem aplicadas nos solos agrícolas. Desta forma, previne-se a disseminação deste tipo de bactérias. Em Portugal, existe pouco conhecimento acerca da realidade dos compradores das lamas de ETAR. Assim, não se sabe quais são os critérios que cumprem e em que medida contribuem para a disseminação de bactérias resistentes aos antibióticos.

Ao contrário da desidratação das lamas, a estabilização de lamas com cal mostrou-se uma alternativa eficaz, no entanto, apresenta algumas limitações. Nomeadamente, a manutenção do pH para valores superiores a 11 (valores de pH inferiores origina um ambiente favorável para a reativação ou crescimento de agentes patogénicos), não há

redução da quantidade de biossólidos (quando comparados a métodos de estabilização biológicos) chegando mesmo a aumentar a quantidade com a adição da cal, que consequentemente aumenta os custos de transporte <sup>181</sup>.

Em suma, em Portugal, não existem muitos estudos relativamente a esta problemática, portanto este estudo demonstra que as lamas de ETAR poderão funcionar como reservatório de bactérias resistentes aos antibióticos e de genes de resistência apresentando relevância na disseminação no meio ambiente, com impacto desconhecido em termos de saúde pública.



## PERSPETIVAS FUTURAS

No sentido de aprofundar o conhecimento e importância deste estudo, no âmbito da presença de *Enterobacteriaceae* produtoras de  $\beta$ -lactamases de espectro alargado em lamas de ETAR, seria importante realizar a:

- ❖ Caracterização molecular para confirmação da hipótese de CTX-M-15 como mais provável representante das  $\beta$ -lactamases CTX-M grupo 1;
- ❖ Estudo da permeabilidade da membrana externa e outros mecanismos de resistência que conferem resistência a outras famílias de antibióticos, através de técnicas de biologia molecular;
- ❖ Recolher um maior número de amostras para ser um estudo mais abrangente;
- ❖ Relação de clonalidade entre os isolados presentes num hospital e nas lamas da ETAR que serve esse hospital (por exemplo, através da técnica de Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)).
- ❖ Fazer um estudo no solo que recebe as lamas para compreender qual o período de tempo em que as bactérias permanecem viáveis e verificar se há contaminação dos aquíferos das proximidades.
- ❖ Conhecer a realidade dos compradores de lamas de ETAR. Quais as precauções e controlos que a legislação impõe ao produto.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Benedini M, Tsakiris G. Water quality modelling for rivers and streams. 1st ed. Dordrecht: Springer; 2013.
2. Mendes B, Oliveira JFS. Qualidade da água para consumo humano. Lisboa: Lidel; 2004.
3. Pfister S, Bayer P, Koehler A, Hellweg S. Projected water consumption in future global agriculture: Scenarios and related impacts. *Sci Total Environ*. 2011 Sep;409(20):4206–16.
4. Unesco. Knowledge Base. Paris: UNESCO; 2012.
5. Ridoutt BG, Pfister S. A revised approach to water footprinting to make transparent the impacts of consumption and production on global freshwater scarcity. *Glob Environ Change*. 2010 Feb;20(1):113–20.
6. Kiulia N, Hofstra N, Vermeulen L, Obara M, Medema G, Rose J. Global Occurrence and Emission of Rotaviruses to Surface Waters. *Pathogens*. 2015 May 13;4(2):229–55.
7. Corcoran E, Christian N, Baker, Elaine, Bos, Robert, Osborn, David, Savelli, Heidi. Sick water? The central role of wastewater management in sustainable development: a rapid response assessment. Noruega: UNEP/GRID-Arendal; 2010.
8. Ministério do Ambiente. Decreto-lei n.º 152/1997 de 19 de Junho. Diário da República. Série I-A, nº131 1997.
9. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Microbiology: an introduction. 10th ed. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings; 2010.
10. União Europeia, Eurostat. Environmental statistics and accounts in Europe. Luxembourg; 2010.
11. Henze M. Biological wastewater treatment: principles, modelling and design. London: IWA Pub; 2008.
12. NG WJ. Industrial wastewater treatment. London: Imperial College Press ; Distributed by World Scientific Pub. Co; 2006.
13. Bitton G. Wastewater microbiology. 4th ed. Hoboken, N.J: Wiley-Blackwell; 2011. 781 p.



14. Comissão Europeia. Disposal and recycling routes for sewage sludge. Part 3 – Scientific and technical report. Luxemburgo; 2001.
15. Mara DD. Domestic wastewater treatment in developing countries. London; Sterling, VA: Earthscan Publications; 2004 .
16. Kamika I, Momba MN. Assessing the resistance and bioremediation ability of selected bacterial and protozoan species to heavy metals in metal-rich industrial wastewater. *BMC Microbiol.* 2013 Feb 6;13(1):28.
17. Ren S, Frymier PD. The use of a genetically engineered *Pseudomonas* species (Shk1) as a bioluminescent reporter for heavy metal toxicity screening in wastewater treatment plant influent. *Water Environ Res Res Publ Water Environ Fed.* 2003 Feb;75(1):21–9.
18. Simões C, Rosmaninho I, Henriques AG. Guia para a Avaliação de Impacte Ambiental de Estações de Tratamento de Águas Residuais. Agência Portuguesa do Ambiente. Amadora: Eurodois; 2008.
19. Malta TS. Aplicação de lodos de Estações de Tratamento de Esgotos na agricultura: Estudo de caso Município de Rio das Ostras – RJ. [Rio de Janeiro]: Dissertação – Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública.; 2001.
20. Wiesmann U, Choi IS, Dombrowski E-M. Fundamentals of biological wastewater treatment. Weinheim: Wiley-VCH; 2007.
21. Morling S. How Sustainable Is Our Wastewater Treatment? *J Water Resour Prot.* 2014 Sep 12;06(12):1060–5.
22. União Europeia, Eurostat. Changes in wastewater treatment in Southern European countries between 1980s and 2009 ; 2013.
23. Naidoo S, Olaniran A. Treated Wastewater Effluent as a Source of Microbial Pollution of Surface Water Resources. *Int J Environ Res Public Health.* 2013 Dec 23;11(1):249–70.
24. Signorile G, Molinari A, Lugoli F, Sciancalepore L, Montemurro P, De Donno A. Study of the correlation between microfauna and the macrostructure of activated sludge and the efficiency of biological wastewater treatment plants. *J Prev Med Hyg.* 2010 Mar;51(1):15–9.

