

Luís Miguel Forte de Faria Pinto da Silva

**Relatório de Estágio: Avaliação da qualidade  
microbiológica de águas da bacia hidrográfica do Rio  
Minho**



FACULDADE DE CIÊNCIAS  
UNIVERSIDADE DO PORTO

Mestrado em Biologia e gestão da qualidade da água

Departamento Biologia

2018

**Orientador**

Maria da Natividade Vieira

## **Agradecimentos**

Não seria correto iniciar este trabalho sem agradecer àqueles que contribuíram não só para a elaboração e decurso deste trabalho, mas também para a minha formação como ser humano.

À minha família, mãe, pai e irmão, um pequeno agradecimento por tudo pois estão e estiveram sempre do meu lado durante todas as adversidades e contribuíram para a pessoa que hoje sou, graças a eles estou onde estou.

À Teresa por ser uma constante de boa energia, pelos incentivos, toda a força e o carinho e até pela ajuda que conseguiu dar.

Aos responsáveis, técnicos e trabalhadores dos Laboratórios da ARHNorte por toda a ajuda e disponibilidade na realização deste relatório e pelo tempo perdido a transmitir-me os seus ensinamentos.

## RESUMO

A necessidade do ser humano em satisfazer diversas necessidades básicas e fundamentais revela a importância da água no desenvolvimento da sociedade e no seu bem-estar. A tendência da exigência pelo abastecimento de água e pela utilização dos seus serviços é a de aumentar, pelo que a qualidade se revela bastante importante na gestão destas necessidades. Desta forma, a Diretiva Quadro da Água (DQA) garante, além da melhor preservação do estado ecológico dos ecossistemas aquáticos, a gestão dos interesses da sociedade em relação à um maior consumo de água com qualidade. Em Portugal cabe à Agência Portuguesa do Ambiente, I.P, com base na Diretiva anterior e na Lei da Água, implementar medidas e fazer cumprir legislações que permitam manter a qualidade das massas de água.

O presente trabalho foca-se na experiência desenvolvida nos laboratórios da ARHNorte enquanto exhibe avaliação do estado da qualidade (através de análises microbiológicas) das massas de água da bacia hidrográfica do Rio Minho.

## Abstract

The human being's need to meet various basic and fundamental needs reveals the importance of water in the development of society and in its well-being. The demand for water supply and the use of its services tends to increase, so quality is very important in managing these needs. In this way, the Water Framework Directive (WFD) guarantees, in addition to the best preservation of the ecological status of aquatic ecosystems, the management of society's interests in relation to a higher consumption of quality water. In Portugal, it is the responsibility of the Portuguese Environment Agency, I.P, based on the previous Directive and the Water Law, to implement measures and enforce legislation to maintain the quality of the water bodies.

The present work focuses on the experience developed in ARHNorte laboratories while exhibiting an evaluation of the quality of the water bodies of the Rio Minho basin (through microbiological analyzes).

## ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	7
1.1. Diretiva Quadro da Água.....	9
1.2. Qualidade da Água.....	10
1.3. Conceito de Contaminação/Poluição da água.....	12
1.4. Microrganismos como poluentes.....	12
1.5. Clorofila <i>a</i> e Feopigmentos.....	15
2. OBJETIVOS.....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1. Recolha de amostras.....	17
3.2. Localização dos pontos de amostragem.....	19
3.3. Membrana Filtrante.....	20
3.4. Microplacas.....	22
3.5. Colilert <sup>®</sup> -18/Quanti-Tray <sup>®</sup> .....	23
3.6. Enterolert <sup>®</sup> /Quanti-Tray <sup>®</sup> .....	24
3.7. Clorofila <i>a</i> e feopigmentos.....	25
4. APRESENTAÇÃO DE RESULTADOS.....	28
4.1. Águas naturais doces superficiais.....	28
4.2. Águas naturais doces subterrâneas.....	30
4.3. Águas balneares de transição.....	31
4.4. Águas balneares interiores.....	32
5. CONCLUSÃO.....	34
6. BIBLIOGRAFIA.....	35
7. ANEXO I	

## ÍNDICE DE FIGURAS

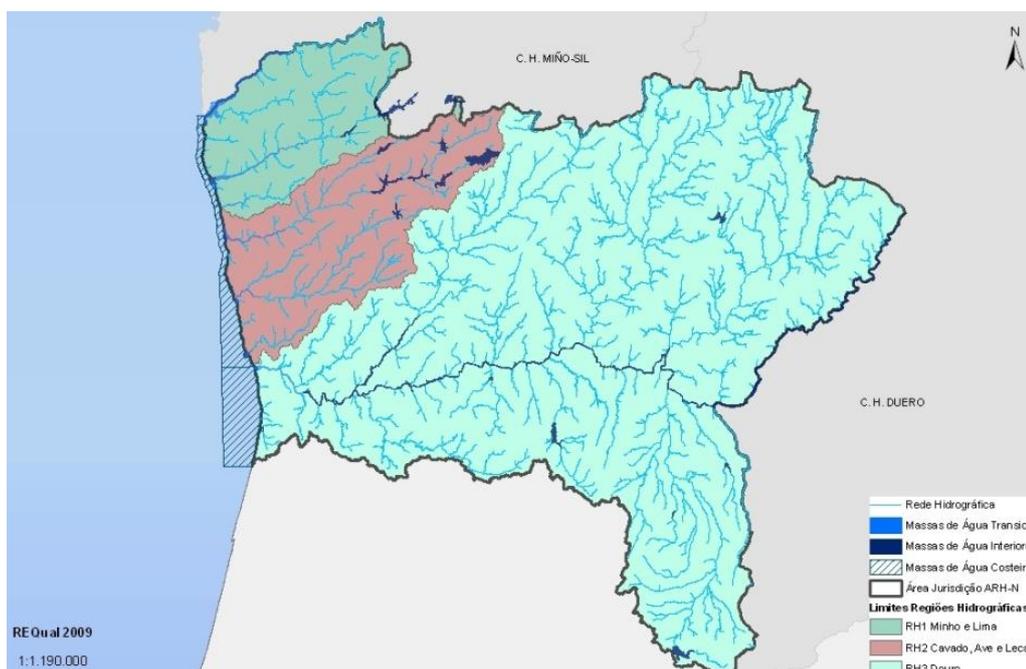
<b>Figura 1</b> - Representação de toda a região hidrográfica abrangida pela Administração da Região Hidrográfica do Norte. ....	7
<b>Figura 2</b> - Representação esquemática do procedimento das microplacas. ....	22
<b>Figura 3</b> - Indicador-nutriente que fluoresce quando metabolizado por enterococos. ....	24
<b>Figura 4</b> - Variação temporal dos níveis de enterococos em três diferentes águas naturais doces superficiais. ....	28
<b>Figura 5</b> - Variação temporal dos níveis de <i>Escherichia coli</i> em três diferentes águas naturais doces superficiais. ....	29

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Valores obtidos em cada amostragem para o parâmetro enterococos. ....	29
<b>Tabela 2</b> - Valores obtidos em cada amostragem para o parâmetro <i>Escherichia coli</i> . ...	29
<b>Tabela 3</b> - Valores obtidos em cada amostragem para o parâmetro clorofila <i>a</i> em águas naturais doces superficiais. ....	30
<b>Tabela 4</b> - Valores obtidos em cada amostragem para ambos os parâmetros enterococos e <i>Escherichia coli</i> em águas naturais doces subterrâneas. ....	30
<b>Tabela 5</b> - Valores obtidos para o parâmetro enterococos em águas balneares de transição. ....	31
<b>Tabela 6</b> - Valores obtidos para o parâmetro <i>Escherichia coli</i> em águas balneares de transição. ....	31
<b>Tabela 7</b> - Valores obtidos para o parâmetro enterococos em águas balneares interiores. ....	32
<b>Tabela 8</b> - Valores obtidos para o parâmetro <i>Escherichia coli</i> em águas balneares interiores. ....	32

## 1 - INTRODUÇÃO

A APA, I.P. é um instituto público integrado na administração indireta do Estado, dotado de autonomia administrativa e financeira e património próprio, de acordo com o Decreto-Lei n.º 56/2012, de 12 de março, que definiu a missão e as atribuições, conjugado com a Portaria 108/2013, de 15 de março, que aprova os estatutos desta entidade. Este organismo tem como missão propor, desenvolver e acompanhar a gestão integrada e participada das políticas de ambiente e de desenvolvimento sustentável, de forma articulada com outras políticas sectoriais e em colaboração com entidades públicas e privadas que concorram para o mesmo fim, tendo em vista um elevado nível de proteção e de valorização do ambiente e a prestação de serviços de elevada qualidade aos cidadãos. As Administrações de Região Hidrográfica são, por sua vez, serviços territorialmente desconcentrados da APA, I.P., que exercem as competências de proteção e valorização dos recursos hídricos, na sua área geográfica de jurisdição, com vista a garantir o cumprimento dos objetivos da Lei da Água. No caso da Administração da Região Hidrográfica do Norte, a sua circunscrição territorial abrange as Regiões Hidrográficas do Minho e Lima (RH1), do Cávado, Ave e Leça (RH2) e do Douro (RH3).



