



Qualidade microbiológica e físico-química da água usada na higienização em explorações de leite de pequenos ruminantes

Liliana Isabel Pires Domingues

Orientadores

Cristina Maria Baptista Santos Pintado

Maria da Conceição Mesquita dos Santos

Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Inovação e Qualidade na Produção Alimentar, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Cristina Maria Baptista Santos Pintado e da Professora Maria da Conceição Mesquita dos Santos, do Instituto Politécnico de Castelo Branco.

Setembro 2015

Composição do júri

Presidente do júri

Doutor, Luís Pedro Mota Pinto de Andrade

Vogais

Doutor, António Manuel Moitinho Nogueira Rodrigues

Doutor, João Pedro Martins da Luz

Doutora, Cristina Maria Baptista Pintado

Mestre, Maria da Conceição Mesquita dos Santos

À estrela mais brilhante do céu, o meu avô.

Agradecimentos

No final de mais uma etapa, quero manifestar os meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que, ao longo do meu percurso académico, me acompanharam e que estiveram direta ou indiretamente relacionados com a elaboração do presente trabalho. Em particular:

À D. Adriana por me ter proporcionado as condições necessárias à realização deste estágio e pelo seu acolhimento na empresa;

À Professora Doutora Cristina Santos Pintado e à Professora Maria da Conceição Mesquita dos Santos, minhas orientadoras, agradeço a oportunidade que me deram de poder realizar este estágio, por todo o apoio prestado durante a elaboração deste trabalho, pela disponibilidade e transmissão de conhecimentos técnico- científicos;

À Eng.^a Ana Mangana Santos pela disponibilidade demonstrada, ajuda e esclarecimentos que me prestou ao longo do estágio;

À Professora Catarina Gavinhos por todo o auxílio no tratamento dos dados;

Não menos importante, o meu sincero e enorme agradecimento às Técnicas do Laboratório de Microbiologia e do Laboratório de Águas e Águas Residuais da ESACB, Dra. Helena Martins e Eng.^a Manuela Goulão, por todo o conhecimento, incentivo, apoio e ajuda que me prestaram durante o estágio;

A todos os professores, colegas e funcionários da ESACB, por toda a simpatia com que me acolheram e pelo apoio prestado durante o meu percurso académico;

Aos meus pais pela educação exemplar que me deram, pelos valores e princípios que me transmitiram, por me acompanharem ao longo desta caminhada, pelo esforço feito ao longo da minha vida académica, pelo incentivo, confiança e acima de tudo pelo amor incondicional;

À minha irmã, cunhado e afilhada por todo o carinho dispensado e por todo o apoio incondicional;

Ao meu namorado por todo o apoio prestado, pela motivação nos momentos cruciais e pela presença constante na minha vida;

Aos amigos pela amizade sincera e pelo carinho.

Obrigado.

Resumo

Este trabalho contou com a colaboração de uma empresa, sediada na Beira Baixa, produtora de queijos a partir de leite cru de ovelha e de cabra. Foram realizadas análises microbiológicas e físico-químicas, em alturas do ano diferentes (maio/junho e outubro/novembro), à água usada em 24 explorações leiteiras de produção de leite, fornecedoras da queijaria. No total foram analisadas 47 amostras, 66% das quais sem tratamento. Os parâmetros analisados foram: pH, condutividade elétrica ($\mu\text{S}/\text{cm}$), oxidabilidade (mg/L), azoto amoniacal (mg/L), nitratos e nitritos (mg/L), azoto orgânico (mg/L), ferro ($\mu\text{g}/\text{L}$), manganês ($\mu\text{g}/\text{L}$), coliformes totais ($\text{N}^\circ \text{UFC}/100\text{mL}$), *Escherichia coli* ($\text{N}^\circ \text{UFC}/100\text{mL}$), enterococos intestinais ($\text{N}^\circ \text{UFC}/100\text{mL}$), *Clostridium perfringens* ($\text{N}^\circ \text{UFC}/100\text{mL}$), microrganismos totais a 22°C ($\text{N}^\circ \text{UFC}/\text{mL}$), microrganismos totais a 37°C ($\text{N}^\circ \text{UFC}/\text{mL}$), *Pseudomonas aeruginosa* ($\text{N}^\circ \text{UFC}/100\text{mL}$) e *Listeria monocytogenes*.

Os resultados mostram que, com base no DL n^o 306/2007 para uma água de consumo e que seja destinada à indústria alimentar, nos parâmetros físico-químicos, 31% das amostras de água tratada e 65% das amostras de água não tratada apresentam resultados insatisfatórios para a qualidade da água, verificando-se maior número de incumprimentos a nível do parâmetro de pH. Em relação aos parâmetros microbiológicos, foi verificado que 44% das amostras de água com tratamento e 74% das amostras sem tratamento apresentam resultados insatisfatórios para a qualidade da água, sendo que o maior número de incumprimentos se verificou para os coliformes totais. Relativamente à pesquisa de *Pseudomonas* spp. foi verificado que a grande maioria, 70% das amostras se encontravam contaminadas por *Pseudomonas* spp., sendo que apenas foi possível identificar *Pseudomonas aeruginosa* num único produtor. Consoante à pesquisa de *Listeria monocytogenes*, todas as amostras analisadas apresentaram um resultado negativo, no entanto foram identificadas as espécies *L. ivanovii* e *L. seeligeri* na amostra de água, resultado este que não descarta a importância de um acompanhamento ao produtor identificado pela empresa.

Em relação às hipóteses testadas, foi verificada correlação entre a variável dependente fonte de captação e as variáveis independentes pH, condutividade elétrica, oxidabilidade, azoto amoniacal, n^o de colónias a 22°C e 37°C , bactérias coliformes e enterococos intestinais. Pelo contrário, não foi obtida correlação entre a fonte de captação e as variáveis independentes nitratos e nitritos, azoto orgânico, ferro e manganês, *Clostridium perfringens*, *Pseudomonas* spp. e *Escherichia coli*. A hipótese que correlacionava a presença de bactérias coliformes com a presença de *Pseudomonas* spp. foi suportada.

Palavras chave

Pseudomonas spp., qualidade da água, indicadores fecais, equipamento de ordenha, leite cru

Abstract

This work was performed with the collaboration of a dairy factory located at the Beira Baixa region which produces cheese with raw milk from sheep and goat. Microbiological and physical-chemical analysis were conducted to the water samples used in 24 dairy farms of small ruminants that supply the cheese factory. The analysis were made at different times of the year (May/June and October/November). Forty-seven samples were analyzed, 66% of which being water samples with no treatment. The parameters analyzed were: pH, electrical conductivity ($\mu\text{S}/\text{cm}$), oxidisability (mg/L), ammonia nitrogen (mg/L), nitrates and nitrites (mg/L), organic nitrogen (mg/L), iron ($\mu\text{g}/\text{L}$), manganese ($\mu\text{g}/\text{L}$), total coliform (CFU/100mL), *Escherichia coli* (CFU/100mL) intestinal enterococci (CFU/100mL), *Clostridium perfringens* (CFU/100mL), total microorganisms at 22°C (CFU/mL), total microorganisms at 37°C (CFU/mL) *Pseudomonas aeruginosa* (CUF/100mL) and *Listeria monocytogenes*.

The results show that, based on the Portuguese Law Decree 306/2007 for drinking water and water which is destined to the food industry, 31% of the treated water samples and 65% of the untreated water samples had unsatisfactory results concerning physical-chemical parameters, presenting a greater number of non-compliances to the pH parameter. Regarding the microbiological parameters, it was found that 44% of the samples of treated water and 74% of the samples of untreated water showed poor results for water quality, being the highest number of non-compliances found in total coliforms. With regard to *Pseudomonas* spp., it was found that most samples (70%) were contaminated with this bacteria, nevertheless it was only possible to identify *Pseudomonas aeruginosa* in a single milk producer. On what concerns the detection of *Listeria monocytogenes*, all samples analyzed (water and swabs in a milk producer) showed a negative result, nevertheless *L. ivanovii* and *L. seeligeri* were isolated in the water sample. This result does not exclude the importance of monitor this milk producer concerning the presence of *L. monocytogenes*.

Regarding the tested hypotheses, it was found correlations between the dependent variable water source and the independent variables pH, electrical conductivity, oxidisability, ammonia nitrogen, number of total microorganisms at 22°C and 37°C, coliform bacteria and intestinal enterococci. On the contrary, it was not obtained correlation between the water source and the independent variables nitrates and nitrites, organic nitrogen, iron and manganese, *Clostridium perfringens*, *Pseudomonas* spp. and *Escherichia coli*. The hypothesis that correlates the presence of coliform bacteria in the presence of *Pseudomonas* spp. was supported.

Keywords

Pseudomonas spp., water quality, fecal indicators, milking equipment , raw milk

Índice Geral

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Qualidade da água e saúde pública	3
2.2. Qualidade da água utilizada na higienização de utensílios e equipamentos na sala de ordenha vs qualidade do leite	5
2.3. Parâmetros de avaliação da qualidade da água	6
2.3.1. Parâmetros físico-químicos	7
2.3.2. Parâmetros microbiológicos	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1. Caracterização da queijaria e explorações leiteiras	15
3.2. Colheita das amostras	15
3.3. Descrição das análises físico-químicas	18
3.4. Descrição das análises microbiológicas	22
3.5. Tratamento estatístico	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1. Proveniência das amostras	32
4.2. Resultados e discussão das análises físico-químicas	34
4.2.1. Apreciação dos resultados físico-químicos tendo em conta o DL nº306/2007	34
4.2.2. Análise dos resultados físico-químicos em função da fonte de captação	38
4.3. Resultados e discussão da análise microbiológica	46
4.3.1. Apreciação dos resultados microbiológicos tendo em conta o DL nº306/2007	46
4.3.2. Análise dos resultados microbiológicos em função da fonte de captação	50
4.3.3. Contagem de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Pseudomonas</i> spp.	54
4.3.4. Caracterização de isolados de <i>Pseudomonas</i> spp. e potencial para promover defeitos de cor em queijos	58
4.3.5. Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i> numa amostra de água de leite e no ambiente	60
4.4. Resumo dos resultados do modelo conceptual	61
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