25. Araújo dos Santos L, Ferreira V, Neto MM, Pereira MA, Mota M, Nicolau A. Study of 16 Portuguese activated sludge systems based on filamentous bacteria populations and their relationships with environmental parameters. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2015 Jun;99(12):5307–16.
26. Wágner DS, Ramin E, Szabo P, Dechesne A, Plósz BG. *Microthrix parvicella* abundance associates with activated sludge settling velocity and rheology – Quantifying and modelling filamentous bulking. *Water Res*. 2015 Jul;78:121–32.
27. Zhou X, Guo H, Li Z, Zhao J, Yun Y. Experimental study on the disinfection efficiencies of a continuous-flow ultrasound/ultraviolet baffled reactor. *Ultrason Sonochem*. 2015 Nov;27:81–6.
28. Li R, Gao B, Ma D, Rong H, Sun S, Wang F, et al. Effects of chlorination operating conditions on trihalomethane formation potential in polyaluminum chloride-polymer coagulated effluent. *J Hazard Mater*. 2015 Mar;285:103–8.
29. Ferraz F de M. Recuperação da amônia libertada no processo “air stripping” aplicado ao tratamento do lixiviado de aterros sanitários. Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo; 2010.
30. Ministério do Ambiente. Decreto-lei n.º 276/2009 de 2 de Outubro. Diário da República. Série I, nº192 2009.
31. Cao Y, Pawłowski A. Sewage sludge-to-energy approaches based on anaerobic digestion and pyrolysis: Brief overview and energy efficiency assessment. *Renew Sustain Energy Rev*. 2012 Apr;16(3):1657–65.
32. Tello-Andrade AF, Jiménez-Moleón MC, Sánchez-Galván G. Management of sewage sludge by composting using fermented water hyacinth. *Environ Sci Pollut Res*. 2015 May 20;
33. Stiborova H, Wolfram J, Demnerova K, Macek T, Uhlík O. Bacterial community structure in treated sewage sludge with mesophilic and thermophilic anaerobic digestion. *Folia Microbiol (Praha)*. 2015 Apr 30;
34. Roig N, Sierra J, Nadal M, Martí E, Navalón-Madrigal P, Schuhmacher M, et al. Relationship between pollutant content and ecotoxicity of sewage sludges from Spanish wastewater treatment plants. *Sci Total Environ*. 2012 May;425:99–109.

35. Agência Europeia do Ambiente. Indicator Fact Sheet Signals 2001 – Chapter Waste. Sewage sludge - a future waste problem? 2001.
36. Gonçalves J, Leitão J, Carvalho M, Matos JS. Produção e destino final das lamas de ETAR em Portugal. Situação Atual e Perspetivas de Evolução, Comunicação apresentada no Encontro Nacional de Entidades Gestoras de Água e Saneamento, ENEG. 2001; Lisboa.
37. Agência Portuguesa do Ambiente. PENSAAR 2020. Uma Estratégia ao Serviço da População: Serviços de Qualidade a um Preço Sustentável. Fase 1: Situação de Referência; 2014 .
38. Agência Portuguesa do Ambiente. PENSAAR 2020. Uma Estratégia ao Serviço da População: Serviços de Qualidade a um Preço Sustentável. Fases 2,3 e 4: Quadro Estratégico, Plano de Ação e Plano de Gestão; 2014.
39. Pilli S, Bhunia P, Yan S, LeBlanc RJ, Tyagi RD, Surampalli RY. Ultrasonic pretreatment of sludge: A review. Ultrason Sonochem. 2011 Jan;18(1):1–18.
40. Berco V. Análise Qualitativa de Lamas de ETAR e Competitividade Económica dos Processos de Tratamento e Escoamento: Caso da ETAR da Guia. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia do Ambiente – Tecnologias Ambientais [Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia do Ambiente – Tecnologias Ambientais]. [Lisboa]: Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa; 2013.
41. Rasquilha FJT. Contribuição para o Tratamento e Gestão das Lamas em Excesso das Estações de Tratamento de Águas residuais - Caso de Estudo de Otimização para 4 ETAR do Concelho de Elvas. Dissertação apresentada na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia do Ambiente, perfil Engenharia Sanitária. [Lisboa]: Universidade Nova de Lisboa. Faculdade de Ciência e Tecnologia; 2010.
42. Qasim SR. Wastewater treatment plants: planning, design, and operation. 2nd ed. Lancaster: Technomic Pub. Co; 1999.
43. Barbosa JA. Valorização de Lamas Provenientes do Tratamento de Águas Residuais. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Sanitária. Universidade Nova de Lisboa. Faculdade de Ciência e Tecnologia; 2008.

44. Asik BB, Aydinalp C, Katkat AV, Sagban FOT. Effect of the application of various wastewater sludges on the properties of sandy soil. *Environ Monit Assess.* 2015 Feb;187(2).
45. Ottosen LM, Kirkelund GM, Jensen PE. Extracting phosphorous from incinerated sewage sludge ash rich in iron or aluminum. *Chemosphere.* 2013 May;91(7):963–9.
46. Alvarenga P, Mourinha C, Farto M, Santos T, Palma P, Sengo J, et al. Sewage sludge, compost and other representative organic wastes as agricultural soil amendments: Benefits versus limiting factors. *Waste Manag.* 2015 Jun;40:44–52.
47. Waqas M, Li G, Khan S, Shamshad I, Reid BJ, Qamar Z, et al. Application of sewage sludge and sewage sludge biochar to reduce polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and potentially toxic elements (PTE) accumulation in tomato. *Environ Sci Pollut Res.* 2015 Aug;22(16):12114–23.
48. Kaya D, Karakas F, Sanin FD, Imamoglu I. PCBs in Sludge: Development of a Practical Extraction Procedure and Its Application in an Urban Water Resource Recovery Facility. *Water Environ Res.* 2015 Feb 1;87(2):145–51.
49. Sano D, Fukushi K, Yoshida Y, Omura T. Detection of enteric viruses in municipal sewage sludge by a combination of the enzymatic virus elution method and RT-PCR. *Water Res.* 2003 Aug;37(14):3490–8.
50. Mannarino CF, Moreira JC, Ferreira JA, Arias ARL. Avaliação de impactos do efluente do tratamento combinado de lixiviado de aterro de resíduos sólidos urbanos e esgoto doméstico sobre a biota aquática. *Ciênc Saúde Coletiva.* 2013 Nov;18(11):3235–43.
51. Novo A, André S, Viana P, Nunes OC, Manaia CM. Antibiotic resistance, antimicrobial residues and bacterial community composition in urban wastewater. *Water Res.* 2013 Apr;47(5):1875–87.
52. Lo KV, Srinivasan A, Liao PH, Bailey S. Microwave oxidation treatment of sewage sludge. *J Environ Sci Health Part A.* 2015 Jul 3;50(8):882–9.
53. Trzcinski AP, Tian X, Wang C, Lin LL, Ng WJ. Combined ultrasonication and thermal pre-treatment of sewage sludge for increasing methane production. *J Environ Sci Health Part A.* 2015 Jan 28;50(2):213–23.