**Figura 1** – Representação de toda a região hidrográfica abrangida pela Administração da Região Hidrográfica do Norte.

O Despacho n.º 7714/2013, de 6 de junho, que publica a Deliberação n.º 7/2013, de 18 de abril, do Conselho Diretivo da APA, cria as Unidades Orgânicas Flexíveis, nomeadamente a da ARH do Norte. O Laboratório da ARH do Norte encontra-se incluído dentro da Rede Laboratorial da APA, a qual é composta pelo Laboratório de Referência do Ambiente (LRA) e por mais 3 laboratórios regionais (Centro, Alentejo e Algarve), inseridos nas respetivas regiões hidrográficas, funcionando o LRA como laboratório central e os laboratórios regionais, estruturas mais pequenas, como laboratórios de primeira linha de apoio regional. A Rede Laboratorial da APA contribui, no âmbito das suas competências, para o cumprimento das obrigações legais deste organismo, desenvolvendo trabalho analítico de suporte às Políticas de Ambiente em matéria de monitorização ambiental, fiscalização e resposta a emergências e reclamações. O Laboratório da ARH do Norte executa ensaios em amostras de águas naturais e residuais, com vista a dar cumprimento à legislação em vigor nesta matéria, nomeadamente o Decreto-Lei nº 236/98, de 1 de agosto, e a Diretiva Quadro da Água (DQA) e tem implementado um sistema de gestão, definido no Manual de Gestão e Manual de Procedimentos da Qualidade, de forma a dar cumprimento à norma NP EN ISO 17025:2005. Este sistema é apoiado por um Sistema de Gestão e Informação Laboratorial em rede. Até ao presente, os principais clientes externos têm sido sobretudo clientes institucionais: outras Divisões da ARH do Norte, no âmbito da monitorização da poluição gerada por indústrias; Tribunais, no âmbito de processos de contencioso; Polícia Marítima; GNR/SEPNA (Serviço de Proteção da Natureza e do Ambiente) e outros organismos estatais. No entanto, existe atualmente uma capacidade instalada que lhe permite, com qualidade garantida, abrir as portas a outros potenciais clientes.

O Laboratório da ARH do Norte executa ensaios em 2 áreas fundamentais: Química e Físico-Química, no Setor de Ensaio Físico-Químicos; Biologia, que inclui a Bacteriologia, no Setor de Ensaio Microbiológicos e Biológicos. O Laboratório de águas está acreditado pelo Sistema Português da Qualidade para os Ensaio de Microbiologia e Análises Físico-Químicas, em matrizes águas e efluentes líquidos. Tendo como atividade principal o citado anteriormente, o Laboratório da ARH do Norte realiza também outras ações que lhe são inerentes, nas seguintes áreas:

- a) Colheitas de amostras de águas;
- b) Desenvolvimento e implementação de novas técnicas analíticas;
- c) Participação em ações de formação (estágios, cursos, etc.) e em eventos de divulgação científica;
- d) Participação em ensaios interlaboratoriais.

Os ensaios interlaboratoriais são efetuados de forma a garantir a credibilidade dos resultados e a contínua validação dos mesmos. Funcionam como um sistema de controlo de qualidade interno e externo, nomeadamente mantendo um intercâmbio técnico-científico, com o Laboratório de Referência do Ambiente, da própria APA, I.P., e

participando em ensaios interlaboratoriais, nacionais e internacionais, em águas de consumo, águas residuais e superficiais naturais e água da chuva.

### **1.1 - Diretiva Quadro da Água (DQA)**

A Diretiva 2000/60/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 23 de Outubro de 2000 (Diretiva Quadro da Água), transposta para a ordem jurídica nacional através da Lei da Água, Lei n.º58/2005 de 29 de Dezembro (Lei da Água) e do Decreto-Lei n.º77/2006 de 30 de Março, constitui um marco de atuação comunitária no âmbito da política da água, permitindo colmatar as lacunas existentes na legislação comunitária anterior, baseada na definição da qualidade da água em função dos seus usos (água para uso humano, água para suporte da vida aquícola, água balnear e água de rega) e introduz o conceito de “estado ecológico”, que exprime a qualidade estrutural e funcional dos ecossistemas aquáticos (INAG, 2009) com base no “desvio ecológico” relativamente às condições de referência (INAG, 2006), condições sujeitas a pressões antropogénicas pouco significativas. As condições de referência correspondem a comunidades, atributos biológicos e/ou funções ecológicas presentes num grupo de locais com o mínimo de perturbação possível (Ferreira *et al.*, 2007). Quanto à classificação do “estado ecológico” é efetuada com recurso a indicadores de qualidade hidromorfológica, físico-química e biológica. Assim, o conceito antropogénico de água como recurso é abandonado em benefício de uma visão ecocêntrica, direcionada para a qualidade da água onde esta é considerada como o suporte dos ecossistemas. A Diretiva Quadro da Água constitui o principal instrumento da Política da União Europeia relativa à água. Esta estabelece um quadro de ação comunitária para a melhoria e proteção da qualidade das águas de superfície interiores, das águas de transição, das águas costeiras e das águas subterrâneas, garantindo que todos os ecossistemas que dependam da água tenham um funcionamento adequado e que todos os usos da água só possam ser aceites se não colocarem em causa o bom funcionamento dos ecossistemas. Segundo a DQA, é necessário uma monitorização e avaliação regular da qualidade da água de maneira que se facilite a criação de medidas para a preservação e recuperação de rios em mau estado.

A Diretiva Quadro da Água foi transposta para a ordem jurídica nacional pela Lei n.º 58/2005 de 29 de dezembro (Lei da Água - LA) e pelo Decreto-Lei nº 77/2006, de 30 de março. Ao nível nacional, os desenvolvimentos mais importantes para o planeamento e gestão dos recursos hídricos compreendem o Plano Nacional da Água (PNA) e os Planos de Bacia Hidrográfica (PBH). O Plano Nacional da Água é elaborado de acordo com o Decreto-Lei nº 45/1994 de 22 de fevereiro e é um documento que define orientações de âmbito nacional para a gestão integrada dos recursos hídricos, fundamentadas em diagnóstico atualizado da situação e na definição de objetivos a alcançar através de medidas e ações. Este plano tem como objetivos a definição de estratégias nacionais para a valorização e proteção dos recursos hídricos, no quadro de

ordenamento jurídico nacional e comunitário, bem como a articulação de estratégias de planeamento das bacias hidrográficas. A DQA também apresenta alguns objetivos ambientais a cumprir para as diferentes massas de água consideradas, nomeadamente para águas superficiais:

- a) Evitar a deterioração do estado das massas de água;
- b) Proteger, melhorar e recuperar todas as massas de água com o objetivo de alcançar o bom estado das águas – bom estado químico e o bom estado ecológico;
- c) Proteger e melhorar todas as massas de água fortemente modificadas e artificiais com o objetivo de alcançar o bom potencial ecológico e o bom estado químico;
- d) Reduzir gradualmente a poluição provocada por substâncias prioritárias e eliminar as emissões, as descargas e as perdas de substâncias perigosas prioritárias.

Para águas subterrâneas:

- a) Evitar ou limitar as descargas de poluentes nas massas de água e evitar a deterioração do estado de todas as massas de água;
- b) Manter e alcançar o bom estado das águas – bom estado químico e quantitativo garantindo o equilíbrio entre captações e recargas
- c) Inverter qualquer tendência significativa persistente para aumentar a concentração de poluentes.

## **1.2 - Qualidade da água**

A água é um recurso essencial à vida, indispensável para a humanidade, mas também para os outros organismos e para a manutenção das funções e da integridade dos ecossistemas (Mendes, 2010), desempenhando um papel vital e insubstituível em todo o equilíbrio ecológico. No que toca ao desenvolvimento sustentável dos países é um elemento indispensável, uma vez que a falta de água ou a falta de água com qualidade diminuem a qualidade de vida das populações e o seu desenvolvimento. O aumento da população humana leva a um aumento das necessidades de água. Este fator, aliado à intensificação da agricultura, do desenvolvimento da indústria e da urbanização, verificados principalmente na segunda metade do século XX, tem determinado mudanças significativas nos padrões de vida da sociedade e diminuído as reservas de um recurso natural à partida renovável. As mudanças traduzem-se num aumento generalizado da pressão dos recursos hídricos e na sua consequente degradação pelas atividades humanas, direta ou indiretamente, tornando-a imprópria para determinados fins, ou seja, podem diminuir a quantidade de água com qualidade para ser utilizada em algumas atividades. Sendo um recurso natural imprescindível à manutenção da vida na Terra e constituindo um fator essencial para a estruturação do desenvolvimento socioeconómico, torna-se fundamental que seja gerida de forma ponderada e equilibrada

Na União Europeia, a legislação regula a gestão das águas superficiais, designadamente as águas interiores, de transição e costeiras, e das águas subterrâneas, de forma a: a) evitar a continuação da degradação e proteger e melhorar o estado dos ecossistemas aquáticos e também dos ecossistemas terrestres e zonas húmidas diretamente dependentes dos ecossistemas aquáticos, no que respeita às suas necessidades de água; b) promover uma utilização sustentável de água, baseada numa proteção a longo prazo dos recursos hídricos disponíveis; c) obter uma proteção reforçada e um melhoramento do ambiente aquático, nomeadamente através de medidas específicas para a redução gradual e a cessação ou eliminação por fases das descargas, das emissões e perdas de substâncias prioritárias; d) assegurar a redução gradual da poluição das águas subterrâneas e evitar o agravamento da sua poluição; e) mitigar os efeitos das inundações e das secas; f) assegurar o fornecimento em quantidade suficiente de água de origem superficial e subterrânea de boa qualidade, conforme necessário para uma utilização sustentável, equilibrada e equitativa da água; g) proteger as águas marinhas, incluindo as territoriais; h) assegurar o cumprimento dos objetivos dos acordos internacionais pertinentes, incluindo os que se destinam à prevenção e eliminação da poluição no ambiente marinho (Lei nº58/2005).