ANEXOS	71
Anexo I: Parâmetros de avaliação da qualidade da água destinada ao consumo humano de acordo com o Decreto-lei nº 306/2007 de 27 de agosto	72
Anexo II: Fluxograma para a determinação do potencial hidrogeniônico (pH) em amostras de águas	76
Anexo III: Fluxograma para a determinação da condutividade elétrica em amostras de águas	78
Anexo IV: Fluxograma para a determinação da Oxidabilidade em amostras de Águas	80
Anexo V: Fluxograma para a determinação dos compostos de azoto em amostras de Águas	82
Anexo VI: Fluxograma para a determinação dos metais pesados em amostras de Águas	86
Anexo VII: Tabela síntese dos microrganismos analisados com respectivos meios de cultura e reagentes utilizados	88
Anexo VIII: Fluxograma para a contagem e detecção do número de colónias a 22°C e a 37°C: NF EN ISO 6222-1999	90
Anexo IX: Fluxograma para a contagem de coliformes e <i>Escherichia coli</i>: NF EN ISO 9308-1:2000	92
Anexo X: Fluxograma para a contagem de Enterococos intestinais: NF EN ISO 7899-2 (2000)	94
Anexo XI: Fluxograma para a contagem de <i>Clostridium perfringens</i> e esporos: National Standard Methods, HPA- referência nº W 5i3.1	96
Anexo XII: Fluxograma para a contagem e detecção de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>: NF EN 12780:2002	99
Anexo XIII: Fluxograma para a pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i>: ISO 11290-1:1996	101
Anexo XIV: Output dos resultados dos testes realizados aos parâmetros físico-químicos, quando comparados com as épocas de colheita (SPSS)	103
Anexo XV: Resultados dos testes realizados aos parâmetros físico-químicos (SPSS)	105
Anexo XVI: Resultados dos testes realizados aos parâmetros microbiológicos (SPSS)	108
Anexo XVII: Resultados da correlação entre a de <i>Pseudomonas</i> spp. e fonte de captação	110
Anexo XVIII: Resultados da correlação entre a presença de Bactérias coliformes e <i>Pseudomonas</i> spp.	112

Índice de figuras

Figura 1:	Localização das explorações produtoras de leite onde foi realizada a colheita das amostras de água	16
Figura 2:	Etapas do processo de filtração por membrana	24
Figura 3:	Colónias típicas de bactérias coliformes no meio Tergitol 7 Agar	25
Figura 4:	Confirmação da produção de indol por culturas de <i>E. coli</i> . À direita uma reação indol-positiva e à esquerda uma reação indol-negativa	25
Figura 5:	Enterococos confirmados no meio <i>Bile Esculin Agar</i>	26
Figura 6:	Modelo Conceptual	30
Figura 7:	Identificação de uma cultura desconhecida como <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , através da utilização de uma galeria bioquímica API 20NE	58
Figura 8:	Aspeto de culturas de <i>Ps. aeruginosa</i> (a) e <i>Ps. fluorescens</i> (b) no meio King B e de culturas de <i>Pseudomonas spp.</i> em Agar Queijo.	60
Figura 9:	Síntese dos resultados das correlações testadas	62

Índice de tabelas

Tabela 1:	Doenças de origem hídrica por via oral	4
Tabela 2:	Origem das amostras de água analisadas	17
Tabela 3:	Parâmetros físico-químicos e respectivos métodos analíticos	19
Tabela 4:	Parâmetros microbiológicos e respectivos métodos analíticos	22
Tabela 5:	Parâmetros físico-químicos avaliados e respectivo valor paramétrico (VP)	34
Tabela 6:	Resultados físico-químicos das análises às amostras de água com tratamento	35
Tabela 7:	Resultados das análises físico-químicas das amostras de água sem tratamento	36
Tabela 8:	Percentagem de incumprimentos relativos ao ferro e manganês	46
Tabela 9:	Parâmetros microbiológicos avaliados e respectivo limite legal	47
Tabela 10:	Resultados das análises microbiológicas das amostras de água com tratamento	48
Tabela 11:	Resultados das análises microbiológicas das amostras de água sem tratamento	49
Tabela 12:	Resultados da contagem de <i>Ps. aeruginosa</i> e <i>Pseudomonas</i> spp. nas amostras de água colhidas em outubro/novembro (n=23)	55

Índice de Gráficos

Gráfico 1:	Percentagem de amostras com tratamento e sem tratamento	32
Gráfico 2:	Percentagem de amostras em função da sua origem	33
Gráfico 3:	Percentagem de explorações que usam água tratada/não tratada em relação ao tipo de ordenha manual/mecânica	34
Gráfico 4:	Percentagem de incumprimentos para cada parâmetro físico-químico	37
Gráfico 5:	<i>Boxplot</i> que traduz a dispersão dos valores de pH em função da fonte de captação	39
Gráfico 6:	<i>Boxplot</i> que traduz a dispersão dos valores da condutividade elétrica em função da fonte de captação e da data de colheita de amostra	40
Gráfico 7:	<i>Boxplot</i> que traduz a dispersão dos valores da oxidabilidade em função da fonte de captação e da data de colheita de amostra	41
Gráfico 8:	<i>Boxplot</i> que traduz a dispersão dos valores do azoto amoniacal em função da fonte de captação e da data de colheita de amostra	42
Gráfico 9:	<i>Boxplot</i> que traduz a dispersão dos valores dos nitratos e nitritos em função da fonte de captação e da data de colheita de amostra	43
Gráfico 10:	<i>Boxplot</i> que traduz a dispersão dos valores do azoto orgânico em função da fonte de captação e da data de colheita de amostra	45
Gráfico 11:	Percentagem de amostras de água da rede pública e de amostras de água subterrâneas sem tratamento com um	50

número de microrganismos a 22°C inferior e superior a 100 UFC/mL

- Gráfico 12:** Percentagem de amostras de água da rede pública e de amostras de água subterrâneas sem tratamento com um número de microrganismos a 37°C inferior e superior a 20 UFC/mL 51
- Gráfico 13:** Percentagem de amostras em incumprimento (≥ 1 UFC/100mL) relativamente aos parâmetros bactérias coliformes e *E. coli* em amostras de água da rede pública e em amostras de água subterrâneas sem tratamento 53
- Gráfico 14:** Percentagem de amostras em incumprimento (≥ 1 UFC/100mL) relativamente ao parâmetro enterococos intestinais em amostras de água da rede pública e em amostras de água subterrâneas sem tratamento 54
- Gráfico 15:** Percentagem de amostras com contagem de *Pseudomonas* spp. ≥ 1 UFC/100mL em amostras de água com e sem tratamento 57
- Gráfico 16:** Frequência relativa (%) de espécies identificadas entre os 20 isolados identificados com recurso ao API 20NE 58
- Gráfico 17:** Frequência relativa (%) dos isolados (n=23) com capacidade para produzirem pigmentos fluorescentes e/ou promoverem o acastanhamento no meio Agar Queijo 59

Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos

C₁-Primeira colheita de amostra

C₂- Segunda colheita de amostra

DL- Decreto-Lei

ESACB- Escola Superior Agrária de Castelo Branco

Fe- Ferro

ISO- *International Organization for Standardization*

LD- Limite de Detecção

Mn- Manganês

pH- Potencial Hidrogeniónico

SMEWW- *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*

UFC- Unidade Formadora de Colónia

VP- Valor Paramétrico

1. Introdução

A água é indispensável à manutenção da vida no planeta e, por esse motivo, desperta o interesse de diversos sectores, nomeadamente os que estudam a qualidade deste recurso (João *et al.*, 2011). Quando abordado o conceito da qualidade dos alimentos este é, essencialmente, multivariado, abrangendo um número de propriedades tais como cor, teor de humidade, textura, aroma e gosto (Gowen, 2012). Vilar *et al.* (2012) alertam-nos também para a importância da presença de microrganismos nos alimentos, pois estes podem representar um risco para a saúde pública. Quando se encontram presentes na água poderão afetar a saúde humana, quer pelo seu consumo direto, quer pelo seu uso indireto na produção e/ou processamento de alimentos (Amenu *et al.*, 2014).

No queijo e outros produtos derivados do leite a garantia da inocuidade destes só é possível por meio da implementação das boas práticas de higiene, envolvendo a sanidade animal, e higiene dos manipuladores, equipamentos e utensílios, tanto na produção primária como no fabrico do produto final. Dessa forma, a limpeza e a higienização dos equipamentos, utensílios e ambiente são operações fundamentais no controlo sanitário em indústrias alimentares (CAP, 2009).

Na produção leiteira, a qualidade microbiológica é um dos principais indicadores da qualidade da água utilizada. Assim, a utilização de uma água com presença de microrganismos poderá contaminar os equipamentos de ordenha, refrigeração e, por último, comprometer a qualidade do leite (João *et al.*, 2011). Vilar *et al.* (2012) refere ainda que, no caso do leite, a obtenção de um produto de elevada qualidade depende dos processos que ocorrem na sua produção, designadamente a qualidade microbiológica da água. Toda a água utilizada para a remoção de qualquer contaminação nas superfícies que contactam com os alimentos deve estar de acordo com os parâmetros do DL nº 306/2007 de 27 de Agosto.

Por se tratar de um assunto tão importante, uma vez que interfere com a qualidade e a segurança dos alimentos, este estudo recai sobre a avaliação da qualidade da água utilizada em explorações de leite de pequenos ruminantes. São vários os estudos que abordam a temática da qualidade da água, no entanto poucos são os estudos publicados que se debruçam sobre as propriedades físico-químicas e microbiológicas da água utilizada nas explorações de leite de pequenos ruminantes na região centro, mais especificamente no distrito de Castelo Branco.

Assim, este trabalho teve como objetivo geral a avaliação da qualidade microbiológica e físico-química da água utilizada na lavagem e higienização de utensílios e equipamentos de ordenha em explorações de leite de pequenos ruminantes, fornecedores de leite de uma empresa produtora de queijo, localizada na Beira Baixa. Como objetivos específicos podemos referir: (1) Classificação das águas analisadas quanto à sua qualidade, tendo em conta o fim a que se destinam; (2) Verificação de possíveis relações entre os parâmetros físico-químicos e as fontes de

captação das águas analisadas; (3) Verificação de possíveis relações entre os parâmetros microbiológicos e as fontes de captação das águas analisadas; (4) Verificação de possíveis relações entre a presença de bactérias coliformes e de *Pseudomonas* spp.; (5) Identificação de isolados de *Pseudomonas* spp. e estudo do seu potencial como agentes envolvidos no escurecimento de queijo.

O trabalho encontra-se dividido em quatro partes. Na primeira parte é efetuada uma revisão da literatura, onde são abordados os temas pertinentes ao estudo realizado. Posteriormente, na segunda parte, é abordada a metodologia utilizada. Na terceira parte é efetuada a apresentação e discussão dos resultados e, por último, são apresentadas as considerações finais.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Qualidade da água e saúde pública

O conceito de qualidade da água é relativo, já que depende do uso a que se destina ou do seu objetivo. A qualidade da água pode definir-se como o conjunto das suas características físicas, químicas e biológicas. De acordo com a sua utilização, existe um conjunto de critérios e normas para a qualidade da água que variam com a sua finalidade, seja ela para consumo humano, para uso industrial ou agrícola, para lazer ou para a manutenção do equilíbrio ambiental (Mendes, 2010).

A qualidade da água para consumo humano é um indicador essencial para a avaliação do nível de desenvolvimento de um país e do bem-estar da população (ERSAR, 2011).

Em Portugal, a conformidade legal da qualidade da água na torneira dos consumidores é verificada regularmente, pela entidade gestora, de acordo com um Programa de Controlo de Qualidade da água (PCQA) aprovado anualmente pela entidade reguladora dos serviços de águas e resíduos (ERSAR). Nestes PCQA são definidos o número de análises a realizar ao longo do ano seguinte relativos às características organoléticas, químicas e biológicas da água, cujos valores limite estão especificados na legislação em vigor (DL nº306/2007). Este decreto indica as entidades gestoras responsáveis por disponibilizar água própria para consumo humano, devidamente controlada e com a devida qualidade. Estas entidades gestoras são as juntas de freguesia, câmaras municipais, serviços municipalizados ou empresas concessionárias.