54. Pybus PJ, Water Institute of Southern Africa, South Africa, Water Research Commission, East Rand Water Care Company. Handbook for the operation of wastewater treatment works. Water Institute of Southern Africa; 2002.
55. Santos JFS. Metodologia de Tratamento de Lamas e Organização do Balanço de Massas. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Engenharia na Área de Especialização de Hidráulica. [Lisboa]: Instituto Superior de Engenharia de Lisboa; 2012.
56. Wilson ID, Poole CF. Handbook of methods and instrumentation in separation science. Boston, Mass.: Elsevier; 2009.
57. Cheng J, Kong F, Zhu J, Wu X. Effects of stabilization and sludge properties in a combined process of anaerobic digestion and thermophilic aerobic digestion. Environ Technol. 2015 Jun 4;1–10.
58. Jin N, Jin B, Zhu N, Yuan H, Ruan J. Disinhibition of excessive volatile fatty acids to improve the efficiency of autothermal thermophilic aerobic sludge digestion by chemical approach. Bioresour Technol. 2014 Oct 22;175C:120–7.
59. Layden NM. An evaluation of autothermal thermophilic aerobic digestion (ATAD) of municipal sludge in Ireland. J Environ Eng Sci. 2007 Jan 1;6(1):19–29.
60. Astals S, Venegas C, Peces M, Jofre J, Lucena F, Mata-Alvarez J. Balancing hygienization and anaerobic digestion of raw sewage sludge. Water Res. 2012 Dec;46(19):6218–27.
61. Florindo FM de LR. Caracterização das lamas geradas e sua valorização nos subsistemas dos SMAS-Sintra. Delineamento de um Modelo Conceptual de Gestão. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia do Ambiente – Tecnologias Ambientais. [Lisboa]: Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa; 2009.
62. Sevilla-Perea A, Mingorance MD. Field approach to mining-dump revegetation by application of sewage sludge co-compost and a commercial biofertilizer. J Environ Manage. 2015 Aug;158:95–102.
63. Huang X, Xue D, Xue L. Changes in soil microbial functional diversity and biochemical characteristics of tree peony with amendment of sewage sludge compost. Environ Sci Pollut Res. 2015 Aug;22(15):11617–25.

64. Mendes SIS. Valorização de lamas de tratamento de águas residuais urbanas para utilização agrícola. Trabalho de Dissertação de natureza científica para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Civil na Área de Especialização em Hidráulica. [Lisboa]: Instituto Superior de Engenharia de Lisboa; 2014.
65. Pita FAG. Armazenamento e tratamento de resíduos. Volume II - Tratamento de águas residuais domésticas. [Coimbra]: Departamento de Ciências da Terra. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra; 2002.
66. Babel S, del Mundo Dacera D. Heavy metal removal from contaminated sludge for land application: A review. *Waste Manag.* 2006 Jan;26(9):988–1004.
67. Carvalho ACPT. Estudo integrado para transporte, tratamento, valorização e destino final das lamas produzidas na ETAR de Sobreiras, na ETAR do Freixo. Dissertação submetida para satisfação parcial dos requisitos do grau de Mestre em Engenharia do Ambiente. [Porto]: Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto; 2010.
68. Cokgor EU, Aydinli E, Tas DO, Zengin GE, Orhon D. Impact of aerobic stabilization on the characteristics of treatment sludge in the leather tanning industry. *Environ Technol.* 2014 Mar 19;35(6):719–26.
69. Ministério do Ambiente. Decreto-lei n.º 152/2002 de 23 de Maio 2002.
70. Zeng X, Ding W, Zhang Z, Wan P, Deng Y, Wang S. Effect of the mixing ratio during co-treatment of landfill leachate and sewage with a combined stripping and reversed A (2/O) process. *Environ Technol.* 2015 Oct 18;36(20):2668–73.
71. Rong L, Maneerung T, Ng JC, Neoh KG, Bay BH, Tong YW, et al. Co-gasification of sewage sludge and woody biomass in a fixed-bed downdraft gasifier: Toxicity assessment of solid residues. *Waste Manag.* 2015 Feb;36:241–55.
72. Li R, Zhang Z, Li Y, Teng W, Wang W, Yang T. Transformation of apatite phosphorus and non-apatite inorganic phosphorus during incineration of sewage sludge. *Chemosphere.* 2015 Dec;141:57–61.
73. Donatello S, Cheeseman CR. Recycling and recovery routes for incinerated sewage sludge ash (ISSA): A review. *Waste Manag.* 2013 Nov;33(11):2328–40.

74. Navab-Daneshmand T, Enayet S, Gehr R, Frigon D. Bacterial pathogen indicators regrowth and reduced sulphur compounds' emissions during storage of electro-dewatered biosolids. *Chemosphere*. 2014 Oct;113:109–15.
75. Peccia J, Westerhoff P. We Should Expect More out of Our Sewage Sludge. *Environ Sci Technol*. 2015 Jul 21;49(14):8271–6.
76. Song I, O'Shaughnessy SA, Choi CY, Gerba CP. Impacts of tilling and covering treatments on the biosolids solar drying conversion from class B to class A. *Environ Technol*. 2014 Oct;35(17-20):2610–8.
77. McCall CA, Jordan KS, Habash MB, Dunfield KE. Monitoring *Bacteroides* spp. markers, nutrients, metals and *Escherichia coli* in soil and leachate after land application of three types of municipal biosolids. *Water Res*. 2015 Mar;70:255–65.
78. Luo K, Ma T, Liu H, Wu L, Ren J, Nai F, et al. Efficiency of Repeated Phytoextraction of Cadmium and Zinc from an Agricultural Soil Contaminated with Sewage Sludge. *Int J Phytoremediation*. 2015 Jun 3;17(6):575–82.
79. Duarte E d'Almeida, Reis IB, Martins MB de O, Trindade CP. Optimização da gestão de lama s: tratamento, armazenamento e destino final. Departamento de Química Agrícola e Ambiental. Instituto Superior de Agronomia. AgroGes – Sociedade de Estudos e Projectos, Lda.; 2005.
80. CONFAGRI CN das CA e do CA de P. Importância do Solo e suas Funções. [Internet]. [cited 2015 Aug 12]. Available from: <http://www.confagri.pt/Ambiente/AreasTematicas/Solo/TextoSintese/Antecedentes/Pages/default.aspx>
81. Instituto do Ambiente. Atlas do Ambiente - Carta de Acidez e Alcalinidade dos Solos [Internet]. 1979. Available from: [http://2.bp.blogspot.com/\\_iuQ3gpL8SU8/Se2DixBPkHI/AAAAAAAAACE/\\_mRJPGk4pb4/s1600-h/AA\\_PT\\_PHSolos02.jpg](http://2.bp.blogspot.com/_iuQ3gpL8SU8/Se2DixBPkHI/AAAAAAAAACE/_mRJPGk4pb4/s1600-h/AA_PT_PHSolos02.jpg)
82. DGE G de E e G. Energia em Portugal no ano 2013. 2015.
83. Caporgno MP, Trobajo R, Caiola N, Ibáñez C, Fabregat A, Bengoa C. Biogas production from sewage sludge and microalgae co-digestion under mesophilic and thermophilic conditions. *Renew Energy*. 2015 Mar;75:374–80.