O conceito de qualidade da água é relativo, já que depende do uso a que se destina ou do objetivo do seu utilizador. Assim, a qualidade da água pode ser definida, para fins específicos, como o conjunto de características físicas, químicas e biológicas adequadas à sua utilização para determinado uso. Para cada uso da água é, pois, necessário estabelecer as exigências relativas à sua qualidade, isto é, definir parâmetros de qualidade e estabelecer os seus valores-limite (Mendes, 2010). O Decreto-Lei 236/98, de 1 de Agosto define quatro tipos principais de utilização da água: águas para consumo humano, águas para suporte de vida aquícola, águas balneares e águas de rega.

As águas para consumo humano são águas doces que podem ter origem em águas superficiais, em águas subterrâneas ou em águas de abastecimento. As águas para suporte de vida aquícola são águas superficiais, doces ou salobras, continentais ou litorais, destinadas à produção de peixe (águas piscícolas) ou de bivalves (águas conquícolas). As águas balneares são águas doces lóticas e lênticas, comumente designadas de correntes e paradas, assim como a água do mar e as águas estuarinas, que se encontrem classificadas como águas balneares ou, não estando classificadas, onde o banho não esteja interdito e seja habitualmente praticado por um número considerável de banhistas (aproximadamente 100/dia, durante a época balnear). A água de rega é água superficial ou subterrânea ou água residual, que vise satisfazer ou complementar as necessidades hídricas das culturas agrícolas ou florestais (artigo 3º do Decreto-Lei 236/98).

Os limites paramétricos estabelecidos na legislação são principalmente desenvolvidos para a prevenção da ocorrência de surtos sanitários, fornecendo uma informação limitada sobre a proteção do ambiente e da saúde. Os limites paramétricos podem definir-se como:

- a) a concentração de uma substância ou organismo que não representa um perigo significativo para a saúde de um número significativo de utilizadores;
- b) as condições nas quais a exposição a essa substância ou organismo não são prováveis;
- c) uma combinação de ambos.

Assim, são normalmente impostos na legislação dois limites paramétricos, o valor máximo recomendável (VMR) e o valor máximo admissível (VMA). O VMR é o valor de norma de qualidade que não deverá ser ultrapassado (Decreto-Lei 236/98) e garante a manutenção da saúde do consumidor e a cobertura das suas necessidades alimentares. O VMA é o valor da norma de qualidade que, de preferência, deve ser respeitado ou não excedido (Decreto-Lei 236/98); ou seja, como nem sempre os valores obtidos são  $\leq$  VMR, toma-se em conta o VMA, na perspectiva de que nesse intervalo de valores (VMR-VMA) não se verificarão riscos significativos para a saúde dos consumidores.

### **1.3 - Conceito de poluição/contaminação da água**

A poluição da água pode ser definida como:

- a) a inadequação da sua aplicabilidade para algum objetivo considerado;
- b) qualquer modificação natural ou artificial que direta ou indiretamente modifique, altere ou destrua o equilíbrio dos ecossistemas e dos recursos naturais de tal modo que traga perigo para a saúde pública, diminua a sua adequabilidade ou eficiência e o bem-estar do Homem e das suas comunidades;
- c) a alteração da composição ou do estado da água de tal forma que se torne menos adequada para todas ou algumas das funções e fins a que pode ser adequada no seu estado natural.

O conceito de contaminação é definido como a introdução ou descarga na água de organismos patogénicos ou de substâncias tóxicas que a tornem imprópria para consumo público e/ou usos domésticos, ou seja, a contaminação pode ser considerada um aspeto específico da poluição.

### **1.4 - Microrganismos como poluentes**

Os poluentes podem ser inorgânicos, orgânicos e biológicos, incluindo-se os microrganismos neste último grupo. Os perigos mais significativos da poluição biológica por microrganismos devem-se à contaminação das águas por resíduos fecais ou

urinários, provenientes do metabolismo dos animais homeotérmicos. Embora muitos microrganismos associados a este tipo de resíduos sejam inofensivos para pessoas saudáveis, alguns são agentes patogénicos. Quando existe contaminação da água por fezes, as bactérias de origem fecal são uma causa potencial de várias doenças que podem ocorrer sob a forma epidémica ou sob a forma endémica.

O número de microrganismos presentes nos materiais fecais é muito elevado, cerca de  $10^9$  (i.e., 10 000 000 000) de cada um dos grupos pesquisados por cada grama de material fecal, dos quais apenas alguns são patogénicos (Mendes, 2010). Ou seja, juntamente com os microrganismos patogénicos são libertados microrganismos não patogénicos ou de patogenia limitada, pelo que a presença ou ausência desses microrganismos numa amostra indica se a água em questão foi ou não contaminada por fezes, isto é, se apresenta o perigo de conter microrganismos fecais patogénicos. Os microrganismos não patogénicos ou de patogenia limitada são indicadores de contaminação fecal e são utilizados para monitorizar as águas para a contaminação por fezes. A escolha dos indicadores de qualidade microbiológica da água obedece a vários critérios (Mendes, 2010):

- a) A concentração do microrganismo indicador na água contaminada deve ter uma relação direta com o grau de contaminação;
- b) O microrganismo indicador deve ser suficientemente conhecido, de forma a permitir a atribuição de valores-limite;
- c) A análise do microrganismo indicador deve ter uma metodologia padronizada e específica para o microrganismo em causa (i.e., a presença de outros microrganismos não deve gerar resultados positivos) e suficientemente sensível para detetar níveis baixos do indicador;
- d) A análise do microrganismo indicador deve ser rápida, inequívoca e de baixo custo;
- e) O microrganismo indicador deve estar presente sempre que microrganismos fecais patogénicos estejam também presentes, e em quantidade superior aos patogénicos;
- f) O microrganismo indicador deve ser mais resistente aos agentes desinfetantes que os microrganismos patogénicos (i.e., deve sobreviver mais tempo);
- g) O microrganismo indicador não deve reproduzir-se na água (para não causar sobre estimativas da poluição);
- h) O microrganismo indicador deve distribuir-se de forma aleatória na massa de água;
- i) O microrganismo indicador deve ser propício para a análise de todos os tipos de água: torneira, rios, subterrânea, barragens, estuários, oceanos, águas residuais... (i.e., deve ser capaz de sobreviver nos vários tipos de água);
- j) O microrganismo indicador deve ser inofensivo para o ser humano.

Os indicadores clássicos de contaminação fecal são o grupo dos coliformes fecais e não fecais, o grupo dos enterococos fecais, *Clostridium perfringens*; e o número de UFC a 22°C e a 37°C. O grupo dos coliformes é constituído por bactérias da família Enterobacteriaceae, habitantes do aparelho intestinal do homem e de outros animais homeotérmicos. São bactérias Gram-negativas, em forma de bacilo e anaeróbias facultativas. Algumas são oxidase-positivas e crescem em condições aeróbias em meio de cultura seletivo contendo sais biliares; outras são capazes de fermentar lactose a 37°C com libertação de gás e de ácido e outras são capazes de fazer a fermentação a 44.5°C. A fermentação da lactose a 44.5°C permite distinguir os coliformes não fecais (37°C) dos coliformes fecais (44.5°C). Nos coliformes fecais inclui-se, por exemplo, a bactéria *Escherichia coli* (Mendes, 2010). Os enterococos fecais são caracterizados pela capacidade de crescerem entre 10 e 45°C, a pH 9.6, em meio de cultura contendo 6.5% de cloreto de sódio (NaCl), na presença de 40% de sais biliares e em concentrações de azida inibidoras do crescimento dos coliformes. São bactérias Gram-positivas que reduzem azul-demetileno em 0.1% de leite e conseguem sobreviver a 60°C durante 30 minutos. Nos enterococos fecais inclui-se, por exemplo, *Enterococcus faecalis* (Mendes, 2010).

O número de UFC a 22°C e a 37°C não é um indicador específico de poluição fecal, mas sim de enriquecimento por matéria orgânica facilmente degradável. As contagens de colónias são úteis para a avaliação do estado da água e dos processos de tratamento utilizados, por exemplo, nas ETARs. O principal interesse da contagem de colónias reside na possibilidade de detetar as alterações em relação ao histórico, baseando-se num controlo frequente e a longo prazo. A ocorrência de um aumento repentino do número de UFC pode significar que existe um foco de poluição.

Devido ao aprofundamento dos estudos microbiológicos, atualmente utilizam-se, em substituição ou em adição aos indicadores clássicos, outros microrganismos, chamados novos indicadores. A bactéria *Escherichia coli* substituiu, na legislação atual, os coliformes fecais como indicadores de contaminação fecal. Esta bactéria apresenta uma grande diversidade de adaptações ao meio, podendo causar várias doenças que originam diarreias (Mendes, 2010).

### **1.5 - Clorofila *a* e feopigmentos**

A clorofila *a* é o principal pigmento fotossintético de todos os organismos que realizam fotossíntese com libertação de oxigénio, pelo que é amplamente utilizada para estimar a biomassa fitoplanctónica e a atividade fotossintética nas águas doces superficiais. Os principais produtos de degradação da clorofila são os feopigmentos (feofitina e feoforbida), os quais absorvem, com menor capacidade, luz no mesmo comprimento de onda que a clorofila. A relação entre clorofila *a*/feopigmentos é considerada um indicador do estado fisiológico das algas, pelo que estes fatores constituem um indicador do estado trófico de águas superficiais.