O conceito de contaminação da água é muitas vezes apresentado para caracterizar a introdução e/ou descarga de microrganismos patogénicos ou de substâncias tóxicas na água, tornando-a imprópria para consumo público e/ou usos domésticos (Mendes, 2010).

As características químicas estão em parte relacionadas com a contaminação mineral, por sais e metais pesados, e com a contaminação orgânica, por pesticidas, hidrocarbonetos e solventes. A avaliação química da água refere-se à presença de substâncias químicas em solução e pode incluir elementos indesejáveis e/ou tóxicos. Os seus efeitos dependem principalmente das quantidades ingeridas, do tempo de exposição e da sensibilidade e fisiologia do indivíduo. Os efeitos destas substâncias estão sobretudo associados a problemas de toxicidade de longo prazo, devido a mecanismos de bioacumulação que caracterizam a maioria destes compostos não assimilados pelo organismo, podendo, alguns destes contaminantes químicos, levar ao aparecimento de cancro e mutações (Mendes e Oliveira, 2004).

A água contaminada por microrganismos patogénicos pode estar na origem de uma grande variedade de toxinfecções, as quais se manifestam normalmente através de

sintomas gastrointestinais, podendo originar surtos com efeito a curto e a médio prazo, tal como é apresentado na tabela 1. (*Arizona Department of Health Services*, 2015).

Tabela 1: Doenças de origem hídrica por via oral

Doença	Microrganismo Patogénico	Sintomas	Incubação
Adenovirose	<i>Adenovirus</i>	Diarreia	5 a 8 dias
Amebíase	<i>Entamoeba histolytica</i>	Diarreia, dor de estômago e cólicas	2 a 4 semanas
Campilobacteriose	<i>Campylobacter jejuni</i>		2 a 10 dias
Criptosporidiose	<i>Cryptosporidium</i>	Dores de estômago, desidratação, náusea, vômito, febre, perda de peso	2 a 10 dias
Cólera	<i>Vibrio cholerae</i>	Diarreia, vômitos e câibras nas pernas	2 a 5 horas
Colite enterohemorrágica	<i>Escherichia coli</i> 0157: H7	Diarreia, dor abdominal, náuseas, vômitos, febre	1 a 8 dias
Giardíase	<i>Giardia lamblia</i>	Diarreia, excesso de gases, dores de estômago, abdominais e náuseas	1 a 2 semanas
Hepatite A	Vírus da hepatite A	Febre, fadiga, dor de estômago, náuseas, urina escura	28 dias
Salmonelose	<i>Salmonella</i>	Dores abdominais, dor de cabeça, febre, náuseas, diarreia, calafrios, caibras	1 a 3 dias
Gastroenterite	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Vibrio vulnificus</i>	Náuseas, vômitos, dores de cabeça	1 a 7 dias
Gastroenterite viral	<i>Calicivirus</i>	Diarreia, vômitos, náuseas, cólicas, dor de cabeça, dores musculares, cansaço, febre ligeira	24 a 48 horas

Fonte: Adaptado de *Arizona Department of Health Services* (2015)

De acordo com o último relatório da *European Food Safety Authority* (EFSA) e do *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC), relativo às zoonoses, agentes zoonóticos e surtos de origem alimentar (incluindo a água) ocorridos em 2013 na UE, foram nove os surtos reportados em que se verificou uma forte evidência de a água ter estado na sua origem. Como agentes responsáveis por estes nove surtos foram identificados cinco diferentes patógenos: calicivirus (*Norovirus*, *Norwalk-like virus*), *Escherichia coli* verotoxigénica (VTEC) do serogrupo O128, *Cryptosporidium parvum*,

Cryptosporidium hominis e *Salmonella*. Em três dos nove surtos o agente causal não foi identificado (EFSA, 2015).

2.2. Qualidade da água utilizada na higienização de utensílios e equipamentos na sala de ordenha vs qualidade do leite

A segurança dos alimentos deve ser assegurada em todas as fases da cadeia alimentar e Vilar *et al.* (2012) referem que é na produção primária que deverá ser dado o primeiro passo. De acordo com a legislação em vigor, toda a água “...utilizada na indústria alimentar para fabrico, transformação, conservação ou comercialização de produtos ou substâncias destinadas ao consumo humano, assim como a água utilizada na limpeza de superfícies, objetos e materiais que podem estar em contacto com os alimentos, exceto quando a utilização dessa água não afeta a salubridade do género alimentício na sua forma acabada...” (DL nº 306, 2007) deverá possuir as características de uma água destinada ao consumo humano e esta é definida como “... toda aquela que no seu estado original ou após tratamento é destinada à ingestão, à confeção, à preparação de alimentos, à higiene pessoal ou a outros fins domésticos, independentemente da sua origem e de ser fornecida a partir de uma rede de distribuição, camião ou navio-cisterna, em garrafas ou outros recipientes, com ou sem fins comerciais...” (DL nº 306, 2007).

No caso dos operadores das empresas do sector alimentar que não tenham uma fonte de captação de água regularizada pelas entidades acima descritas, como é o caso da maioria dos produtores de leite, estes devem recorrer à utilização de água potável para removerem qualquer eventual contaminação da superfície dos produtos de origem animal (Reg. (CE) nº 852, 2004; Reg. (CE) nº 853, 2004).

Os produtos lácteos são especialmente propensos a contaminações por uma grande variedade de microrganismos patogénicos (Kirby *et al.*, 2003). Uma das fontes de contaminação do leite usado na transformação de produtos lácteos é a água usada para a higienização da sala de ordenha, sendo essencial que esta tenha uma qualidade equivalente à de uma água potável (Chye *et al.*, 2004). João *et al.*, (2011) refere que a água utilizada tanto para consumo, como para limpeza ou higienização dos equipamentos pode veicular agentes patogénicos aos animais e ao Homem, além de comprometer a qualidade do leite.

As principais fontes de contaminação bacteriana do leite devem-se a equipamentos e utensílios de ordenha e a equipamentos de refrigeração indevidamente higienizados. Quando a limpeza e a desinfeção dos equipamentos de ordenha são mal efetuadas dá-se uma acumulação de microrganismos, alguns potencialmente patogénicos que poderão passar para o leite (Holm *et al.*, 2004). De acordo com Lager *et al.* (2000), a contaminação bacteriana da água é muito grave na medida em que poderá afetar a saúde do rebanho.

Um estudo realizado por Perkins *et al.* (2009), relativo à relação entre a qualidade do leite e a água utilizada em explorações na região de Ontário, no Canadá, indica que a ocorrência de bactérias, tais como *E. coli* e coliformes totais em amostras de água utilizada nas lavagens dos utensílios de ordenha e tanques em explorações leiteiras resultam em contagens elevadas de bactérias no leite. Esta contaminação dá-se por meio de bactérias que ficam depositadas nos utensílios e tanques após a lavagem e que, ao entrarem em contato com o leite, prejudicam a sua qualidade. No estudo realizado por João (2009) foi verificado que a qualidade microbiológica da água utilizada no processo de higienização de equipamentos de ordenha afetou linearmente a contagem bacteriana total do leite.

Piana *et al.* (2014) referem que diversos são os pesquisadores que se têm dedicado a estudar a problemática da qualidade da água em propriedades leiteiras e, os mesmos, acreditam que a sua qualidade quando utilizada para a lavagem dos utensílios e equipamentos de ordenha é fundamental para evitar a contaminação do leite e veicular microrganismos para a glândula mamária.

Vilar *et al.* (2012) referem que a segurança dos géneros alimentícios é, principalmente, garantida através de abordagens preventivas, nomeadamente a implementação de boas práticas de higiene e a aplicação de procedimentos com base na Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controlo (HACCP). Cerf *et al.* (2011) referem que a implementação de um sistema HACCP é de difícil aplicação ao nível da produção primária, no entanto, a segurança dos alimentos pode ser obtida através de uma implementação cuidadosa de boas práticas de higiene nas explorações. Ponciano (2010) refere que a implementação de práticas higiénicas adequadas na produção e manipulação do leite e dos seus produtos é essencial.

2.3. Parâmetros de avaliação da qualidade da água

A potabilidade de uma água é determinada através da análise laboratorial de um conjunto de parâmetros físico-químicos, microbiológicos, organoléticos e radiológicos. Estas análises têm por objetivo pesquisar substâncias químicas, bem como organismos, materiais em suspensão ou em solução, que são prejudiciais à saúde do consumidor ou que demonstrem um aspeto ou qualidade organolética indesejável (Mendes, 2010).

A qualidade da água utilizada em explorações de leite, como referido anteriormente, deve obedecer aos mesmos critérios da água destinada a consumo humano, regulada pelo DL n.º 306/2007. Neste Decreto-Lei, os parâmetros de avaliação da qualidade da água estão organizados em Parâmetros de Controlo de Rotina (Controlo de Rotina 1 e Controlo de Rotina 2) e Parâmetros de Controlo de Inspeção. O Controlo de Rotina tem como objetivo fornecer, com regularidade, informações sobre a qualidade organolética e microbiológica da água destinada ao consumo humano, bem como sobre a eficácia dos tratamentos a que a água é sujeita, tendo a finalidade de

determinar a sua conformidade com os valores paramétricos estabelecidos no referido Decreto-Lei. Através do Controlo de Inspeção pode-se obter a informação necessária à verificação do cumprimento dos valores paramétricos em relação a um conjunto variável de substâncias tóxicas e indesejáveis.

De acordo com o DL nº306/2007, a água destinada ao consumo humano deve respeitar os valores paramétricos fixados nas partes I, II e III do anexo I do referido decreto-lei (Anexo I).

Tendo em conta a seleção de parâmetros que foi efetuada no âmbito da componente laboratorial deste trabalho e, de forma a tornar mais simplificada a análise dos resultados obtidos, iremos desenvolver, neste capítulo, apenas os parâmetros que foram alvo de análise laboratorial dividindo-os em dois subgrupos: parâmetros físico-químicos e parâmetros microbiológicos.

2.3.1. Parâmetros físico-químicos

As características físico-químicas da água têm grande influência na potabilidade da água. No entanto, apesar da sua importância, estes parâmetros não garantem, por si só, que a água se encontre apta para consumo, sendo necessário, para tal, respeitarem-se outras exigências, nomeadamente as que se encontram estabelecidas na legislação em vigor.

As características físico-químicas refletem as particularidades naturais da água de acordo com a sua origem e o seu percurso na natureza, estando, por vezes, associadas a riscos para a saúde humana (Mota, 2013).

Os parâmetros físico-químicos que analisámos neste trabalho foram: pH, condutividade elétrica, oxidabilidade, compostos de azoto (azoto amoniacal, azoto orgânico, nitratos e nitritos), ferro e manganês.