84. Nartker S, Ammerman M, Aurandt J, Stogsdil M, Hayden O, Antle C. Increasing biogas production from sewage sludge anaerobic co-digestion process by adding crude glycerol from biodiesel industry. *Waste Manag.* 2014 Dec;34(12):2567–71.
85. Conselho das Comunidades Europeias. Diretiva 86/278/CEE de 12 de Junho. 1986.
86. Ministério do Ambiente. Decreto-lei n.º 446/1991 de 22 de Novembro. 1991.
87. Ministério do Ambiente. Decreto-lei nº. 118/2006 de 21 de Junho. 2006.
88. DGIES D-G das I e E da S. Recomendações Genéricas para a Gestão das Águas Residuais Hospitalares. 2005.
89. Kim S, Aga DS. Potential ecological and human health impacts of antibiotics and antibiotic-resistant bacteria from wastewater treatment plants. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 2007 Dec;10(8):559–73.
90. Huerta B, Rodriguez-Mozaz S, Nannou C, Nakis L, Ruhí A, Acuña V, et al. Determination of a broad spectrum of pharmaceuticals and endocrine disruptors in biofilm from a waste water treatment plant-impacted river. *Sci Total Environ.* 2015 Jun;9.
91. Baquero F, Martínez J-L, Cantón R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr Opin Biotechnol.* 2008 Jun;19(3):260–5.
92. Yi T, Kim TG, Cho K-S. Fate and behavior of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing genes in municipal sewage treatment plants. *J Environ Sci Health Part A.* 2015 Sep 19;50(11):1160–8.
93. Bouki C, Venieri D, Diamadopoulos E. Detection and fate of antibiotic resistant bacteria in wastewater treatment plants: A review. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2013 May;91:1–9.
94. Evans SE, Davies P, Lubben A, Kasprzyk-Hordern B. Determination of chiral pharmaceuticals and illicit drugs in wastewater and sludge using microwave assisted extraction, solid-phase extraction and chiral liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta.* 2015 Jul;882:112–26.



95. Roca I, Akova M, Baquero F, Carlet J, Cavalieri M, Coenen S, et al. The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. *New Microbes New Infect.* 2015 Jul;6:22–9.
96. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Medical microbiology.* 7th Edition. Philadelphia: Elsevier/Saunders; 2013.
97. Abdullah A, Sabbir Alam SM, Sultana M, Hossain MA. BioCluster: Tool for Identification and Clustering of *Enterobacteriaceae* Based on Biochemical Data. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* 2015 Jul;8.
98. Stock I. [Infectious diseases caused by carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*--a particular challenge for antibacterial therapy]. *Med Monatsschrift Für Pharm.* 2014 May;37(5):162–72.
99. Ruppé É, Woerther P-L, Barbier F. Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli. *Ann Intensive Care.* 2015 Dec;5(1):61.
100. Mathers AJ, Peirano G, Pitout JDD. The Role of Epidemic Resistance Plasmids and International High-Risk Clones in the Spread of Multidrug-Resistant *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Rev.* 2015 Jul;28(3):565–91.
101. Nicolas-Chanoine M-H, Bertrand X, Madec J-Y. *Escherichia coli* ST131, an Intriguing Clonal Group. *Clin Microbiol Rev.* 2014 Jul 1;27(3):543–74.
102. Banerjee R, Johnson JR. A New Clone Sweeps Clean: the Enigmatic Emergence of *Escherichia coli* Sequence Type 131. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014 Sep 1;58(9):4997–5004.
103. Holt KE, Wertheim H, Zadoks RN, Baker S, Whitehouse CA, Dance D, et al. Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. *Proc Natl Acad Sci.* 2015 Jul 7;112(27):E3574–81.
104. Tzouveleki LS, Markogiannakis A, Psychogiou M, Tassios PT, Daikos GL. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and Other *Enterobacteriaceae*: an Evolving Crisis of Global Dimensions. *Clin Microbiol Rev.* 2012 Oct 1;25(4):682–707.
105. Broberg CA, Palacios M, Miller VL. *Klebsiella*: a long way to go towards understanding this enigmatic jet-setter. *F1000Prime Rep.* 2014 Aug 1;6.

106. Thakuria B, Lahon K. The Beta Lactam Antibiotics as an Empirical Therapy in a Developing Country: An Update on Their Current Status and Recommendations to Counter the Resistance against Them. *J Clin Diagn Res JCDR*. 2013 Jun;7(6):1207–14.
107. Lobritz MA, Belenky P, Porter CBM, Gutierrez A, Yang JH, Schwarz EG, et al. Antibiotic efficacy is linked to bacterial cellular respiration. *Proc Natl Acad Sci*. 2015 Jul 7;112(27):8173–80.
108. Mahal L, Romesberg F, Shah K, Shamu C, Strano MS, Thomas C, et al. Penicillin-Binding Protein Imaging Probes: Penicillin-Binding Protein Imaging Probes. In: *Current Protocols in Chemical Biology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2013. p. 239–50.
109. Sun S, Selmer M, Andersson DI. Resistance to  $\beta$ -Lactam Antibiotics Conferred by Point Mutations in Penicillin-Binding Proteins PBP3, PBP4 and PBP6 in *Salmonella enterica*. Cloeckaert A, editor. *PLoS ONE*. 2014 May 8;9(5):e97202.
110. Turner RD, Hurd AF, Cadby A, Hobbs JK, Foster SJ. Cell wall elongation mode in Gram-negative bacteria is determined by peptidoglycan architecture. *Nat Commun*. 2013 Feb 19;4:1496.
111. Nikolaidis I, Favini-Stabile S, Dessen A. Resistance to antibiotics targeted to the bacterial cell wall: The Bacterial Cell Wall as a Target for Antibiotics. *Protein Sci*. 2014 Mar;23(3):243–59.
112. Johnson JW, Fisher JF, Mobashery S. Bacterial cell-wall recycling: Bacterial cell-wall recycling. *Ann N Y Acad Sci*. 2013 Jan;1277(1):54–75.
113. Nicola G, Tomberg J, Pratt RF, Nicholas RA, Davies C. Crystal Structures of Covalent Complexes of  $\beta$ -Lactam Antibiotics with *Escherichia coli* Penicillin-Binding Protein 5: Toward an Understanding of Antibiotic Specificity. *Biochemistry (Mosc)*. 2010 Sep 21;49(37):8094–104.
114. Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJV. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol*. 2014 Dec 1;13(1):42–51.
115. Yin J, Mao Y, Ju L, Jin M, Sun Y, Jin S, et al. Distinct Roles of Major Peptidoglycan Recycling Enzymes in  $\beta$ -Lactamase Production in *Shewanella oneidensis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014 Nov 1;58(11):6536–43.