## 2 – OBJETIVOS

No posto de Estagiário na área das análises microbiológicas, estão no encargo o desempenho de funções na Unidade Laboratorial da Administração da Região Hidrográfica do Norte (ARH do Norte) da Agência Portuguesa do Ambiente, I.P. (APA, I.P.) e a realização das seguintes tarefas: realização por rotina de análises microbiológicas em águas naturais e residuais; quantificação de clorofila *a* e feopigmentos em amostras de águas naturais; preparação de meios de cultura; higienização e desinfecção de material, equipamentos e bancadas; implementação do sistema de controlo de qualidade interno; registo informático dos resultados de ensaios microbiológicos. A realização das funções apresentadas imbuíu um espírito maior de responsabilidade enquanto foi possível acrescer outras qualidades como a capacidade para concretizar com eficácia e eficiência os objetivos do serviço e as tarefas solicitadas, gerir adequadamente o tempo de trabalho, tendo preocupação com o cumprimento dos prazos estipulados para as diferentes atividades, adaptação e melhoria contínua (ajuste à mudança e à atualização técnica) e iniciativa e autonomia (atuar de modo independente e proactivo no dia a dia profissional). A grande variabilidade de tarefas e funções realizadas representaram uma oportunidade única para evoluir profissionalmente e adquirir, em simultâneo, novas competências. A oportunidade de analisar os resultados dos ensaios de pesquisa microbiológica e de atribuir categorias de qualidade consoante os valores, e ao mesmo tempo atribuir uma causa provável a casos de contaminação ajudou a pôr em prática o espírito crítico e científico.

### **3 - MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 - Recolha de amostras**

A recolha das águas superficiais é efetuada de acordo com a Norma ISO 5667-3:2003 Water quality – Sampling – Part 3: Guidance on the preservation and handling of water samples. Para recolha e segurança das amostras são utilizados os seguintes elementos:

- a) Recipientes lavados e descontaminados em função do parâmetro a analisar (frascos de vidro, de plástico e descartáveis, garrafas ou sacos, conforme os casos);
- b) Malas isotérmicas com acumuladores congelados para manter as amostras refrigeradas até entrega no laboratório;
- c) Balde de inox, caso seja necessário proceder à recolha indireta de amostras.

Muitas das recolhas de amostras de água são efetuadas pelo Serviço de Proteção da Natureza e do Ambiente da Guarda Nacional Republicana (SEPNA), entidade com Protocolo de Colaboração (desde Dezembro de 2009) com a APA. Para o efeito, utilizam-se frascos de polietileno transparente e incolor os quais são previamente esterilizados em autoclave a 121°C, e devidamente identificados. Posteriormente são transportados até às equipas de recolha, e por estas até ao local de amostragem, onde a recolha é realizada de forma que as amostras garantam a assepsia, e sejam representativas das características microbiológicas e o volume recolhido seja suficiente para repetir a análise. No local, as amostras devem ser identificadas com tinta indelével na(s) etiqueta(s) do(s) frasco(s) e no relatório de campo, indicando o nome da água superficial e respetivo código, a data e a hora de colheita. O técnico deve transportar a mala térmica contendo o material necessário, até ao local de colheita, assim como o equipamento de segurança e os documentos de registo necessários (relatório de campo). No caso das recolhas com interesse para este relatório, as amostras para ensaios microbiológicos, é essencial que o processo de recolha se inicie sempre pelos recipientes destinados aos ensaios microbiológicos, por uma questão de assepsia. Além deste cuidado e de forma a garantir as condições de assepsia referidas, a colheita direta de amostras de águas superficiais (para ensaios microbiológicos) deve seguir os seguintes pontos:

- a) O técnico deve desinfetar as mãos com álcool a 70% antes de proceder à recolha da amostra;
- b) O técnico deve retirar o invólucro plástico e o anel que fixa a tampa ao frasco de colheita imediatamente antes de se proceder à recolha;
- c) O técnico deve entrar na água, em condições de segurança, de forma a realizar a recolha a uma profundidade de aproximadamente 30-50cm, para evitar a contaminação da amostra com materiais sólidos que existam à superfície da água. Não

devem ser recolhidas amostras demasiado próximo do fundo da massa de água, no sentido de evitar a recolha de eventuais sedimentos em suspensão;

d) O técnico deve posicionar-se contra a corrente, ou seja, de frente para a corrente, de forma a poder fazer a recolha sem que a amostra seja contaminada pelo próprio;

e) O frasco de colheita deve entrar na água até à profundidade desejada, seguro pela base, e ser aberto dentro de água, com a abertura para baixo, ligeiramente inclinado no sentido oposto ao corpo. O frasco não deve ser completamente cheio, devendo-se deixar uma camada de ar para permitir a homogeneização da amostra no laboratório.

Sempre que o local se revele inacessível efetua-se a colheita indireta, na qual se recorre ao uso de um balde de inox e a recolha deve ser feita do cimo de uma ponte, se esta existir, ou na margem. O balde deve ser lavado pelo responsável da recolha pelo menos três vezes, com água do local. Proceder-se seguidamente à recolha de amostras para ensaios microbiológicos, tal como foi descrito na colheita direta, e somente depois à colheita de amostras para ensaios físico-químicos. O acondicionamento das amostras é sempre efetuado em malas térmicas, fechadas e ao abrigo da luz solar, contendo acumuladores de gelo, durante o tempo necessário ao transporte e de modo a garantir a estabilidade das amostras. A análise deverá ser realizada no mesmo dia em que se procede à recolha. Se tal não for possível, o período de espera não poderá ultrapassar um prazo máximo 24 horas e as amostras devem ser conservadas ao abrigo da luz e a uma temperatura de  $4^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ .

A recolha das águas subterrâneas é também efetuada de acordo com a Norma ISO 5667-3:2003 Water quality – Sampling – Part 3: Guidance on the preservation and handling of water samples. Para recolha e segurança das amostras são utilizados os seguintes elementos:

a) Recipientes lavados e descontaminados em função do parâmetro a analisar (frascos de vidro, de plástico e descartáveis, garrafas ou sacos, conforme os casos);

b) Malas isotérmicas com acumuladores congelados para manter as amostras refrigeradas até entrega no laboratório;

c) Balde de inox, caso seja necessário proceder à recolha indireta de amostras.

### 3.2 - Localização dos pontos de amostragem

O Minho é um rio internacional que nasce a uma altitude de 750 m na serra de Meira, na Comunidade Autónoma da Galiza e percorre cerca de 340 quilómetros até desaguar no oceano Atlântico a sul da localidade da Guarda e a norte de Caminha. Nos últimos 75 quilómetros do seu percurso, entre Melgaço e a foz, o Minho serve de fronteira entre Espanha e Portugal. Para os efeitos do presente trabalho só serão considerados os afluentes em território português, sendo estes: rio Mouro, rio Gadanha, rio Coura e rio Trancoso. Pelo interesse, para os efeitos deste relatório, da comparação de resultados entre diferentes tipos de massas de água, foram escolhidos alguns pontos de amostragem, entre os existentes na bacia hidrográfica do rio Minho, pertencentes a águas naturais doces, superficiais e subterrâneas, e balneares, interiores e de transição.

Quanto às águas superficiais doces, os três pontos são:

- Ínsua do Ranhão (de código utilizado na ARHNorte 01F/02), localizado na freguesia de Verdoejo, concelho de Valença e pertencente ao Rio Minho. Ponto de coordenadas geográficas N42° 3' 12" W8° 35' 16".

- Mazedo (01F/03), localizado na freguesia de Mazedo, concelho de Monção e pertencente ao Rio da Gadanha. Ponto de coordenadas geográficas N42° 2' 55" W8° 30' 14".

- Peso Melgaço (01H/01), na freguesia de Paderne, concelho de Melgaço, também pertence ao Rio Minho. Coordenadas geográficas N42° 6' 30" W8° 17' 50".

Águas doces subterrâneas:

- 14/N1, massa de água na freguesia de Sofo, concelho de Vila Nova de Cerveira, de coordenadas geográficas N41° 53' 49" W10° 21' 38".

- 40/1, localizado na freguesia de Areosa, concelho de Viana do Castelo, com as coordenadas geográficas N41° 43' 28" W8° 51' 42".

- 3/N1 que se encontra na freguesia de Segude, concelho de Monção. Encontra-se a uma altitude de 40m e tem as coordenadas geográficas N42° 2' 50" W8° 23' 19".

As duas águas balneares de transição cujos dados serão apresentados tratam-se das de Caminha e Moledo, enquanto que as águas balneares interiores são as de Lenta e Azenhas – Vilar de Mouro.

Relativamente à análise propriamente dita das amostras de água, há que referir que durante o período de estágio houve a oportunidade de pôr em prática diversas destas metodologias utilizadas para quantificar a presença de microrganismos na água, as quais serão são descritas em seguida.

### 3.3 – Membrana Filtrante

Um dos métodos utilizados para a pesquisa e quantificação de microrganismos é a técnica de filtração por membrana, metodologia com extensa utilização. Baseia-se na filtração de um dado volume de amostra ou da amostra diluída através de uma membrana filtrante de porosidade adequada para reter as bactérias em análise (0,45  $\mu\text{m}$ ). Estes filtros são posteriormente colocados na superfície de placas com meios de cultura sólidos e levados a incubar. Este método pode ser aplicado a todos os tipos de águas, exceto quando estão presentes grandes quantidades de matérias em suspensão que possam ser retidas pela membrana.