Potencial Hidrogeniónico

O parâmetro pH é usado, universalmente, para expressar o grau de acidez, neutralidade ou alcalinidade de uma solução, e representa a concentração de iões de hidrogénio numa solução. A escala de pH varia entre 0 e 14, sendo os valores representados numa escala logarítmica decimal.

O pH de uma água depende de diversos fatores, como a quantidade e natureza dos sais e gases dissolvidos, a formação geológica do solo que atravessa e o tipo de poluição a que está sujeita. Assim, o pH das águas superficiais varia entre 6,5 e 8,5 ao passo que o pH das águas subterrâneas varia, normalmente, entre 4,5 e 8,5, devido à variabilidade dos estratos rochosos (Sousa, 2012).

O pH constitui um indicador das características agressivas ou incrustantes que uma água pode apresentar, considerando-se agressiva uma água cujos valores de pH sejam inferiores a 6,5. As águas agressivas podem determinar processos de corrosão nas tubagens metálicas de distribuição da água, o que eventualmente se pode traduzir, posteriormente, na existência de teores elevados de alguns elementos metálicos, como é o caso do ferro e do manganês, que conferem cor à água, ou do chumbo, metal pesado que é considerado uma substância tóxica. Por sua vez, a água de carácter incrustante possui valores de pH superiores a 8, conduzindo à formação de deposições de carbonato de cálcio nas canalizações que originam a diminuição do seu diâmetro e que podem estar na origem de roturas na rede (Sousa, 2012).

Embora o pH não seja considerado um parâmetro que determina, diretamente, efeitos negativos na qualidade da água, a sua relação e influência nos outros parâmetros torna-o fundamental na apreciação da qualidade da mesma. Por outro lado, devido à influência deste parâmetro na eficiência dos processos de desinfeção, pode-se dizer que, indiretamente, também atua na eficiência desses processos (Oliveirinha, 2001).

De acordo com o DL nº306/2007, o pH é um parâmetro indicador cujo valor paramétrico se deverá encontrar entre 6,5 e 9,0, na escala de Sorensen.

Condutividade elétrica

A condutividade elétrica é a capacidade que uma solução tem de conduzir a corrente elétrica, que depende da concentração de substâncias dissolvidas ionizadas. É, normalmente, expressa em microSiemens por centímetro ($\mu\text{S}/\text{cm}$) e a medição é feita a 20°C. Trata-se de um parâmetro indicador e o seu valor, de acordo com o DL nº306/2007, não deverá exceder 2500 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

A determinação deste parâmetro constitui uma forma rápida e expedita de avaliar o teor de sólidos dissolvidos na água e a sua importância prende-se, sobretudo, com a facilidade de identificar eventuais variações no teor de sólidos dissolvidos totais, o que poderá indiciar uma potencial fonte de poluição (Mendes e Oliveira, 2004).

Uma mineralização elevada da água pode traduzir-se sob a forma de sabores desagradáveis, de processos de corrosão, ou de formação de depósitos. A condutividade afeta, com grande relevância, a água que se destina, sobretudo, para rega ou para usos industriais (Mendes e Oliveira, 2004).

Oxidabilidade

A oxidabilidade permite avaliar, de forma rápida, o teor de substâncias facilmente oxidáveis presentes na água e, assim, dar uma ideia do grau de poluição da mesma, sobretudo em termos de carga orgânica. Este parâmetro representa o consumo de oxigénio gasto na oxidação da matéria orgânica e inorgânica na forma reduzida,

presente numa determinada água. Quanto mais elevado for o valor deste parâmetro, mais pobre é a qualidade da água, e maior é a probabilidade de se desenvolverem microrganismos (Sousa, 2012).

A oxidabilidade é expressa em oxigénio (O_2), porque a quantidade de permanganato reduzido pela matéria orgânica é igual ao O_2 libertado. Este parâmetro mede, portanto, a presença de substâncias consideradas não desejáveis na água. A oxidabilidade é um parâmetro indicador e o seu valor máximo, numa água de consumo, de acordo com o DL n.º 306/2007, não deverá exceder 5 mg O_2 /L.

Compostos de azoto

O azoto encontra-se presente nas águas sob a forma de compostos azotados orgânicos (proteínas, aminoácidos e ureia) e inorgânicos (azoto amoniacal, nitritos e nitratos). Estes compostos podem ser provenientes de efluentes de origem diversa ou estarem associados a processos de lixiviação, nos solos sujeitos à aplicação de adubos azotados ou espalhamento de chorumes e de outros resíduos orgânicos (Sousa, 2012).

O azoto amoniacal é convertido, por oxidação biológica em meio aeróbio, em nitratos e depois em nitritos, que em quantidades elevadas, funcionam como poluentes das águas superficiais e subterrâneas. Águas que contenham azoto maioritariamente na forma orgânica ou amoniacal são águas que foram recentemente poluídas. Por outro lado, se predominam nitratos significa que o foco de poluição é mais antigo, uma vez que esta forma de azoto resulta da progressiva transformação do azoto amoniacal por ação dos microrganismos nitrificantes. A presença de nitratos e de nitritos pode representar um risco para a saúde pública, nomeadamente para crianças até um ano, devido ao desenvolvimento da metahemoglobinemia infantil ou cianose, bem como à potencial formação de compostos cancerígenos (Mendes e Oliveira, 2004).

De acordo com o DL n.º 306/2007, o amónio é um parâmetro indicador cujo valor paramétrico é 0,50 mg/L NH_4 . Quanto aos nitratos e nitritos, estes são parâmetros químicos cujos valores paramétricos são, respetivamente, 50 mg/L NO_3 e 0,50 mg/L NO_2 .

Ferro e Manganês

O ferro e o manganês são metais pesados que se encontram na natureza no estado sólido, nomeadamente no solo e nas rochas. A presença destes metais, embora se verifiquem pouco nas águas naturais, pode ser resultante de lixiviação dos solos, de poluição industrial e, no caso da água da rede de distribuição, da eventual corrosão das canalizações (Sousa, 2012).

São designados como “elementos indesejáveis”, contudo esta designação não está relacionada com a sua toxicidade, mas sim com alguns inconvenientes resultantes da sua presença, como sabor desagradável, coloração avermelhada, aspeto turvo,

manchas na roupa, corrosão das canalizações, formação de depósitos e neutralização dos desinfetantes (Mendes e Oliveira, 2004). Neste último caso, poderá estar em causa a eficácia do tratamento da água, devido ao conseqüente aumento do número de microrganismos.

Relativamente ao ferro, este é o segundo metal mais abundante da crosta terrestre, da qual constitui cerca de 5%. A sua concentração varia dependendo do tipo de águas. Ou seja, em águas superficiais varia entre 0,5 e 50 mg/L e em águas subterrâneas, em condições anaeróbias, com presença de ferro, a concentração varia entre 0,5 e 10 mg/L (APDA, 2012a).

O manganês é o terceiro metal mais abundante na natureza, a seguir ao alumínio e ferro, e, normalmente, surge na presença de ferro. Este metal está presente naturalmente na água, em concentrações baixas nas águas superficiais e em maior quantidade em águas com baixo teor de oxigénio, ou seja em águas subterrâneas profundas (APDA, 2013a).

O DL nº 306/2007, que estabelece o regime da qualidade da água destinada ao consumo humano, tendo por objetivo proteger a saúde humana dos efeitos nocivos resultantes da eventual contaminação dessa água, define, para estes parâmetros indicadores um valor paramétrico de 200 µg/L, para o ferro, e de 50 µg/L, para o manganês.

2.3.2. Parâmetros microbiológicos

A água, como qualquer outro componente dos sistemas naturais, encontra-se naturalmente, contaminada por numerosos e diversos microrganismos. Na sua maioria, são microrganismos inofensivos, ou seja, não representam, em geral, riscos para o homem. Contudo, a água pode ser contaminada por microrganismos patogénicos, tais como *Clostridium botulinum*, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* (Mendes e Oliveira, 2004). Desta forma, a análise microbiológica das águas destinadas a consumo humano torna-se imprescindível e tem por objetivo indicar a presença de microrganismos patogénicos agentes de doenças.

A identificação de todos os microrganismos presentes na água é praticamente impossível, a nível de rotina, uma vez que os métodos utilizados para o isolamento e quantificação são frequentemente longos, complexos e dispendiosos. De acordo com a legislação em vigor, o DL nº306/2007, os microrganismos que devem ser avaliados são: bactérias coliformes, *Escherichia coli*, enterococos, *Clostridium perfringens*, *Pseudomonas aeruginosa*, microrganismos a 22°C e microrganismos a 37°C.

Número de microrganismos a 22°C e a 37°C (colónias a 22°C e a 37°C)

Na análise microbiológica das águas para consumo, recorre-se, com frequência, à contagem de microrganismos a 22°C e à contagem de microrganismos a 37°C. Estas análises, apesar de não apresentarem significado como indicador de poluição fecal, permitem controlar a variação de microrganismos presentes, servindo, a temperatura, como fator seletivo entre os microrganismos saprófitas, cuja origem está associada ao solo (22°C), e aqueles que poderão ter origem humana ou animal (37°C).

No que diz respeito ao valor paramétrico, a legislação portuguesa refere, para estes dois parâmetros, - “Sem alteração anormal”, o que significa, segundo a mesma fonte, “... com base num histórico de análises, resultados dentro dos critérios estabelecidos pelas entidades gestoras. Quando ocorre uma alteração anormal, é desejável que a entidade gestora averigue as respetivas causas”. Refere ainda o DL nº 306/2007 que “ não é desejável que o número de colónias a 22°C e a 37°C seja superior a 100 UFC/mL e 20 UFC/100mL, respetivamente”.

Coliformes totais

A contaminação da água por bactérias do grupo coliformes é, segundo Porto *et al.* (2011), muito frequente. Este grupo é constituído por bactérias da família *Enterobacteriaceae* e inclui os coliformes fecais e os coliformes não fecais. Os primeiros são habitantes do aparelho intestinal do homem e de outros animais homeotérmicos (*Escherichia coli*), enquanto os segundos não estão limitados a origens fecais, pois podem ser saprófitas, que proliferam no solo, ou estar associados a plantas (*Enterobacter aerogenes*, *Erwinia*, *Klebsiella*) (Mendes, 2010).

São bacilos Gram-negativos, não esporulados, apresentam reação oxidase negativa, são aeróbios ou anaeróbios facultativos, capazes de crescer na presença de sais biliares e normalmente, fermentam a lactose a 37°C, com a produção de ácido e gás (Fernandes, 2014).

Estas bactérias, não sendo os melhores indicadores da presença de microrganismos patogénicos de origem seguramente fecal, constituem, contudo, um bom indicador do estado de higienização e de integridade dos sistemas de distribuição e da presença potencial de biofilmes (Abelho, 2010).

A legislação define um valor paramétrico para coliformes totais de 0/100mL de água (DL nº306/2007).