116. Zeng X, Lin J. Beta-lactamase induction and cell wall metabolism in Gram-negative bacteria. *Front Microbiol.* 2013 May 22;4.
117. Rehman MT, Faheem M, Khan AU. Insignificant  $\beta$ -lactamase activity of human serum albumin: no panic to nonmicrobial-based drug resistance. *Lett Appl Microbiol.* 2013 Jul;5.
118. Colomer-Lluch M, Jofre J, Muniesa M. Antibiotic Resistance Genes in the Bacteriophage DNA Fraction of Environmental Samples. Aziz R, editor. *PLoS ONE.* 2011 Mar 3;6(3):e17549.
119. Wang H, Huang H, Cao J, Chui D, Xiao S. Mass Spectral Profile for Rapid Differentiating Beta-Lactams from Their Ring-Opened Impurities. *BioMed Res Int.* 2015;2015:1–13.
120. Kamath A, Ojima I. Advances in the chemistry of B-lactam and its medicinal applications. *Tetrahedron.* 2012 Dec;68(52):10640–64.
121. Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*: here is the storm! *Trends Mol Med.* 2012 May;18(5):263–72.
122. World Health Organization. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2014.
123. Khan S, Sallum UW, Zheng X, Nau GJ, Hasan T. Rapid optical determination of  $\beta$ -lactamase and antibiotic activity. *BMC Microbiol.* 2014 Apr 4;14(1):84.
124. European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial consumption in Europe, 2011. Stockholm, Sweden: European Centre for Disease Prevention and Control; 2014.
125. Infectious Diseases Society of America (IDSA). Combating Antimicrobial Resistance: Policy Recommendations to Save Lives. *Clin Infect Dis.* 2011 May 1;52(Supplement 5):S397–428.
126. O'Brien TF, Stelling J. Integrated Multilevel Surveillance of the World's Infecting Microbes and Their Resistance to Antimicrobial Agents. *Clin Microbiol Rev.* 2011 Apr 1;24(2):281–95.

127. van Hoek AHAM, Mevius D, Guerra B, Mullany P, Roberts AP, Aarts HJM. Acquired Antibiotic Resistance Genes: An Overview. *Front Microbiol.* 2011 Sep 28;2.
128. Abdallah HM, Wintermans BB, Reuland EA, Koek A, Naiemi N al, Ammar AM, et al. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase- and Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* Isolated from Egyptian Patients with Suspected Blood Stream Infection. Galdiero M, editor. *PLOS ONE.* 2015 May 22;10(5):e0128120.
129. Zhang H, Zhou Y, Guo S, Chang W. Multidrug resistance found in extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* from rural water reservoirs in Guantao, China. *Front Microbiol.* 2015 Mar 31;6.
130. Forward KR. The value of multiple surveillance cultures for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Am J Infect Control.* 2010 Oct;38(8):596–9.
131. Pusch T, Kemp D, Trevino S, Button T, Sanchez P, Gander R, et al. Controlling outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* among infants caused by an endemic strain in adult inpatients. *Am J Infect Control.* 2013 Jan;41(1):51–6.
132. Bettiol E, Harbarth S. Development of new antibiotics: taking off finally? *Swiss Med Wkly.* 2015 Jul 31;145:9.
133. Magiorakos A-P, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* 2012 Mar;18(3):268–81.
134. Tor Y, Fair R. Antibiotics and Bacterial Resistance in the 21st Century. *Perspect Med Chem.* 2014 Aug;25.
135. Pommerville JC. Fundamentals of microbiology. Body systems. Body systems 3rd edition. Burlington, MA: Jones & Bartlett Learning; 2014.
136. Hsu J-T, Chen C-Y, Young C-W, Chao W-L, Li M-H, Liu Y-H, et al. Prevalence of sulfonamide-resistant bacteria, resistance genes and integron-associated horizontal gene transfer in natural water bodies and soils adjacent to a swine feedlot in northern Taiwan. *J Hazard Mater.* 2014 Jul;277:34–43.
137. Cantón R, Ruiz-Garbajosa P. Co-resistance: an opportunity for the bacteria and resistance genes. *Curr Opin Pharmacol.* 2011 Oct;11(5):477–85.

138. Marks LR, Reddinger RM, Hakansson AP. High levels of genetic recombination during nasopharyngeal carriage and biofilm formation in *Streptococcus pneumoniae*. *mBio*. 2012 Sep 25;3(5):13.
139. Freese PD, Korolev KS, Jiménez JI, Chen IA. Genetic Drift Suppresses Bacterial Conjugation in Spatially Structured Populations. *Biophys J*. 2014 Feb;106(4):944–54.
140. Volkova VV, Lu Z, Besser T, Grohn YT. Modeling the Infection Dynamics of Bacteriophages in Enteric *Escherichia coli*: Estimating the Contribution of Transduction to Antimicrobial Gene Spread. *Appl Environ Microbiol*. 2014 Jul 15;80(14):4350–62.
141. Varga M, Kuntová L, Pantůček R, Mašlaňová I, Růžičková V, Doškař J. Efficient transfer of antibiotic resistance plasmids by transduction within methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 clone. *FEMS Microbiol Lett*. 2012 Jul;332(2):146–52.
142. Olivares J, Bernardini A, Garcia-Leon G, Corona F, B. Sanchez M, Martinez JL. The intrinsic resistome of bacterial pathogens. *Front Microbiol*. 2013 Apr 30;4.
143. Mulvey MR, Simor AE. Antimicrobial resistance in hospitals: How concerned should we be? *Can Med Assoc J*. 2009 Feb 17;180(4):408–15.
144. Drawz SM, Bonomo RA. Three Decades of  $\beta$ -Lactamase Inhibitors. *Clin Microbiol Rev*. 2010 Jan 1;23(1):160–201.
145. Worthington RJ, Melander C. Overcoming Resistance to  $\beta$ -Lactam Antibiotics. *J Org Chem*. 2013 May 3;78(9):4207–13.
146. Bush K. Bench-to-bedside review: The role of  $\beta$ -lactamases in antibiotic-resistant Gram-negative infections. *Crit Care*. 2010 Jun 29;14(3):224.
147. Bush K, Jacoby GA. Updated Functional Classification of  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Mar 1;54(3):969–76.
148. Bush K. The ABCD's of  $\beta$ -lactamase nomenclature. *J Infect Chemother*. 2013 Jul 5;19(4):549–59.