Equipamento necessário:

- Rampa de filtração;
- Bomba de vácuo;
- Bico de Bunsen
- Estufas de incubação, com termóstato regulável (estufas com temperaturas diferentes, dependendo se estamos a detetar coliformes fecais ou enterococos).

Material:

- Pinças de aço inox de pontas planas arredondadas para manipulação das membranas;
- Membranas filtrantes estéreis, com porosidade de 0,45  $\mu\text{m}$  e diâmetro de 47 mm;
- Copos de filtração estéreis;
- Pipetas estéreis de 1 ml e 10 ml.

#### **Deteção e quantificação de bactérias coliformes, coliformes fecais e *Escherichia coli***

Para a deteção e quantificação de coliformes fecais e *E. coli*, a norma aplicada é a ISO 9308-1. A membrana é colocada sobre meio de cultura diferencial seletivo apropriado (Membrane Lauryl Sulphate Agar). O meio de cultura seletivo e diferencial, contém lactose a qual é fermentada pelos microrganismos coliformes. Estes formam colónias com coloração amarela e alteram a cor do meio para amarelo, sob a membrana. Esta alteração deve-se à acidificação do meio em consequência da fermentação da lactose. As colónias típicas do microrganismo alvo (lactose-positivas) podem ser repicadas para meio de cultura não seletivo (Plate count agar) e posteriormente submetidas a testes de confirmação. O resultado final é apresentado como o número de UFC (Unidades Formadoras de Colónias) pelo volume específico de amostra. Inicialmente é necessário preparar os meios de cultura a ser utilizados durante a análise.

Uma vez que os meios são comprados com todos os componentes, apenas é necessário efetuar os passos finais:

### **Membrane Lauryl Sulphate Broth + Agar (MLSA)**

Preparação:

- Dissolver 86.2g em água ultrapura, autoclavar a 121°C durante 15 minutos, como indicado nas instruções do preparado em pó. Deixar arrefecer até +/- 50 °C e dispensar em placas de Petri 60 mm de diâmetro.

### **Deteção e quantificação de Enterococos intestinais**

Tem por base a metodologia anteriormente descrita, regendo-se pela ISO 7899-2. Como nos coliformes a primeira fase de análise passa por preparar os meios de cultura e reagentes:

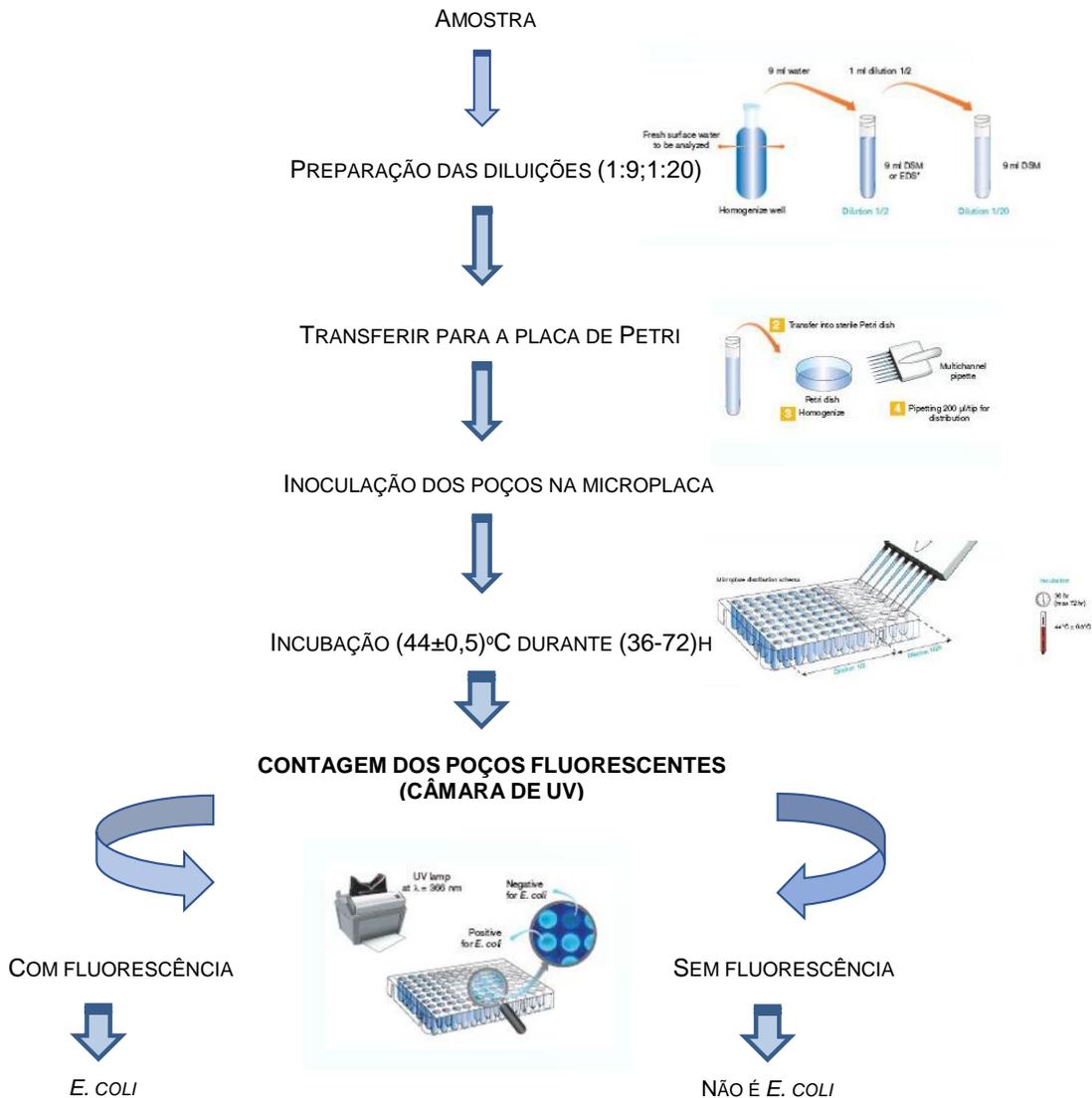
### **Meio Slanetz e Bartley**

Preparação:

- Dissolver 41,4g num litro de água ultrapura. Esterilizar durante 20 minutos numa corrente de vapor ou utilizar o micro-ondas durante 9 minutos. Durante o período de estágio utilizava-se um micro-ondas para este passo. Deixar arrefecer e plaquear rapidamente.

Quanto às restantes fases são muito semelhantes às anteriormente referidas na deteção e quantificação de coliformes. Apenas mudando a temperatura e o tempo de incubação que deverão ser  $36 \pm 2$  °C, e  $44 \pm 4$  horas respetivamente. No que diz respeito ao aspeto das colónias típicas de enterococos intestinais têm uma coloração vermelha, castanha ou rosa no centro ou em toda a colónia.

### 3.4 – Microplacas



**Figura 2** – Representação esquemática do procedimento das microplacas.

A presença de *E. coli* é demonstrada pela deteção da enzima  $\beta$ -D-glucoronidase, cujo substrato (MUG) se encontra desidratado no fundo dos poços da microplaca. Na presença da enzima, o substrato é hidrolisado em 4-metilumbeliferona + glucoronídeo. A produção de 4 metilumbeliferona é indicada por fluorescência azul, observável com lâmpada UV ( $\lambda = 366 \text{ nm}$ ).

O processo inicia-se com a preparação das diluições da amostra a utilizar, as quais são posteriormente transferidas para uma placa de Petri. De seguida, procede-se ao preenchimento sucessivo dos poços das microplacas que são incubadas a  $44 \pm 0,5^\circ\text{C}$  durante 36 a 72 horas para a pesquisa de *E. coli*. Após incubação observam-se as microplacas à luz UV, sendo que a emissão de fluorescência indica a presença de *E. coli*.

A quantificação de *E. coli*, correspondente ao número de poços com fluorescência e é obtida por análise estatística baseada na Lei de Poisson. Os resultados são expressos como número mais provável (NMP) por 100 ml. Os meios de cultura utilizados são adquiridos já prontos a utilizar, com certificado de conformidade.

A presença de Enterococos é demonstrada pela detecção da enzima  $\beta$ -glucosidase, cujo substrato (MUD) se encontra desidratado no fundo dos poços da microplaca. Na presença da enzima, o substrato é hidrolisado em 4-metilumbeliferona + glucosídeo. A produção de 4 metilumbeliferona é indicada por fluorescência azul, observável com lâmpada UV ( $\lambda = 366 \text{ nm}$ ).

### 3.5 - Colilert®-18/Quanti-Tray®

O método Colilert®-18/Quanti-Tray® é um ensaio criado especificamente para contagem NMP de *E. coli* e bactérias coliformes em água, potável ou não, com ou sem tratamento. O Colilert-18 mede simultaneamente o total de coliformes e de *E. coli* em amostras de água. A base do ensaio é a tecnologia de substrato definido (DST, sigla em inglês de Defined Substrate Technology). O método consiste em misturar o reagente DST com 100 ml de amostra e incubar em um ensaio tipo presença/ausência (PA) ou tipo número mais provável (NMP). A amostra adquire cor amarela quando as bactérias coliformes metabolizam o ONPG, que serve como nutriente e indicador, e fluoresce sob luz UV quando a *E. coli* metaboliza o MUG, um outro nutriente e indicador. O Colilert-18 permite detetar essas bactérias simultaneamente à concentração de 1 UFC/100 ml em 18 horas na presença de bactérias heterotróficas em concentrações de até  $2 \times 10^6$  por 100 ml de amostra.