Escherichia coli

A *Escherichia coli* (*E. coli*) é um microrganismo pertencente ao sub-grupo dos coliformes fecais devido à sua origem exclusivamente fecal. Produz indol em caldo de triptofano e dá uma reação positiva para o teste do vermelho de metilo. Fermenta, normalmente, a lactose com produção de ácido e de gás, em 24 horas, quer a 37°C quer

a 44°C. Pelo facto de se multiplicar à temperatura de 44°C é designado por termotolerante, característica que não é partilhada pelos coliformes não fecais (APDA, 2012b).

Este é um dos microrganismos mais usados como indicador de falta de higiene devido à sua origem fecal. O trato intestinal dos animais homeotérmicos, nos quais se inclui o ser humano, é uma fonte natural de *E. coli* e, portanto, virtualmente, todos os humanos e animais domésticos saudáveis apresentam esta bactéria na flora do seu intestino (na ordem de aproximadamente 10⁵ UFC por grama de fezes). Apesar de a maioria das bactérias desta espécie ser inofensiva, apresentando uma relação de comensalismo com o intestino de humanos e animais (CDC, 2010; Adams e Moss, 2008), alguns serogrupos de *E. coli* são patogénicos, sendo responsáveis pela produção de toxinas que originam diarreias, encontrando-se também associados a infeções urinárias e intestinais (EFSA, 2015).

A temperatura da água e as concentrações de nutrientes não são, nas redes de distribuição, geralmente suficientes para favorecer a multiplicação da *E. coli* na forma planctónica ou em biofilmes, pelo que a sua presença fornece uma clara evidência de poluição fecal recente e dá indicação de que poderão estar presentes microrganismos patogénicos de origem fecal, tais como protozoários, bactérias e vírus (APDA, 2012b).

A legislação define um valor paramétrico para *Escherichia coli* de 0/100 mL de água (DL n.º306/2007).

Enterococos intestinais

Os enterococos intestinais constituem um subgrupo dentro do grupo dos estreptococos fecais, compreendendo espécies do género *Enterococcus* (APDA, 2012e). Caracterizam-se pela alta tolerância às condições adversas de crescimento, como a capacidade de sobreviverem na presença de 6,5% de cloreto de sódio (halotolerantes), em pH 9,6 e numa ampla faixa de temperatura, de 10° a 45°C (Duarte, 2011).

De acordo com APDA (2012e), são bactérias Gram-positivas, anaeróbias facultativas e ocorrem isoladamente, em pares ou em cadeias curtas. A maioria das espécies não se multiplica em ambientes aquáticos. O número de enterococos intestinais em fezes humanas é, geralmente, numa ordem de grandeza menor do que a de *E. coli* e tendem a sobreviver mais tempo em ambientes aquáticos, sendo mais resistentes à desinfeção por cloro.

Os enterococos fecais não são, geralmente, considerados patogénicos, no entanto algumas estirpes de *Enterococcus faecalis* estão associadas a infeções humanas (Mendes e Oliveira, 2004). Dada a origem fecal deste grupo de microrganismos, a sua presença na água poderá indicar a contaminação da mesma por microrganismos patogénicos de elevado risco para a saúde pública.

Em águas salobras (pH alcalino) e salinas verifica-se que a taxa de morte dos enterococos fecais é mais reduzida que a dos coliformes fecais, sendo, nestas águas,

indicadores mais credíveis que os coliformes fecais (Mendes e Oliveira, 2004). Para além deste aspeto, e de acordo com Kinzelman *et al.* (2003), os enterococos apresentam uma melhor correlação com doenças gastrointestinais do que os coliformes termotolerantes.

A legislação define um valor paramétrico para enterococos intestinais de 0/100mL de água (DL 306/2007).

Clostridium perfringens

São bactérias em forma de bacilo, Gram-positivas, anaeróbias estritas, sulfito-redutoras e produtoras de esporos (Mendes e Oliveira, 2004).

Trata-se de um indicador de contaminação hídrica de origem fecal, remota ou intermitente, devido aos longos períodos de permanência da água e de resíduos sedimentáveis, contendo esporos, em órgãos do sistema de armazenamento e distribuição, às condições de sobrevivência dos seus esporos, e também devido ao facto de não se multiplicarem na maioria dos ambientes aquáticos (APDA, 2012d).

Clostridium perfringens é comum no trato intestinal do homem e de outros animais de sangue quente, encontrando-se largamente distribuído na natureza, principalmente no solo e em águas contaminadas com fezes. Os seus esporos são excepcionalmente resistentes a condições ambientais aquáticas adversas, incluindo radiação ultravioleta, temperatura e pH extremos e processos de desinfeção, tal como a cloragem, podendo sobreviver nesta forma por longos períodos (APDA, 2012d).

A legislação portuguesa define um valor paramétrico para *Clostridium perfringens* de 0/100mL de água. É, ainda, referido que, caso se verifique um incumprimento deste parâmetro, deve-se investigar todo o sistema de abastecimento para identificar existência de risco para a saúde humana devido à provável presença de outros microrganismos patogénicos como, por exemplo, o protozoário *Cryptosporidium* (DL nº 306/2007).

Pseudomonas aeruginosa

O género *Pseudomonas*, é caracterizado por bacilos aeróbios estritos, Gram-negativos, oxidase positivos e catalase positivos. A sua mobilidade é assegurada por um ou vários flagelos polares e são organismos quimiotróficos. Não fermentam carboidratos, utilizando grande variedade de compostos orgânicos como fonte de carbono. Produzem pigmentos fluorescentes e piocianina, embora algumas estirpes sejam apiocianogénicas.

Pseudomonas é um microrganismo envolvido na contaminação da água, cujas espécies estão distribuídas no solo, na água, em matéria orgânica em decomposição, podendo ser isoladas da pele, garganta e fezes de pessoas doentes e em indivíduos saudáveis de 3% a 5%.

As bactérias *Pseudomonas*, por produzirem pigmentos hidrossolúveis, enzimas proteolíticas, lipolíticas e pectolíticas (em algumas espécies), destacam-se como agentes deteriorantes na contaminação de alimentos e água.

Ps. aeruginosa, que normalmente cresce a temperaturas altas, entre 37°C e 41°C, é uma bactéria patogénica oportunista que, no entanto, raramente causa doença em indivíduos saudáveis. Apresenta elevada resistência a antibióticos, desinfetantes e biocidas (Mendes e Oliveira, 2004). Esta espécie está intimamente relacionada com quadros de infeção hospitalar, devido à sua resistência natural a diversos antibióticos amplamente usados, e pela produção de substâncias tóxicas ao homem. Em pacientes hospitalizados, a taxa de portadores pode ser bastante elevada.

Outras espécies que fazem parte deste género são *Ps. fluorescens*, *Ps. putida* e *Ps. syringae*.

Listeria monocytogenes

Listeria monocytogenes é um bacilo móvel Gram-positivo, não formador de esporos, anaeróbio facultativo, com a temperatura ótima de desenvolvimento entre os 30-35°C e a temperatura mínima de 4°C (bactéria psicotrófica). É um microrganismo omnipresente no ambiente ao qual o homem é exposto frequentemente (Donnelly, 2001), podendo ser encontrado no solo, matéria vegetal, fezes dos animais, silagem e na água (Nogva *et al.*, 2000). O consumo de alimentos e água contaminados por esta bactéria está na origem da doença zoonótica designada listeriose que, apesar de estar associada a uma baixa morbilidade, apresenta uma elevada mortalidade (20-40%), ocorrendo, sobretudo, em grupos de risco bem definidos, como grávidas e os seus fetos, recém-nascidos, idosos e adultos com um sistema imunitário deprimido, por medicação ou doença crónica. Os sintomas aparecem entre 4 dias a algumas semanas e podem variar de sintomas moderados, tipo gripe e diarreia, a graves como septicemia, meningoencefalites e abscessos, podendo a infeção durar dias a semanas. Em grávidas a infeção pode chegar ao feto, que pode nascer muito doente ou morrer no útero, resultando um aborto. As infeções humanas são raras, mas a doença é, muitas vezes, severa e a mortalidade alta, principalmente em populações de risco. Este organismo está entre as principais causas de morte por infeções de origem alimentar em países industrializados (Viegas, 2009).

Trata-se de um microrganismo muito resistente à deterioração pela congelação, desidratação e calor. Considera-se que, a maior fonte de contaminação se processe através do consumo de alimentos contaminados, sendo que os alimentos associados têm sido leite cru, queijos, gelados, vegetais crus, salsichas, aves cozinhadas ou cruas, carnes cruas e peixe cru ou fumado. Porém a infeção pode ser transmitida, diretamente, de animais infetados ao Homem, ou entre estes. Esta bactéria multiplica-se a temperaturas baixas, 2-4°C, o que torna a ocorrência em alimentos prontos a consumir com relativamente longo tempo de prateleira um problema particular (Viegas, 2009).

3. Material e Métodos

Este capítulo aborda os diversos aspetos metodológicos equacionados no sentido de procurar alcançar os objetivos propostos, incluindo a caracterização da queijaria e explorações leiteiras, recolha da amostra, descrição das análises físico-químicas e microbiológicas e tratamento estatístico.

3.1. Caracterização da queijaria e explorações leiteiras

Este trabalho teve o apoio de uma empresa de lacticínios, situada na Beira Baixa, cuja atividade principal se prende com a produção de queijo artesanal, característico da região, a partir de leite cru de ovelha e de cabra. Esta unidade produtora emprega 30 funcionários e labora aproximadamente 2 000 000 kg de leite/ano. Encontram-se agregados a esta indústria cerca de 40 produtores de leite de pequenos ruminantes, cujas explorações são maioritariamente de índole familiar e que trabalham com efetivos de 50 a 500 animais. O leite é recolhido por um camião cisterna nas explorações dos produtores de leite de ovelha e cabra em dias específicos. Alguns produtores efetuam, eles próprios, a entrega da matéria-prima na queijaria em bilhas de inox.

Na maioria das explorações são efetuadas duas ordenhas por dia e em 67% dos casos a ordenha é manual. Durante este processo são utilizadas bilhas, caldeiros ou ferradas (recipientes de inox) para transportar o leite ao tanque de armazenamento, refrigerado a uma temperatura de aproximadamente 4°C, onde fica até à sua recolha e transporte para a queijaria.

Nas restantes explorações (8 das 24 analisadas) é utilizada a ordenha mecânica. Neste caso o leite é retirado do úbere do animal mediante sucção por vácuo e é conduzido através de um circuito fechado diretamente para o tanque de armazenamento.

3.2. Colheita das amostras

As amostras de água analisadas foram colhidas em 24 explorações de produtores de leite de pequenos ruminantes, localizadas no distrito de Castelo Branco, mais concretamente nos concelhos de Belmonte, Covilhã, Fundão, Castelo Branco e Proença-a-Nova (Figura 1).



Figura 1: Localização das explorações produtoras de leite onde foi realizada a colheita das amostras de água

A seleção dos 24 produtores foi feita de entre um total de 40 produtores que fornecem habitualmente a queijaria, tendo por base a proveniência da água, de forma a possuir amostras das várias origens, e a facilidade na colheita, pois das várias rotas que eram efetuadas para a recolha foram tidas em consideração as rotas que permitiam um maior número de colheitas de amostra por volta. Assim sendo, trata-se de uma amostragem não probabilística, efetuada por conveniência.