149. Olsen I. New promising  $\beta$ -lactamase inhibitors for clinical use. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015 Jul;34(7):1303–8.
150. Fisher JF, Meroueh SO, Mobashery S. Bacterial Resistance to  $\beta$ -Lactam Antibiotics: Compelling Opportunism, Compelling Opportunity. *Chem Rev*. 2005 Feb;105(2):395–424.
151. Shaikh S, Fatima J, Shakil S, Rizvi SMD, Kamal MA. Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. *Saudi J Biol Sci*. 2015 Jan;22(1):90–101.
152. Chong Y, Ito Y, Kamimura T. Genetic evolution and clinical impact in extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Genet Evol*. 2011 Oct;11(7):1499–504.
153. Bradford PA. Extended-Spectrum -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clin Microbiol Rev*. 2001 Oct 1;14(4):933–51.
154. Morris D, O'Hare C, Glennon M, Maher M, Corbett-Feeney G, Cormican M. Extended-Spectrum -Lactamases in Ireland, Including a Novel Enzyme, TEM-102. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003 Aug 1;47(8):2572–8.
155. Cantón R, González-Alba JM, Galán JC. CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. *Front Microbiol*. 2012 Feb 26;3.
156. Lahlaoui H, Ben Haj Khalifa A, Ben Moussa M. Epidemiology of *Enterobacteriaceae* producing CTX-M type extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL). *Médecine Mal Infect*. 2014 Sep;44(9):400–4.
157. Zhang H, Zhou Y, Guo S, Chang W. High prevalence and risk factors of fecal carriage of CTX-M type extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* from healthy rural residents of Taian, China. *Front Microbiol*. 2015 Mar 27;6.
158. Oviaño M, Fernández B, Fernández A, Barba MJ, Mouriño C, Bou G. Rapid detection of *enterobacteriaceae* producing extended spectrum beta-lactamases directly from positive blood cultures by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect*. 2014 Nov;20(11):1146–57.

159. Drieux L, Brossier F, Sougakoff W, Jarlier V. Phenotypic detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase production in *Enterobacteriaceae*: review and bench guide. *Clin Microbiol Infect*. 2008 Jan;14:90–103.
160. CLSI C and LSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. (m100-s24). Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014.
161. EUCAST TEC on AST. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. 2014.
162. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Rapid Detection of Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* from Urine Samples by Use of the ESBL NDP Test. *J Clin Microbiol*. 2014 Oct 1;52(10):3701–6.
163. Deccache Y, Irengue LM, Ambroise J, Savov E, Marinescu D, Chirimwami RB, et al. A qPCR and multiplex pyrosequencing assay combined with automated data processing for rapid and unambiguous detection of ESBL-producers *Enterobacteriaceae*. *AMB Express*. 2015 Dec;5(1).
164. Poulou A, Grivakou E, Vrioni G, Koumaki V, Pittaras T, Pournaras S, et al. Modified CLSI Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase (ESBL) Confirmatory Test for Phenotypic Detection of ESBLs among *Enterobacteriaceae* Producing Various  $\beta$ -Lactamases. *J Clin Microbiol*. 2014 May 1;52(5):1483–9.
165. Dallenne C, Da Costa A, Decré D, Favier C, Arlet G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother*. 2010 Mar;65(3):490–5.
166. Woodford N, Fagan EJ, Ellington MJ. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum (beta)-lactamases. *J Antimicrob Chemother*. 2006 Jan;57(1):154–5.
167. Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011 May;70(1):119–23.
168. Munir M, Xagorarakis I. Levels of antibiotic resistance genes in manure, biosolids, and fertilized soil. *J Environ Qual*. 2011 Feb;40(1):248–55.

169. Bean CL, Hansen JJ, Margolin AB, Balkin H, Batzer G, Widmer G. Class B alkaline stabilization to achieve pathogen inactivation. *Int J Environ Res Public Health*. 2007 Mar;4(1):53–60.
170. Pérez-Moreno MO, Katargina O, Pérez-Moreno M, Carulla M, Rubio C, Jardí AM, et al. Mechanisms of reduced susceptibility to amoxicillin-clavulanic acid in *Escherichia coli* strains from the health region of Tortosa (Catalonia, Spain). *Clin Microbiol Infect*. 2004 Mar;10(3):234–41.
171. Poirel L, Guibert M, Bellais S, Naas T, Nordmann P. Integron- and carbenicillinase-mediated reduced susceptibility to amoxicillin-clavulanic acid in isolates of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype typhimurium DT104 from French patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999 May;43(5):1098–104.
172. Zarfel G, Galler H, Feierl G, Haas D, Kittinger C, Leitner E, et al. Comparison of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase (ESBL) carrying *Escherichia coli* from sewage sludge and human urinary tract infection. *Environ Pollut*. 2013 Feb;173:192–9.
173. Youenou B, Favre-Bonté S, Bodilis J, Brothier E, Dubost A, Muller D, et al. Comparative genomics of environmental and clinical *Stenotrophomonas maltophilia* strains with different antibiotic resistance profiles. *Genome Biol Evol*. 2015 Aug 14;
174. Reinthaler FF, Feierl G, Galler H, Haas D, Leitner E, Mascher F, et al. ESBL-producing *E. coli* in Austrian sewage sludge. *Water Res*. 2010 Mar;44(6):1981–5.
175. Gündoğdu A, Jennison AV, Smith HV, Stratton H, Katouli M. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Escherichia coli* in hospital wastewaters and sewage treatment plants in Queensland, Australia. *Can J Microbiol*. 2013 Nov;59(11):737–45.
176. Yamaichi Y, Chao MC, Sasabe J, Clark L, Davis BM, Yamamoto N, et al. High-resolution genetic analysis of the requirements for horizontal transmission of the ESBL plasmid from *Escherichia coli* O104:H4. *Nucleic Acids Res*. 2015 Jan 9;43(1):348–60.
177. Poirel L, Barbosa-Vasconcelos A, Simões RR, Da Costa PM, Liu W, Nordmann P. Environmental KPC-producing *Escherichia coli* isolates in Portugal. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Mar;56(3):1662–3.