O Quanti-Tray foi projetado para produzir contagens quantitativas de bactérias de amostras de até 100 ml usando reagentes DST. A mistura reagente-amostra é adicionada a uma placa Quanti-Tray, que é então selada com o selador Quanti-Tray Sealer e depois incubada. A placa é projetada de forma a conter 51 cavidades com a mistura reagente-amostra após a selagem. O selador é uma ferramenta motorizada de selagem por calor, projetado para selar a Quanti-Tray. Em seguida, as cavidades positivas são contadas e os NMPs de bactérias coliformes e/ou *E. coli* são determinados a partir de uma tabela. Poços que ganham cor amarela viva após o período de incubação são positivos para coliformes fecais, enquanto que poços simultaneamente amarelos e fluorescentes são positivos para *E. Coli*.

Procedimento:

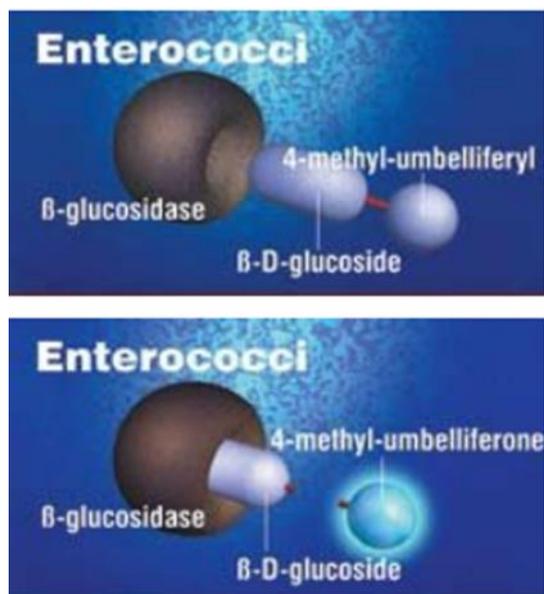
- Adicionar o reagente em pó a 100 ml de amostra num recipiente estéril. Importante ter conhecimento a priori sobre o local de amostragem pois no caso de se

encontrar muito contaminado é necessário diluir a amostra, colocando em primeiro lugar água ultrapura, diluindo desta forma a amostra até à percentagem necessária.

- Fechar o recipiente e agitar até dissolver
- Verter a solução para um Quanti-Tray® e selar num selador Quanti-Tray da IDEXX.
- Incubar em estufa durante 24 horas a  $35\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ .
- Ler os resultados contando o número de poços positivos, os quais se traduzem em número mais provável de bactérias coliformes fecais e *E. Coli*.

### 3.6 - Enterolert®/Quanti-Tray®

O método Enterolert/Quanti-Tray é um teste com o propósito de estimar o NMP de Enterococos em águas potáveis, não potáveis ou residuais. Tem por base os mesmos princípios e tecnologias do método anteriormente descrito, até porque servem os dois o mesmo objetivo de pesquisa de microrganismos na água e são geralmente efetuados praticamente em simultâneo à mesma amostra.



**Figura 3** - Indicador-nutriente que fluoresce quando metabolizado por enterococos.

Procedimento:

- Fechar o recipiente e agitar até dissolver
- Verter a solução para um Quanti-Tray® e selar num selador Quanti-Tray da IDEXX.

- Incubar em estufa durante 24 horas a  $41 \pm 0.5^\circ\text{C}$ .
- Ler os resultados contando o número de poços positivos, a fluorescência traduz-se na presença de enterococos e, posteriormente, no número mais provável destas bactérias.

### 3.7 - Clorofila $a$ e feopigmentos

A clorofila  $a$  é o principal pigmento fotossintético de todos os organismos que realizam fotossíntese com libertação de oxigénio, pelo que é amplamente utilizada para estimar a biomassa fitoplanctónica nas águas doces superficiais. O método aqui descrito baseia-se na Norma NP 4327:1996, que descreve o método de doseamento por espectrometria de absorção molecular de clorofila  $a$  e dos feopigmentos presentes em águas superficiais, através da extração com acetona. Os feopigmentos são os produtos da degradação da clorofila e absorvem, com menor capacidade, luz no mesmo comprimento de onda que a clorofila. A acidificação incluída no método aqui descrito promove a degradação da clorofila em feopigmentos, o que permite corrigir os valores de concentração de clorofila  $a$  dos erros devido à presença de feopigmentos.

O método baseia-se na filtração da amostra para isolar e concentrar o fitoplâncton através de uma membrana filtrante, evitando a sua exposição à luz. A extração da clorofila  $a$  e dos feopigmentos é realizada com acetona a 90% (V/V). A leitura da absorvância do extrato realiza-se a 665 nm e 750 nm antes e depois da acidificação. Proceda-se ao cálculo das concentrações de clorofila  $a$  e feopigmentos através da equação monocromática de Lorenzen.

#### Material:

- Balões volumétricos;
- Provetas de vidro graduadas;
- Pinças de pontas lisas e chatas;
- Varetas de vidro;
- Pipetas de vidro (1, 5 e 10 ml) e/ou dispensador de volume fixo (5ml);
- Micropipetas de volume variável e respetivas pontas descartáveis;
- Papel de alumínio;
- Parafilm;
- Etiquetas;
- Filtros de fibra de vidro com diâmetro de 47 mm;
- Funis de filtração descartáveis;
- Tubos de centrífugadora de 10 a 15 ml de capacidade, resistentes a solventes orgânicos;
- Cronómetro;
- Rampa de filtração por membranas;

- Bomba de vácuo;
- Centrifugadora;
- Espectrofotómetro de absorção molecular que permita leituras no domínio do visível até 750 nm, com uma resolução de 1 nm, uma amplitude de banda inferior ou igual a 2 nm e uma sensibilidade inferior ou igual a 0,001 unidades de absorvância;
- Cuvettes espectrofotométricas de percurso ótico de 1 cm ou superior.

De forma a iniciar o procedimento propriamente dito é necessária a preparação de algumas soluções que são utilizadas durante o mesmo.

Solução aquosa de Acetona a 90% (V/V)

Adicionar num balão volumétrico de 100 ml, 90 ml de acetona pró-análise e 10 ml de água destilada ou equivalente (medidos em proveta graduada). Homogeneizar a solução e guardar em frasco de vidro vedado.

### **Ácido clorídrico 0,1 N**

Sempre que possível, utilizar ampolas de titrisol 0,1 N para a preparação da solução de Ácido Clorídrico (HCl) 0,1 N. Alternativamente, medir 8,5 ml de ácido clorídrico concentrado (HCl) e transferir para balão volumétrico de 1000 ml contendo 500 ml de água destilada. Deixar arrefecer e adicionar água destilada até perfazer os 1000 ml. Homogeneizar a solução e guardar em frasco escuro vedado.

### **Clorofila $\alpha$ , solução padrão (Ca = 10 mg/l)**

Dissolver 1mg de padrão de clorofila a em 100 ml de acetona a 90% de forma a preparar a solução-mãe dos padrões. Esta solução deverá ser conservada no congelador e sempre no escuro, até ao máximo de um ano.

Filtrar 1L de amostra (2 ou 3 replicados por amostra) através de uma membrana de acetato de celulose. A pressão da filtração deve ser a mais fraca possível de modo a evitar-se a fragmentação das células. Em situações que as águas eram muito ricas em fitoplâncton e/ou materiais em suspensão, o volume de amostra a filtrar foi reduzido (pode ser reduzido até 100 ml), de modo a que se pudesse efetuar uma filtração em boas condições. Após a filtração retira-se o filtro com o auxílio de uma pinça e dobram-se os mesmos. Na maioria dos casos não se efetuou imediatamente a extração, portanto os filtros foram embrulhados em folha de alumínio devidamente identificada (código da amostra, código da estação de amostragem, nome do lago ou albufeira, data e volume filtrado) e guardados numa caixa hermética de plástico opaco no congelador, a cerca de -20°C. Quanto à parte da extração da clorofila e feopigmentos, os filtros são colocados nos respetivos tubos de centrífuga, que devem ser identificados com os respetivos códigos e informações utilizadas aquando o armazenamento. Previamente foi

adicionado a cada tubo 5 ml de acetona a 90%, utilizando um dispensador automático, de forma a facilitar a fase de macerar o filtro com uma vareta de vidro. Cada tubo foi selado com Parafilm e colocado no frigorífico a 4°C durante, aproximadamente 20 horas.

Já na fase de centrifugação prepararam-se mais três tubos, dois deles com 10 mL de acetona a 90% e outro tubo com solução padrão de clorofila a, processando-os de forma idêntica às restantes e funcionará como branco espectrofotométrico. Os tubos foram à centrífuga durante 10-15 minutos a 3000-4000 rpm. No fim da centrifugação procedeu-se imediatamente à leitura das absorvâncias dos estratos. Para a leitura ajustou-se o zero da absorvância do espectrómetro utilizando como referência uma solução de acetona a 90%, depois de centrifugada. Os brancos são lidos primeiro para evitar interferências das amostras e do padrão na cuvette utilizada. Pipetou-se 6 ml do extrato da amostra para a cuvette de 4 cm que entra no espectrómetro, tendo cuidado em pipetar do sobrenadante. Lê-se a absorvância do extrato a 665 e 750 nm contra o branco de acetona a 90%, tendo em conta que a absorvância a 750 nm não deve exceder 0,020 para uma célula de percurso ótico de 4 cm. Após as primeiras duas leituras (665 e 750 nm) adiciona-se 200 µl de ácido clorídrico 0,1 N, tapa-se a célula do espectrofotómetro com a respetiva tampa e homogeneiza-se bem. Após 2 minutos, efetua-se novamente a leitura da absorvância do extrato acidificado a 750 e 665 nm contra o branco de acetona a 90%.