A colheita das amostras de água foi efetuada nas várias explorações que foram visitadas aquando do acompanhamento do funcionário da queijaria responsável pela recolha do leite no camião cisterna.

Foram colhidas 47 amostras de água provenientes de diferentes origens, nomeadamente de furo (n=16), rede pública (n=14), nascente (n=9), mina (n=4), poço (n=2) e barragem (n=2) (Tabela 2), sendo que estas foram colhidas e analisadas em duas alturas diferentes do ano (maio/junho e outubro/novembro), à exceção de um produtor em que apenas foi possível efetuar uma colheita.

Para além da origem das amostras de água analisadas, a tabela 2 apresenta, ainda, se estas sofreram, ou não, tratamento e caracteriza, sumariamente, a exploração onde essa água é usada. Neste caso é feita referência ao tipo de leite produzido (ovelha ou cabra) e ao tipo de ordenha (manual ou mecânica) usada na exploração.

Tabela 2: Origem das amostras de água analisadas

Origem da água	Produtor	Leite	Ordenha	Tratamento Água	Nº de amostras (n)
Águas da rede pública (n=14)					
Rede Pública	9	Ovelha	Manual	Sim	2
Rede Pública	11	Ovelha	Manual	Sim	2
Rede Pública	12	Ovelha	Manual	Sim	2
Rede Pública	15	Cabra	Mecânico	Sim	2
Rede Pública	16	Cabra	Mecânico	Sim	2
Rede Pública	18	Cabra	Manual	Sim	2
Rede Pública	20	Cabra	Manual	Sim	2
Águas subterrâneas com tratamento (n=2)					
Poço	8	Cabra	Manual	Sim- cloro	2
Águas subterrâneas sem tratamento (n=29)					
Furo	1	Ovelha	Manual	Não	2
Furo	6	Ovelha	Manual	Não	2
Furo	7	Ovelha	Mecânico	Não	2
Furo	10	Ovelha	Manual	Não	2
Furo	14	Ovelha	Manual	Não	2
Furo	17	Cabra	Mecânico	Não	2
Furo	19	Cabra	Mecânico	Não	2
Furo	21	Ovelha	Mecânica	Não	2
Nascente	2	Ovelha	Mecânico	Não	2
Nascente	3	Ovelha	Manual	Não	2
Nascente	22	Cabra	Manual	Não	1
Nascente	23	Cabra	Mecânico	Não	2
Nascente	24	Cabra	Manual	Não	2
Mina	4	Ovelha	Manual	Não	2
Mina	5	Ovelha	Manual	Não	2
Águas superficiais sem tratamento (n=2)					
Barragem	13	Ovelha	Manual	Não	2

A colheita da amostra exige o maior cuidado possível, pois os resultados analíticos e posterior interpretação podem ser afetados pelo modo como esta é realizada (ISO 19458:2006).

Assim, as amostras foram colhidas diretamente da torneira mais próxima da sala do tanque de refrigeração de leite, dado que seria essa a água a ser utilizada para a lavagem dos equipamentos e utensílios da sala de ordenha.

Para a recolha das amostras de água foram utilizados frascos descartáveis de polietileno esterilizados e munidos de uma etiqueta onde foi registada a identificação da amostra, a identificação do produtor, tipo de amostra, local da colheita, data e hora da colheita e se sofreu tratamento com cloro. No caso das águas tratadas com cloro, a colheita foi realizada para um frasco contendo tiosulfato de sódio (1,75mg /L) para garantir a neutralização do cloro residual.

Tal como indicado no protocolo da ESACB (2007) para uma recolha asséptica, foram realizados os seguintes passos:

- a) Desmontar os acessórios da torneira, caso existam, e deixar correr a água durante 5 minutos;
- b) Fechar a torneira e proceder à sua esterilização por flamejamento;
- c) Deixar correr novamente a água, para que sejam arrastadas as películas queimadas, durante 3-5 minutos;
- d) Com a água já regularizada, destapar rapidamente o frasco e, inclinándolo ligeiramente para evitar a contaminação com poeiras do ambiente, enchê-lo a cerca de 2/3 do seu volume para permitir uma correta homogeneização;
- e) Fechar de imediato o frasco.

Após a colheita, as amostras foram acondicionadas numa mala isotérmica, provida de termoacumuladores de frio, e transportadas em condições de refrigeração, desde a colheita até à chegada ao laboratório, tendo sido analisadas no Laboratório de Microbiologia e no Laboratório de Águas e Águas Residuais da Escola Superior Agrária de Castelo Branco no mesmo dia da colheita.

3.3. Descrição das análises físico-químicas

Para a realização das análises físico-químicas foi tido em consideração o DL n.º306/2007, pois, segundo o mesmo, estas águas, como as águas de consumo humano, deverão ter em conta os VP estabelecidos neste DL.

Os parâmetros físico-químicos selecionados para análise foram o pH, a condutividade elétrica, a oxidabilidade, os compostos de azoto e ainda o ferro e o manganês. Na tabela 3 encontram-se indicados os parâmetros físico-químicos analisados com os respetivos métodos analíticos utilizados. Foram seguidos os procedimentos descritos em *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (SMEWW), com algumas adaptações.

Tabela 3: Parâmetros físico-químicos analisados e respectivos métodos analíticos

Parâmetros	Métodos Analíticos	Unidades
pH	Potenciometria	Escala de Sorensen
Condutividade elétrica	Electrometria	μS/cm a 20°C
Oxidabilidade	Volumetria com permanganato de potássio	mg/L O ₂
Azoto Amoniacal	SMEWW ⁽¹⁾ 418	mg/L NH ₄
Nitratos Nitritos	SMEWW 419	mg/L NO ₃ e NO ₂
Azoto orgânico	SMEWW 4500 B	mg/L
Ferro	SMEWW 3111 Espectrofotometria de absorção atômica em chama	μg/L Fe
Manganês	SMEWW 3111 Espectrofotometria de absorção atômica em chama	μg/L Mn

⁽¹⁾ SMEWW - *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*

Potencial hidrogeniônico

Para a determinação do pH, procedeu-se à calibração prévia do potenciómetro (Crison, pH-meterBASIC 20+) com soluções padrão de pH=7, pH=4 e pH=9, de acordo com as instruções do aparelho. De seguida foi efetuada a lavagem do eléctrodo com água destilada. A amostra de água de cada produtor foi colocada num gobelé, emergindo no mesmo o eléctrodo. Por último, foi efetuada a leitura e registado o respetivo valor (Anexo II).

Condutividade elétrica

O condutímetro (Inolab, modelo COND level1) deve ser ligado trinta minutos antes da utilização, pelo que foi o procedimento adotado. De seguida a sonda do condutímetro foi lavada com água destilada. Colocou-se a amostra de água de cada produtor num gobelé e colocou-se a sonda dentro do gobelé com a amostra. Por último, foi efetuada a leitura e registado o respetivo valor (Anexo III).

Oxidabilidade a Quente

A determinação deste parâmetro é realizada com a oxidação química de matérias orgânicas e substâncias oxidáveis por meio do permanganato de potássio, em meio ácido e a quente.

Para a sua determinação foi efetuada uma medição de 100 ml de amostra para um Erlenmeyer, e, em paralelo, realizou-se um ensaio em branco que continha todos os reagentes da amostra, substituindo apenas o volume da amostra por água destilada. De seguida, foram adicionados 10 mL de ácido sulfúrico a 1:3 e 5 mL de solução de permanganato de potássio. Após a adição procedeu-se à agitação da preparação, levando-a à ebulição durante 10 minutos. Posteriormente, foram retiradas da placa de aquecimento e arrefecidas rapidamente com água. Juntou-se 5 mL de ácido oxálico e procedeu-se à agitação da preparação até desaparecer a cor púrpura. Por último, procedeu-se à titulação com permanganato de potássio até ao aparecimento de cor rosa ténue, registando-se o volume do titulante gasto.

Um esquema com o procedimento referido encontra-se no Anexo IV.

Compostos de Azoto

O azoto é um elemento relacionado com os processos vitais, estando presente nos esgotos domésticos, principalmente sob a forma de azoto orgânico (N-org) e em menor quantidade em formas inorgânicas, nomeadamente o azoto amoniacal (N-NH₃), Nitritos (N-NO₂) e Nitratos (N-NO₃). Através da soma destes elementos obtemos o azoto total.

Uma vez que se pretendeu determinar e analisar as várias formas do azoto, encontra-se, abaixo, o procedimento que foi utilizado para a determinação das mesmas. Um esquema com o procedimento completo encontra-se no Anexo V.

Azoto Amoniacal (I)

Para a determinação deste elemento foi colocado 100ml de amostra num frasco de kjeldahl. Se for necessário deve ser efetuada uma diluição, utilizado o volume de amostra adequado, e diluir para 100mL ou 500 mL com água desionizada. Caso exista, deve-se remover o cloro residual, utilizando uma proporção conveniente de agente de descloragem, equivalente ao do cloro residual presente. Se necessário, deve-se neutralizar a amostra (pH=7) com NaOH ou H₂SO₄(1N). De seguida, adicionar 5 mL de solução tampão.

Após o ajuste de novo do pH a 9,5 com NaOH (6N), destilou-se a amostra através de um destilador (Kjeltec System 1026 distilling unit). Recolheu-se aproximadamente 100 mL de destilado num Erlenmeyer, contendo 25 mL de ácido bórico e, por fim, titulou-se o destilado com uma solução de H₂SO₄ (0,02N), até à viragem de cor para púrpura, a mesma cor inicial. Registou-se o volume gasto e procedeu-se aos cálculos.

Nitratos+Nitritos (II)

Para a determinação dos nitratos e nitritos, ao resíduo da destilação anterior (destilação I) procedeu-se à adição de 0,5g da liga Devarda, tendo sido, posteriormente, destilado novamente. De seguida, foram recolhidos 100 mL de destilado, num Erlenmeyer, contendo 20 mL de ácido bórico e procedeu-se à titulação do destilado com a solução de H₂SO₄ (0,02 N), até à viragem de cor para púrpura (a cor inicial). Por último, foi registado o volume gasto.

Azoto Orgânico (III)

Tal como anteriormente, para determinar o azoto orgânico, foi utilizado o resíduo da destilação anterior (destilação II), num Erlenmeyer de 500 mL, e procedeu-se à adição de 50 mL do reagente de digestão. De seguida, a amostra foi levada à ebulição (dentro da hotte) até se obter uma cor amarela clara, tendo, posteriormente, permanecido em ebulição por mais 30 minutos. Após este período, esperou-se até a amostra arrefecer e procedeu-se à junção de 0,5 mL de fenolftaleína, tendo sido, posteriormente, diluída com água destilada até 150 mL.