178. Walsh TR, Weeks J, Livermore DM, Toleman MA. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *Lancet Infect Dis*. 2011 May;11(5):355–62.
179. Woodford N, Wareham DW, Guerra B, Teale C. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and non-*Enterobacteriaceae* from animals and the environment: an emerging public health risk of our own making? *J Antimicrob Chemother*. 2014 Feb 1;69(2):287–91.
180. Galler H, Feierl G, Petternel C, Reinthaler FF, Haas D, Grisold AJ, et al. KPC-2 and OXA-48 carbapenemase-harboring *Enterobacteriaceae* detected in an Austrian wastewater treatment plant. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2014 Feb;20(2).
181. Wang LK, Shamma NK, Hung Y-T. *Biosolids Treatment Processes*. Totowa, NJ: Humana Press; 2007.



**ANEXOS**

---

Anexos

Anexo 1 - Resultados do teste de suscetibilidade aos antibióticos, pelo método de difusão em agar, bem como, resultados do teste de adição de ácido clavulânico aos oximino-β-lactâmicos

		Suscetibilidade aos antibióticos β-lactâmicos									Identificação	
Isolado	Origem	(halo em mm) *										
		AML 10 µg	AUG 30 µg	CTX 30 µg	CAZ 30 µg	FEP 30 µg	ATM 30 µg	FOX 30 µg	IMI 10 µg	ETP 10 µg		
CLSI	3CTXA	ETAR do Freixo	6	6	15	11	28 (lsy)	23	6	27	22	KESC***
EUCAST			6	6	15	11	28 (lsy)	23	6	27	22	
CLSI	3CTXB	ETAR do Freixo	6	6	15	12	28 (lsy)	28	6	26	23	KESC***
EUCAST			6	6	15	12	28 (lsy)	28	6	26	23	
CLSI	3CTXC	ETAR do Freixo	6	6	23	21	26	29	7	30	30	KESC
EUCAST			6	6	23	21	26	29	7	30	30	
CLSI	3CTXD	ETAR do Freixo	6	10	15	6	26	7	6	28	11	KESC
EUCAST			6	10	15	6	26	7	6	28	11	
CLSI	8CTXA	ETAR de Sobreiras	6	6	16	14	>30	24	10	28	28	E. coli
EUCAST			6	6	16	14	>30	24	10	28	28	

Anexos

CLSI	8CTXB	ETAR de Sobreiras	6	6	13	14	>30	17	6	24	18	<i>Enterobacter cloace</i>
EUCAST			6	6	13	14	>30	17	6	24	18	
CLSI	8CTXC	ETAR de Sobreiras	6	15	7 (sy)	12 (sy)	18 (sy)	11	22	>30	28	<i>K. pneumoniae</i>
EUCAST			6	15	7 (sy)	12 (sy)	18 (sy)	11	22	>30	28	
CLSI	8MEROA	ETAR de Sobreiras	6	6	>30	20	28	20	6	12	6	KESC
EUCAST			6	6	>30	20	28	20	6	12	6	
CLSI	8MEROB	ETAR de Sobreiras	6	6	23	18	>30	>30	6	17	8	KESC
EUCAST			6	6	23	18	>30	>30	6	17	8	
CLSI	8MERO C	ETAR de Sobreiras	6	6	25	14	30	>30	6	14	8	KESC
EUCAST			6	6	25	14	30	>30	6	14	8	
CLSI	8MEROD	ETAR de Sobreiras	6	6	24	16	>30	>30	6	18	14	KESC
EUCAST			6	6	24	16	>30	>30	6	18	14	
CLSI	8MEROE	ETAR de Sobreiras	6	6	30	23	>30	29	6	21	6	KESC
EUCAST			6	6	30	23	>30	29	6	21	6	
CLSI	8MERO F	ETAR de Sobreiras	6	9	30	13	>30	29	6	15	6	KESC
EUCAST			6	9	30	13	>30	29	6	15	6	

Anexos

CLSI	8MEROG	ETAR de Sobreiras	6	6	28	22	>30	>30	6	21	21	KESC
EUCAST			6	6	28	22	>30	>30	6	21	21	
CLSI	8MEROH	ETAR de Sobreiras	6	6	24	17	>30	>30	6	13	8	KESC
EUCAST			6	6	24	17	>30	>30	6	13	8	
CLSI	8MEROI	ETAR de Sobreiras	6	6	6	6	11	6	11	24	30	KESC
EUCAST			6	6	6	6	11	6	11	24	30	
CLSI	9CTXA	ETAR da Madalena	6	20	19 (sy)	14	24	8	28	26	30	KESC***
EUCAST			6	20	19 (sy)	14	24	8	28	26	30	
CLSI	9CTXB	ETAR da Madalena	6	18	19	>30	26	>30	6	>30	29	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
EUCAST			6	18	19	>30	26	>30	6	>30	29	
CLSI	9CTXC	ETAR da Madalena	6	22	12	14	17	10	28	30	30	KESC
EUCAST			6	22	12	14	17	10	28	30	30	
CLSI	9CTXD	ETAR da Madalena	6	16	14 (sy)	20	20	16 (sy)	25	30	30	<i>E. coli**</i>
EUCAST			6	16	14 (sy)	20	20	16 (sy)	25	30	30	
CLSI	9MEROA	ETAR da Madalena	6	6	27	23	28	22	13	13	6	KESC
EUCAST			6	6	27	23	28	22	13	13	6	

Anexos

CLSI	9MEROB	ETAR da Madalena	6	6	6	6	20	12	6	25	16	KESC
EUCAST			6	6	6	6	20	12	6	25	16	
CLSI	9MERO C	ETAR da Madalena	6	6	26	22	28	>30	24	15	6	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
EUCAST			6	6	26	22	28	>30	24	15	6	
CLSI	9MERO D	ETAR da Madalena	6	6	18	21	23	30	8	14	6	<i>E. coli</i>
EUCAST			6	6	18	21	23	30	8	14	6	
CLSI	9MERO E	ETAR da Madalena	6	28	30	30	>30	>30	12	26	6	KESC
EUCAST			6	28	30	30	>30	>30	12	26	6	
CLSI	9MERO F	ETAR da Madalena	6	6	22	12	27	26	6	18	6	KESC
EUCAST			6	6	22	12	27	26	6	18	6	
CLSI	13CTXA	ETAR de Serzedelo	6	18	9 (sy)	18	21	15	26	28	28	<i>E. coli**</i>
EUCAST			6	18	9 (sy)	18	21	15	26	28	28	
CLSI	13MERO A	ETAR de Serzedelo	6	6	23	11	>30	28	6	18	9	KESC
EUCAST			6	6	23	11	>30	28	6	18	9	
CLSI	13MERO B	ETAR de Serzedelo	6	6	23	11	>30	28	6	18	9	KESC
EUCAST			6	6	23	11	>30	28	6	18	9	