### **Cálculo da concentração de clorofila $\alpha$ e feopigmentos**

A concentração de clorofila  $\alpha$  (Cl $\alpha$ ) e de Feopigmentos (Feo) na amostra de água analisada é expressa em micrograma por litro (µg/L) e calculada segundo as equações monocromáticas de Lorenzen (1967):

$$Cl_{\alpha} = \frac{A \cdot K \cdot [(A_{o665} - A_{o750}) - (A_{a665} - A_{a750})] \cdot v}{V \cdot L}$$

$$Feo = \frac{A \cdot K \cdot [R \cdot (A_{o665} - A_{o750}) - (A_{a665} - A_{a750})] \cdot v}{V \cdot L}$$

Onde:

A<sub>o665</sub> e A<sub>o750</sub> – são respetivamente as absorvâncias a 665 e 750 nm antes da acidificação

A<sub>a665</sub> e A<sub>a750</sub> – são respetivamente as absorvâncias a 665 e 750 nm após a acidificação

v – Volume do extrato (ml)

V – Volume de água filtrada (L)

L – Caminho ótico (cm)

K – 2,25

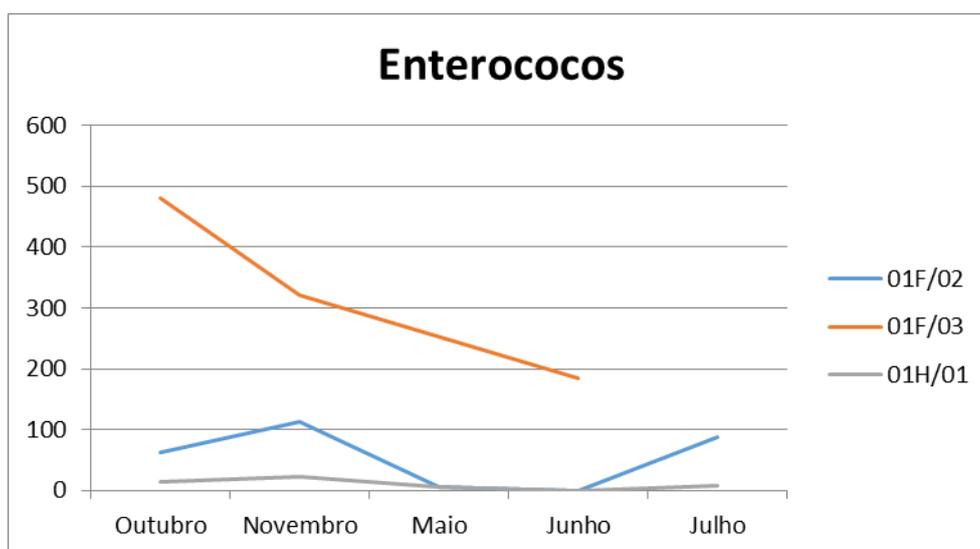
## 4 - APRESENTAÇÃO DE RESULTADOS

Os resultados a seguir apresentados dizem respeito a análises efetuadas durante o período de estágio e apenas a massas de água (naturais doces, superficiais e subterrâneas e balneares, interiores e de transição) pertencentes à bacia hidrográfica do Rio Minho, cedidos pelos representantes dos laboratórios da ARHNorte. De salientar que de forma a rentabilizar o tempo despendido nas análises, na unidade laboratorial da ARH do Norte, utiliza-se apenas um procedimento de pesquisa para cada matriz de água. Águas balneares apenas se utiliza o método das microplacas, enquanto que águas naturais doces eram analisadas utilizando o método da membrana filtrante, passando-se em 2018 a usar apenas o método Enterolert e Colilert, o que explica a mudança de unidades nos resultados das águas doces de Novembro de 2017 para Maio de 2018.

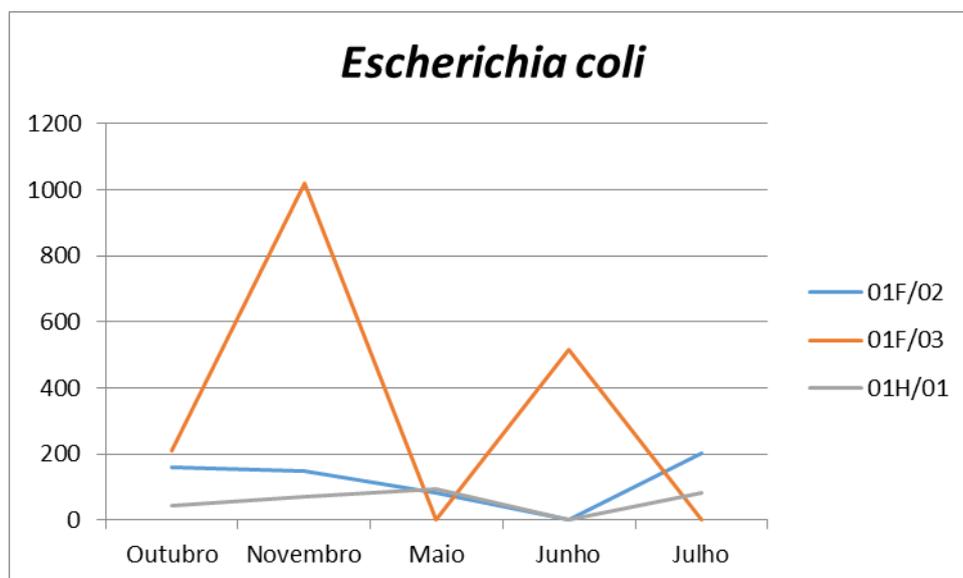
### 4.1 - Águas naturais doces superficiais

	01F/02	01F/03	01H/01	Unidade
Outubro	62	480	15	UFC/100ml
Novembro	113	320	23	
Maio	6	-	6	NMP/100ml
Junho	-	185	-	
Julho	87	-	9	

**Tabela 1** – Valores obtidos em cada amostragem para o parâmetro enterococos.



**Figura 4** – Variação temporal dos níveis de enterococos em três diferentes águas naturais doces superficiais.



**Figura 5** - Variação temporal dos níveis de *Escherichia coli* em três diferentes águas naturais doces superficiais.

	01F/02	01F/03	01H/01	Unidade
Outubro	160	210	45	UFC/100ml
Novembro	150	1020	71	
Maio	81	-	94	NMP/100ml
Junho	-	517	-	
Julho	201	-	83	

**Tabela 2** - Valores obtidos em cada amostragem para o parâmetro *Escherichia coli*.

De forma a classificar as águas doces superficiais, baseiam-se os critérios na legislação de águas para consumo humano. Tendo em conta que uma água para consumo humano não deve apresentar microrganismos, classificam-se estas águas como tendo má qualidade microbiológica, uma vez que em todos os pontos e em todas as amostragens se verificaram concentrações tanto de *Escherichia coli* como de Enterococos. De forma a se poderem utilizar estas águas para consumo, aconselha-se então o tratamento das mesmas.

	01F/02	01F/03	01H/01	Unidade
Outubro	2,9	<0,73	2,5	µg/L
Novembro	<0,73	-	-	

**Tabela 3** – Valores obtidos em cada amostragem para o parâmetro clorofila *a* em águas naturais doces superficiais.

Durante o período de estágio apenas existiram as amostragens apresentadas no que toca a clorofila *a* e feopigmentos pois é um parâmetro com uma periodicidade de amostragem maior que os restantes. Além disso, os valores não revelam quantidades de biomassa fitoplanctónica elevadas, pelo que a contaminação excessiva por matéria orgânica está posta de parte e pode-se considerar que a qualidade do curso de água é boa. De qualquer forma, para obter informação mais aprofundada sobre o estado trófico de um curso de água sugeria a análise deste parâmetro em conjunto com outras métricas físico-químicas e biológicas.

#### 4.2 - Águas naturais doces subterrâneas

	14/N1	40/1	3/N1	Unidade
Enterococos - Março	<1	<1	61	NMP/100ml
<i>E. coli</i> - Abril	-	-	5	

**Tabela 4** - Valores obtidos em cada amostragem para ambos os parâmetros enterococos e *Escherichia coli* em águas naturais doces subterrâneas.

Para as águas naturais doces subterrâneas, foi utilizado o mesmo critério que nas superficiais. No caso dos pontos 14/N1 e 40/1, não se encontraram colónias de enterococos, daí o valor apresentado, logo a qualidade microbiológica é considerada boa. Sendo assim, os valores bacteriológicos apresentados para o ponto 3/N1, apesar de heterogéneos, são todos resultados positivos da presença de microrganismos e, portanto, as águas são impróprias para consumo e aconselha-se tratamento antes de serem utilizadas em captações para consumo.

### 4.3 - Águas balneares de transição

	Caminha	Moledo	Unidade
4 de Junho	<15	<15	NMP/100ml
25 de Junho	<15	15	
16 de Julho	<15	<15	
6 de Agosto	15	<15	

**Tabela 5** – Valores obtidos para o parâmetro enterococos em águas balneares de transição.

Observando os resultados em questão e tendo em conta as tabelas do Anexo I, podemos concluir que ambas as águas balneares de transição apresentam valores dentro do intervalo de qualidade do Excelente, uma vez que não existe nenhum valor acima de 15 NMP/100mL.