Adicionou-se 50 mL de solução de hidróxido de tiosulfato de sódio e levada ao destilador, recolhendo-se 100mL do destilado num Erlenmeyer que continha 20 mL de ácido bórico. Por último, foi procedida à titulação do destilado com a solução de H₂SO₄ (0,02 N), até ocorrer a viragem de cor para púrpura e registado o volume do titulante gasto.

Ferro e Manganês

Para a determinação destes elementos foi adicionado, em 50 mL da amostra, 6mL de HCl concentrado e 2mL de HNO₃ concentrado, tendo a amostra permanecido dentro da hotte com os dois ácidos tapados com parafilme, durante 12h. Posteriormente, os tubos foram colocados no suporte do digestor e tapados com um vidro de relógio, para evitar perdas. Posteriormente, o aparelho foi ligado e deixou-se correr o programa durante 2 horas a uma temperatura de 150°C. Terminado o programa, o aparelho foi desligado e deixado arrefecer. De seguida, foi levantado o vidro de relógio e lavado com um esguicho que continha água ultra pura para recolher eventuais perdas para dentro do tubo. Por fim, procedeu-se à filtração com um filtro de pregas, elaborado com papel de filtro nº42, para um balão de 100mL, lavando sempre o tubo onde a amostra digeriu com água ultra pura, perfazendo até aos 100 mL.

Após a digestão, as leituras foram efetuadas mediante a utilização de um espectrofotómetro de absorção atómica (Thermo Scientific, ice 3000 séries).

Um esquema com o procedimento referido encontra-se no Anexo VI.

3.4. Descrição das análises microbiológicas

Para a realização das análises microbiológicas, foi tido em consideração o DL 306/2007, pois, segundo o mesmo, estas águas, como as águas de consumo humano, deverão ter em conta os VP ou recomendados, estabelecidos neste DL. Assim, procedeu-se à contagem de bactérias coliformes, *Escherichia coli*, enterococos intestinais, *Clostridium perfringens*, *Pseudomonas aeruginosa* e microrganismos a 22°C e a 37°C. Na tabela 4 encontram-se indicados os métodos analíticos que foram seguidos para a análise das amostras de água relativamente aos parâmetros microbiológicos acima referidos.

Pontualmente, foi, ainda, efetuada a pesquisa de *Listeria monocytogenes* numa amostra de água e em amostras ambientais de uma exploração que teve, na altura da realização deste trabalho, um resultado positivo para a pesquisa de *L. monocytogenes* em leite cru. Com estas análises pretendeu-se verificar a possível origem deste microrganismo patogénico a partir da água.

Tabela 4: Parâmetros microbiológicos e respetivos métodos analíticos

Parâmetros	Métodos analíticos	Expressão dos resultados
Microrganismos a 22°C	NF EN ISO ⁽¹⁾ 6222-1999	UFC/mL
Microrganismos a 37°C	NF EN ISO 6222-1999	UFC/mL
Bactérias coliformes	NF EN ISO 9308-1:2000	UFC/100 mL
<i>Escherichia coli</i>	NF EN ISO 9308-1:2000	UFC/100 mL
Enterococos intestinais	NF EN ISO 7899-2:2000	UFC/100 mL
<i>Clostridium perfringens</i>	National Standard Methods - HPA, referência nº W 5i3.1	UFC/100 mL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NF EN 12780:2002	UFC/100 mL
<i>Listeria monocytogenes</i>	ISO 11290-1:1996	Presença ou ausência em 25 mL

⁽¹⁾Norme Française (NF) Norme Européenne (EN) International Organization for Standardization (ISO)

De acordo com o DL nº306/2007, a contagem de *Pseudomonas aeruginosa* é apenas obrigatória para as águas engarrafadas, no entanto optámos por incluir esta análise na segunda fase de colheitas de amostra uma vez que alguns estudos têm vindo a demonstrar que esta bactéria, bem como outras do mesmo género, podem ser

veiculadas pela água e, numa situação de deficientes condições de tratamento da água e de higienização dos utensílios e equipamentos na sala de ordenha, pode contaminar o leite e os produtos lácteos. De acordo com Leriche e Fayolle (2012), a perda de qualidade devido à multiplicação destas bactérias no queijo pode traduzir-se por alterações do aspeto, textura, *flavor* e aroma, as quais têm como consequência elevadas perdas económicas.

Excetuando a contagem de microrganismos a 22°C e a 37°C e a pesquisa de *L. monocytogenes*, as análises aos restantes parâmetros foram realizadas usando o método das membranas filtrantes. Esta técnica tem maior grau de precisão que a técnica dos tubos múltiplos e podem examinar-se volumes maiores de amostra. A sua utilização permite a redução no tempo para a preparação de material e meios de cultura, economia de espaço nas estufas incubadoras e redução no tempo requerido para as operações de sementeira, leitura e repicagem de culturas, conseguindo-se, deste modo, resultados em tempos inferiores em relação à técnica dos tubos múltiplos.

Este método baseia-se na filtração de volumes de água através de membranas com um diâmetro de 47 mm e porosidade de 0,45 µm, suficiente para reter os microrganismos em análise.

A rampa utilizada para a determinação dos parâmetros analisados apresenta 6 saídas para ligação a 6 copos de filtração. Antes de iniciar a filtração, as torneiras que comunicam com as unidades de filtração devem ser colocadas na posição fechada.

Sobre o porta - filtro colocou-se a membrana de 0,45 µm, utilizando, para o efeito, uma pinça esterilizada e de pontas planas para não danificar a membrana. De seguida, um copo, previamente esterilizado, foi desembulhado em condições de assepsia e colocado cuidadosamente sobre a membrana.

Procedeu-se, posteriormente, à filtração da amostra (100 mL por parâmetro). Através de pressão negativa, a amostra, vertida no copo, passa através da membrana, ficando os microrganismos retidos.

Para cada amostra de água diferente usou-se uma nova unidade de filtração esterilizada.

No final das análises o equipamento de filtração foi lavado usando para o efeito lixívia diluída a 10%, que se filtra tal como se tratasse de uma amostra, mas sem a utilização da membrana.

O método descrito aplicou-se à contagem de enterococos intestinais, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium perfringens*, coliformes e *E. coli* e encontra-se ilustrado na Figura 2.



Figura 2: Etapas do processo de filtração por membrana

Os meios de cultura e reagentes utilizados para a realização das análises mencionadas anteriormente encontram-se descritas no Anexo VII.

Microrganismos a 22°C e a 37°C: NF EN ISO 6222:1999

Entende-se por microrganismo a 22°C e a 37°C toda a bactéria aeróbia, levedura ou bolor capaz de formar colónias às temperaturas referidas, no meio de cultura sólido com extrato de levedura (Biokar, ref^a BK 153HA).

Para a sua determinação pipetou-se, para duas placas de Petri, 1mL e 0,1 mL da amostra e juntou-se aproximadamente 15 mL de meio de cultura sólido com extrato de levedura (Biokar, ref^a BK153HA). Homogeneizou-se o inóculo com o meio de cultura e deixou-se solidificar, colocando-se posteriormente, a parte superior das placas voltada para baixo. Por fim, foi realizada a incubação: duas placas (a de 1mL e 0,1mL) durante 48 horas a 37 °C e as outras duas placas durante 72 horas a 22°C. Após o período de incubação, contaram-se as colónias desenvolvidas em cada placa.

Um esquema com o procedimento referido encontra-se no Anexo VIII.

Bactérias coliformes e *E. coli*: NF EN ISO 9308-1:2000

Para a preparação da amostra foram seguidas as instruções das normas ISO 8199:2005 e ISO 6887-1:1999. Assim, utilizando uma pinça estéril, colocou-se, assepticamente, a membrana filtrante sobre o porta-filtro da unidade de filtração, com a face quadriculada voltada para cima. De seguida, colocaram-se os copos de suporte e, depois da amostra bem homogeneizada, verteu-se 100ml desta no copo da rampa de filtração e filtrou-se. Com a ajuda de uma pinça esterilizada retirou-se a membrana e colocou-se no meio Tergitol 7 Agar (BIOKAR, ref^a BK123HA) com suplemento TTC

(BIOKAR, ref^aBS02608). Incubou-se a $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 21 ± 3 horas e, nos casos em que não se observava crescimento, incubou-se mais 24 horas a 44°C , pois podem estar presentes bactérias termotolerantes. Após o período de incubação, procedeu-se à contagem das colónias típicas, as quais são amarelas devido à fermentação da lactose (Figura 3)



Figura 3: Colónias típicas de bactérias coliformes no meio Tergitol 7 Agar

Dessas colónias foram repicadas, pelo menos, uma colónia de cada tipo morfológico. Nos casos em que o número de colónias era inferior a 10, repicaram-se todas para um meio não seletivo, *Tryptic Soy Agar* (TSA) (BIOKAR, ref^aBK031HA). A partir de cada colónia repicada e crescida neste meio, fez-se o teste da oxidase, com o reagente oxidase (N,N,N',N''- Tetramethyl-1,4-phenylene-diammonium dicloride (1%))(Merck, ref^a 8.21102.0010). As colónias que revelaram uma resposta oxidase negativa confirmam-se como coliformes totais e foram depois repicadas para tubos contendo caldo Triptofano (BIOKAR, ref^aBK163HA) e incubadas a $44^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ durante 21 ± 3 horas, para verificar se se trata de bactérias coliformes da espécie *E. coli*.

A formação de indol (um dos produtos resultantes de degradação metabólica do triptofano) observa-se se houver formação de uma cor vermelha à superfície do caldo de Triptofano (Figura 4), após a adição de 0,2 a 0,3 ml de reagente Kovacs (LIOFILCHEM, ref^a 80271). São consideradas bactérias *E. coli* todas as oxidase-negativa e indol-positivo.

Um esquema com o procedimento completo encontra-se no Anexo IX.

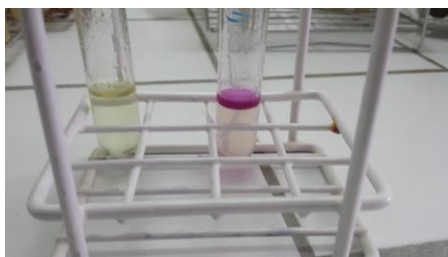


Figura 4: Confirmação da produção de indol por culturas de *E. coli*.

À direita uma reação indol-positiva e à esquerda uma reação indol-negativa

Enterococos intestinais: NF EN ISO 7899-2:2000

Para a preparação da amostra foram seguidas as instruções da ISO 8199:2005 e da ISO 6887-1:1999. Assim, filtraram-se 100mL da amostra e colocou-se o filtro sobre a superfície do meio *Slanetz and Bartley Agar* (BIOKAR, ref^a BK037HA), tendo o cuidado de não deixar bolhas entre a membrana e a superfície do meio.

Após a sementeira foram colocadas na estufa a $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 44 ± 4 horas. Após o período de incubação observou-se a presença de colónias características de enterococos, as quais apresentavam cor vermelha, castanha ou rosa e forma convexa. Procedeu-se depois à sua confirmação, transferindo a membrana, com a ajuda de uma pinça esterilizada, para uma placa contendo o meio de cultura *Bile Esculin Agar* (BIOKAR, ref^a BK158HA), e incubou-se durante 2 horas a 44°C .