Anexos

CLSI	13MEROA	ETAR de Serzedelo	6	6	8	11	28	14	6	10	6	KESC
EUCAST			6	6	8	11	28	14	6	10	6	
CLSI	13MEROD	ETAR de Serzedelo	6	6	8	11	>30	14	6	10	6	KESC
EUCAST			6	6	8	11	>30	14	6	10	6	
CLSI	14CTXA	ETAR de Lordelo	6	11	6 (sy)	11 (sy)	18 (sy)	9 (sy)	28	26	>30	<i>K. pneumoniae</i>
EUCAST			6	11	6 (sy)	11 (sy)	18 (sy)	9 (sy)	28	26	>30	
CLSI	14CTXB	ETAR de Lordelo	6	6	19	17	>30	27	9	28	27	KESC
EUCAST			6	6	19	17	>30	27	9	28	27	
CLSI	14MEROA	ETAR de Lordelo	6	9	9	>30	>30	22	6	>30	6	<i>Pseudomonas spp.</i>
EUCAST			6	9	9	>30	>30	22	6	>30	6	
CLSI	15CTXA	ETAR de Agra	6	15	14	24 (sy)	25	18	12	30	20	<i>E. coli***</i>
EUCAST			6	15	14	24 (sy)	25	18	12	30	20	
CLSI	15CTXB	ETAR de Agra	6	6	17	15	>30	18	6	25	25	<i>E. coli</i>
EUCAST			6	6	17	15	>30	18	6	25	25	
CLSI	15MEROA	ETAR de Agra	6	6	12	14	28	23	6	19	17	<i>E. coli</i>
EUCAST			6	6	12	14	28	23	6	19	17	

Anexos

CLSI	15MEROB	ETAR de Agra	6	6	6	15	11	6	6	6	6	<i>Pseudomonas</i> spp.
EUCAST			6	6	6	15	11	6	6	6	6	
CLSI	16CTXA	ETAR da Rabada	6	16	14 (sy)	22	>30	20	28	>30	30	<i>K. pneumoniae</i> **
EUCAST			6	16	14 (sy)	22	>30	20	28	>30	30	
CLSI	16CTXB	ETAR da Rabada	6	20	19 (sy)	28	>30	28	>30	>30	>30	<i>E. coli</i> **
EUCAST			6	20	19 (sy)	28	>30	28	>30	>30	>30	
CLSI	16MEROA	ETAR da Rabada	8	20	15	30	30	30	14	30	30	<i>Stenotrophomonas</i> <i>maltophilia</i>
EUCAST			8	20	15	30	30	30	14	30	30	
CLSI	16MEROB	ETAR da Rabada	6	6	6	6	13	6	6	6	6	<i>Stenotrophomonas</i> <i>maltophilia</i>
EUCAST			6	6	6	6	13	6	6	6	6	
CLSI	17CTXA	ETAR Ponte da Ribeira	14	6	13	20	22	15	6	24	17	<i>Stenotrophomonas</i> <i>maltophilia</i>
EUCAST			14	6	13	20	22	15	6	24	17	
CLSI	17CTXB	ETAR Ponte da Ribeira	6	6	16	14	30	20	10	21	22	<i>Stenotrophomonas</i> <i>maltophilia</i>
EUCAST			6	6	16	14	30	20	10	21	22	
CLSI	17CTXC	ETAR Ponte da Ribeira	6	6	13	11	30	17	6	23	27	KESC
EUCAST			6	6	13	11	30	17	6	23	27	



Anexos

CLSI	17MEROA	ETAR Ponte da Ribeira	17	10	17	22	26	17	10	20	19	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
EUCAST			17	10	17	22	26	17	10	20	19	
CLSI	17MEROB	ETAR Ponte da Ribeira	14	6	15	23	21	16	10	28	18	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
EUCAST			14	6	15	23	21	16	10	28	18	
CLSI	17MERO C	ETAR Ponte da Ribeira	11	6	12	20	20	16	6	23	14	KESC
EUCAST			11	6	12	20	20	16	6	23	14	
CLSI	17MERO D	ETAR Ponte da Ribeira	22	6	16	23	27	17	10	24	16	KESC
EUCAST			22	6	16	23	27	17	10	24	16	
CLSI	18CTXA	ETAR de Febros	6	6	6 (sy)	20	23	15	25	30	26	<i>E. coli**</i>
EUCAST			6	6	6 (sy)	20	23	15	25	30	26	
CLSI	18CTXB	ETAR de Febros	6	6	6	19	20	17	26	26	28	<i>E. coli</i>
EUCAST			6	6	6	19	20	17	26	26	28	
CLSI	18CTXC	ETAR de Febros	6	6	22 (sy)	25	28	24	30	35	30	<i>E. coli**</i>
EUCAST			6	6	22 (sy)	25	28	24	30	35	30	
CLSI	18CTXD	ETAR de Febros	6	6	15	20	20	19	24	28	26	<i>E. coli</i>
EUCAST			6	6	15	20	20	19	24	28	26	

Anexos

CLSI	18MEROA	ETAR de Febros	14	6	12	16	18	12	11	19	14	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
EUCAST			14	6	12	16	18	12	11	19	14	
CLSI	18MEROB	ETAR de Febros	14	6	12	21	25	15	6	21	15	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
EUCAST			14	6	12	21	25	15	6	21	15	

**Legenda:** \* antibióticos β-lactâmicos: AUG - amoxicilina com ácido clavulânico, AML - ampicilina, CTX - cefotaxima, CAZ - ceftazidima, FEP - cefepime, ATM - aztreonamo, FOX - cefoxitina, IMP - imipenemo, ETP – ertapenemo. sy – sinergismo entre o oximino-β-lactâmico e amoxicilina com ácido clavulânico. Isy – baixo sinergismo entre o oximino-β-lactâmico e amoxicilina com ácido clavulânico. \*\* halo superior a 5 mm no teste de adição do ácido clavulânico. \*\*\* halo inferior a 5 mm no teste de adição do ácido clavulânico. Avaliação qualitativa da resistência aos antibióticos β-lactâmicos segundo diretrizes do CLSI e EUCAST (2014): **Isolado resistente**; **Isolado com sensibilidade intermédia**; **Isolado sensível**.