	Caminha	Moledo	Unidade
4 de Junho	<15	61	NMP/100ml
25 de Junho	110	30	
16 de Julho	<15	<15	

**Tabela 6** – Valores obtidos para o parâmetro *Escherichia coli* em águas balneares de transição.

Assim como na contagem de Enterococos, os resultados de *E. coli* não ultrapassam o limite superior para as águas balneares de transição, visto que o valor mais alto (110 NMP/100ml) não ultrapassa o limite estipulado no Anexo I (250 UFC/100ml). Com os valores apresentados depreende-se que não existem episódios de contaminação microbiológica, concluindo-se na Excelente qualidade das águas balneares de transição.

#### 4.4 - Águas balneares interiores

	Lenta	Azenha - Vilar de Mouros	Unidade
18 de Junho	<15	<15	NMP/100ml
2 de Julho	144	30	
16 de Julho	15	<15	
30 de Julho	15	15	
1 de Agosto	-	-	
13 de Agosto	15	<15	

**Tabela 7** – Valores obtidos para o parâmetro enterococos em águas balneares interiores.

Mais uma vez os valores apresentados recaem todos na qualidade Excelente pois não ultrapassam as 200 UFC/100ml.

	Lenta	Azenha - Vilar de Mouros	Unidade
18 de Junho	30	160	NMP/100ml
2 de Julho	539	773	
16 de Julho	30	30	
30 de Julho	-	4796	
1 de Agosto	-	46	

**Tabela 8** - Valores obtidos para o parâmetro *Escherichia coli* em águas balneares interiores.

A água balnear de Lenta apresenta a 18 de Junho e a 16 de Julho resultados na ordem da Excelente qualidade, enquanto que a 2 de Julho a qualidade decresceu, havendo um pico de *E. coli*, deteriorando a qualidade, a qual desceu para Boa. Azenhas revela-se mais problemática. Os valores apresentados na Tabela 8 são mais elevados que os de Lenta, este pormenor justifica também o maior número e frequência de análises efetuadas à mesma, pois sempre que existem resultados acima dos previstos e fora de uma qualidade da água aceite, é necessário repetir a amostragem e análise do ponto em que ocorre a suposta contaminação. A 18 de Junho, 16 de Julho e 1 de Agosto os valores encontram-se no Excelente, já a 2 de Julho apresenta uma qualidade mais baixa, Boa, e a 30 de Julho obteve-se o valor mais alto (4796 NMP/100ml), resultado bastante preocupante pois ultrapassa a escala das águas próprias para uso recreativo.

Importante de referir que em diversas tabelas existem resultados apresentados com o sinal de “menor que”, como por exemplo na Tabela 7, a 16 de Julho, Azenha apresenta um resultado de <15. Isto deve-se ao facto de o valor estar abaixo do Limite de Quantificação (LQ), ou seja, a menor quantidade de analito numa amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. Os LQ estavam estipulados anteriormente e tinham sido calculados segundo a base de dados de resultados anteriores. Por fim, referir que apesar de na legislação surgir o número de microrganismos em UFC/100mL e através da utilização do método das microplacas se obter um resultado sobre o formato de NMP/100ml, ambas estas métricas são relativamente equivalentes pelo que o resultado obtido é automaticamente comparado com as tabelas de qualidade sem se efetuar uma conversão de unidades.

## 5 - CONCLUSÃO

Tirando ilações sobre o trabalho efetuado considero que o estágio proporcionou uma oportunidade única para evoluir profissionalmente e adquirir, em simultâneo, novas competências. Considero ter conseguido uma rápida adaptação à diversidade de tarefas desempenhadas, atividades atribuídas e aos procedimentos internos implementados, o que resultou numa experiência muito enriquecedora. A prática laboratorial promoveu bastante a capacidade autodidata e a independência no que toca a manuseamento de material, amostras, preparação de meios de cultura e análises microbiológicas. De igual forma, no que respeita aos diversos pareceres técnicos que contribuí na realização, ajudaram a desenvolver o espírito crítico e a capacidade de análise de múltiplos resultados em simultâneo, ao mesmo tempo que me foi possível pôr em prática alguns predicados da Diretiva Quadro de Água e concluir sobre a qualidade de diferentes massas de água.

Observando os resultados apresentados pode inferir-se sobre a qualidade microbiológica da água nos pontos especificados. Uma vez que é utilizado o princípio de “um fora, todos fora” no que toca a atribuição da qualidade de uma água, esse mesmo princípio será utilizado na atribuição de uma classificação microbiológica. Traduzindo, se um dos parâmetros obtiver um resultado Mau ou Medíocre, a qualidade geral da massa de água é considerada Má ou Medíocre. Sendo assim, será correto utilizar todas as métricas apresentadas de forma a chegar a uma conclusão sobre a qualidade. Desta forma, ambas as águas balneares de transição (Caminha e Moledo) apresentam uma qualidade Excelente, dado que durante a monitorização da época balnear todas as análises se mantiveram nesta categoria. Passando às águas balneares interiores, a qualidade de Lenta é considerada Boa, devido ao resultado positivo de *E. coli* de 2 de Julho (539 NMP/100ml), já Azenha é considerada Medíocre, devido à análise a *E. coli* de 30 de Julho. Sendo que na análise seguinte os valores baixaram e se mantiveram na categoria de Excelente, será de pensar que o percurso natural do rio de desaguar no mar tornasse este caso de contaminação periódico, ocorrendo uma diluição dos poluentes.

## 6 - BIBLIOGRAFIA

Rodrigues C.M.M. (2010). Avaliação da qualidade ecológica do Rio Ferreira nos concelhos de Valongo e Gondomar. Universidade do Porto, Porto, 195 pp.

Castro M.I.R.V.C. (2014). Contributo para a definição do valor dos serviços de ecossistemas na bacia hidrográfica do rio Tâmega: Efeito da contaminação por nitratos. Universidade do Porto, Porto, 101 pp.

Abelho Manuela (2010). Manual de monitorização microbiológica ambiental. 35 pp.

Mendes, B. (2010). Microbiologia da água. Páginas 506-522 in Ferreira.

Ferreira, M. T.; Aguiar, F. C.; Rodriguez-González, P. & Albuquerque, A. (2007). Diretiva-Quadro da Água. Avaliação da Qualidade Ecológica das Águas Interiores com base no Elemento Macrófitos. Relatório Final. Contrato nº 2003/071/INAG. Lisboa: Associação para o Desenvolvimento do Instituto Superior de Agronomia.

INAG, I. P. (2006). Implementação da Diretiva Quadro da Água: 2000-2005. Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional. Instituto da Água, I. P.

INAG, I. P (2009). Critérios para a Classificação do Estado das Massas de Água Superficiais: Rios e Albufeiras. Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional. Instituto da Água, I. P.

Mendes, B. (2010). microbiologia da água. microbiologia. Lidel: 506 - 521. 15 pp.

ISO (2003). Water quality – Sampling – Part 3: Guidance on the preservation and handling of water samples (DIS 5667-3). International Organization for Standardization, Geneva.

ISO (2000). Water quality – Detection and enumeration of enterococci – Part 2: Membrane filtration method (DIS 7899-2). International Organization for Standardization, Geneva.

ISO (2000). Water quality – Detection and enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria – Part 1: Membrane filtration method (DIS 9308-1). International Organization for Standardization, Geneva.

NP 4327 (1996). Qualidade da água. Instituto Português da Qualidade.

EA (2009). The microbiology of drinking water – Part 4 – Methods for the isolation and enumeration of coliform bacteria and *Escherichia coli* (O157:H7). Environment Agency.

**Referências bibliográficas eletrônicas:**

Weber Scientific. Enterolert® Rapid Enterococci Test (IDEXX).

<https://www.weberscientific.com/enterolert-rapid-enterococci-test-idexx>

IDEXX. Validação do método Colilert®-18/Quanti-Tray®

[http://www.idexx.it/pdf/it\\_it/water/7542-01-colilert-18-report-port.pdf](http://www.idexx.it/pdf/it_it/water/7542-01-colilert-18-report-port.pdf)

IBERLAB. Enterolert™.

[http://www.iberlab.pt/newsletter/newsletter\\_pdfs/newsletter1pdf4.pdf](http://www.iberlab.pt/newsletter/newsletter_pdfs/newsletter1pdf4.pdf)

## 7 – ANEXO I

**Tabela I** – Concentrações de microrganismos por categoria de qualidade para águas balneares interiores.

**Águas interiores** (considerando 3 épocas balneares consecutivas)

PARÂMETRO	QUALIDADE EXCELENTE	QUALIDADE BOA	QUALIDADE ACEITÁVEL
<b>Enterococos intestinais em ufc/100ml</b>	(*) 200	(*) 400	(**) 330
<b>Escherichia coli em ufc/100ml</b>	(*) 500	(*) 1 000	(**) 900

**Tabela II** – Concentrações de microrganismos por categoria de qualidade para águas balneares costeiras/de transição.

**Águas costeiras** (considerando 4 épocas balneares consecutivas)

PARÂMETRO	QUALIDADE EXCELENTE	QUALIDADE BOA	QUALIDADE ACEITÁVEL
<b>Enterococos intestinais (ufc/100ml)</b>	(*) 100	(*) 200	(**) 185
<b>Escherichia coli (ufc/100ml)</b>	(*) 250	(*) 500	(**) 500