Os enterococos desenvolvem-se sobre este meio e hidrolisam a esculina, originando um produto final que se combina com os iões ferro para dar um composto de coloração negra que se difunde no meio (Figura 5).

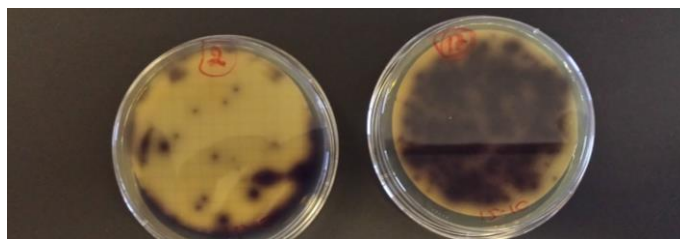


Figura 5: Enterococos confirmados no meio *Bile Esculin Agar*

Um esquema com o procedimento completo encontra-se no Anexo X.

Clostridium perfringens: Standard Method HPA W5i3.1:2005

Após a filtração da amostra, colocou-se a membrana numa placa com meio de cultura TSC Agar (BIOKAR, ref^a BK031HA) e D-cicloserina (BIOKAR, ref^a BS00608). A D-cicloserina inibe o crescimento da flora contaminante e reduz a dimensão dos halos negros em torno das colónias. De seguida, incubou-se a $44^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 21 ± 3 horas em condições de anaerobiose.

As colónias características podem ser pretas, cinzentas ou amarelo acastanhado. Para proceder à confirmação, repicam-se as colónias para duas placas de Agar Sangue (Biomérieux, ref^a 43041), incubando uma em anaerobiose e outra em aerobiose. Se houver crescimento em aerobiose, o resultado é negativo, caso exista crescimento em anaerobiose repica-se parte da colónia para o meio de Lactose Gelatina (Himedia, ref^a M9871) e para o meio de Nitrato Mobilidade (Himedia, ref^a M6301), previamente

regenerados, introduzindo-os num banho de água fervente, durante 15 minutos e arrefecidos de imediato em banho de gelo.

O meio de Lactose Gelatina permite verificar a fermentação da lactose e a liquefação da gelatina. Depois de incubado a $36^{\circ}\text{C} \pm 2$ durante 21 ± 3 horas em anaerobiose, a fermentação da lactose com produção de ácido vê-se pela mudança de cor para amarelo e a utilização da gelatina verifica-se se o meio se apresentar liquefeito. Os tubos que apresentam as características atrás referidas são colocados no frigorífico, a uma temperatura de $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ durante 1-2 horas. Caso o meio se mantenha líquido ao fim do tempo referido, considera-se o resultado positivo, pois o *Clostridium perfringens* liquefaz a gelatina.

A mobilidade é observada no meio de Nitrato Mobilidade, previamente inoculado por picada. Após incubação, a $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 21 ± 3 horas em condições de anaerobiose, se o crescimento se verificar só ao longo da picada, o microrganismo em estudo é considerado imóvel e, neste caso, avança-se para o teste de nitratos. Neste meio faz-se a pesquisa de redução de nitratos a nitritos, adicionando, em cada tubo, 0,2 mL e 0,5 mL dos reagentes Nit 1 e Nit 2, respetivamente. Se verificarmos uma coloração vermelha confirma-se a redução de nitratos a nitritos, ou seja, a reação foi positiva.

Contrariamente, se não for detetada alteração de cor, adiciona-se o pó de zinco e, se após alguns instantes, se observar mudança de cor para vermelho a reação é negativa. Por outro lado, se não existir alteração de cor a reação é positiva, ou seja, os nitratos foram reduzidos a nitritos e estes passaram a amoníaco, sendo, desta forma, confirmada a presença de *Clostridium perfringens* na amostra analisada.

Uma cultura confirma-se como *Clostridium perfringens* se for hemolítica, anaeróbia estrita, imóvel, reduzir os nitratos, hidrolisar a gelatina e a lactose.

Um esquema com o procedimento completo encontra-se no Anexo XI.

Pseudomonas aeruginosa: NF EN 12780:2002

Para esta análise filtrou-se 100mL de água, de acordo com a norma ISO 8199. Após a filtração, a membrana foi colocada sobre a placa com o meio *CN Agar Pseudomonas* (BK 165 HA, Biokar) e incubada a 36°C durante $44\text{h} \pm 4\text{h}$. Posteriormente, procedeu-se à contagem das colónias que produziram uma pigmentação azul/verde (piocianina) e, confirmámo-las como *P. aeruginosa*. De seguida, examinámos a placa sob radiação ultravioleta, evitando exposições prolongadas de modo a não inativar as células e contámos as colónias que não produziram piocianina mas originaram fluorescência, confirmando a identidade destas colónias em caldo de acetamida (BM095). Procedemos, ainda, à contagem de colónias das que não produziram piocianina nem fluorescência, mas que apresentaram uma pigmentação castanha/vermelhada e, confirmámos a sua identidade com o ensaio de oxidase, crescimento em caldo de acetamida (BM095) e em King B (BM105).

Um esquema com o procedimento completo encontra-se no Anexo XII.

Listeria monocytogenes: ISO 11290-1:1996

Para a pesquisa deste microrganismo pipetou-se 25 mL da amostra de água e adicionou-se 225 mL do primeiro caldo de enriquecimento Fraser (Merck, ref^a 1.10398.0500) com concentração reduzida de agentes seletivos (Merck, ref^a 1.00092.0010). Posteriormente, incubou-se na estufa a 30°C durante 24 ±2 horas e repicou-se 0,1 mL da cultura obtida para um tubo de ensaio com 10 mL do segundo caldo de enriquecimento Fraser (Merck, ref^a 1.00093.0010), o qual tem a concentração completa de agentes seletivos.

No caso da pesquisa deste microrganismo em superfícies o que difere é a passagem de uma zaragatoa na superfície a analisar, a qual é colocada dentro do primeiro caldo de enriquecimento e incubada da mesma forma que as amostras de água, na estufa a 30°C durante 24 ±2 horas. A partir desta etapa todas as que se seguem realizam-se da mesma forma.

Após 48 horas de incubação no segundo caldo de enriquecimento, a 35-37°C, inoculou-se, por esgotamento, uma placa do meio seletivo e diferencial de isolamento ALOA (BioMérieux, ref^aAEB520080) e uma placa do meio seletivo de isolamento Oxford Agar (Oxoid, ref^aCM0856), de modo a obter colónias isoladas.

As colónias típicas de *Listeria monocytogenes* em ALOA, após 24 horas de incubação a 37°C, são azuis esverdeadas, com halo opaco. Neste meio as colónias de *L. ivanovii* surgem com as mesmas características e as outras espécies de *Listeria* apresentam colónias brancas.

Em Oxford Agar, após 24 horas de incubação, as colónias de *Listeria* spp. são pequenas, com cerca de 1mm de diâmetro, acinzentadas e rodeadas de um halo negro. Após 48 horas de incubação tornam-se mais escuras e maiores, rodeadas de um halo negro com uma depressão central. Contrariamente ao que sucede com o meio ALOA, neste meio não é possível diferenciar *L. monocytogenes* das outras espécies do mesmo género.

Para confirmar a sua deteção, selecionaram-se, aleatoriamente, de cada placa de ALOA e Oxford Agar, cinco colónias suspeitas e repicaram-se para placas de meio *Tryptone Soya Agar* (TSA; Himedia, ref^aM290-500G) com extrato de levedura (YE; Merck, ref^a1.03753.0500). Após inoculação por esgotamento e incubação na estufa a 35°C ou 37°C, durante 18 a 24 horas, as colónias típicas neste meio TSYEA são convexas, incolores, translúcidas, com margens regulares e apresentam 1 a 2 mm de diâmetro. Com iluminação de Henry e uma fina camada de meio TSYEA, estas colónias apresentam-se com superfície granular e coloração azul claro, quando observadas à lupa. Esta observação é importante como forma de, mais claramente, verificar a pureza da cultura.

A partir de culturas puras e jovens em TSYEA realizaram-se os testes de confirmação, nomeadamente o teste da hemólise, o teste CAMP (Christie, Atkinson, Munch, Peterson) e a identificação bioquímica com o API *Listeria* (BioMérieux,

ref^a10300). O teste de CAMP permite-nos observar uma reação de hemólise acentuada de *Listeria monocytogenes* na presença de uma cultura de *Staphylococcus aureus*. Para a realização deste teste, numa placa de Agar Sangue, inoculou-se *Staph. aureus* por riscado (é importante que o riscado seja feito de uma forma regular) e da mesma forma, mas perpendicularmente, semeou-se a cultura referente à amostra devidamente isolada de modo a não tocar a cultura previamente inoculada de *Staph. aureus*. Na mesma placa podem ser inoculadas várias culturas da nossa amostra e, ao mesmo tempo, semeiam-se as culturas de referência de *L. monocytogenes*, *L. innocua* e *L. ivanovii*. Após a sementeira incuba-se a 35-37°C, durante 18 a 24 horas.

Quanto ao teste com o API *Listeria*, este é constituído por uma galeria com 10 microtubos, com substratos desidratados, que permite realizar testes enzimáticos e de fermentação de açúcares, o que permite a identificação ao nível da espécie.

Um esquema com o procedimento completo encontra-se no Anexo XIII.

3.5. Tratamento estatístico

O tratamento estatístico é imprescindível para organizar, apresentar, analisar e interpretar os dados obtidos (Pestana & Gageiro, 2008).

Para o tratamento de dados recorreu-se ao programa Excel (versão 15.04737.1003) para a obtenção dos gráficos dos valores médios de cada parâmetro estudado, e ao programa IBM SPSS *Statistics* (v. 22.0) para a estatística descritiva e inferencial. Nestes programas procedeu-se à realização do teste de correlação de Pearson, teste de Levene e ANOVA.

O coeficiente de variação de Pearson é uma medida de dispersão relativa, usada para estimar a precisão de ensaios, e deve ser interpretado como a variabilidade dos dados em relação à média. Quanto menor for o coeficiente mais homogéneo será o conjunto de dados. É calculado através do cálculo da razão entre o desvio padrão e a média.

Para além da classificação das águas analisadas quanto à sua qualidade e da identificação e caracterização de isolados de *Pseudomonas* spp., este estudo tinha como objetivos a verificação de possíveis relações entre os parâmetros físico-químicos/microbiológicos e as fontes de captação das águas analisadas, e verificação da possível relação entre a presença de bactérias coliformes e de *Pseudomonas* spp. Assim, e tendo em conta o referencial teórico pesquisado, foi definido um modelo conceptual e as hipóteses de estudo das relações atrás referidas (Figura 6).

Landim (2003) refere que o modelo conceptual se trata de uma formulação simplificada, apresentada tanto em forma de diagramas, quanto em forma qualitativa ou quantitativa, que pretende definir o estudo. Nestes estudos são testadas hipóteses entre as variáveis definidas (Miguel *et al.*, 2012).

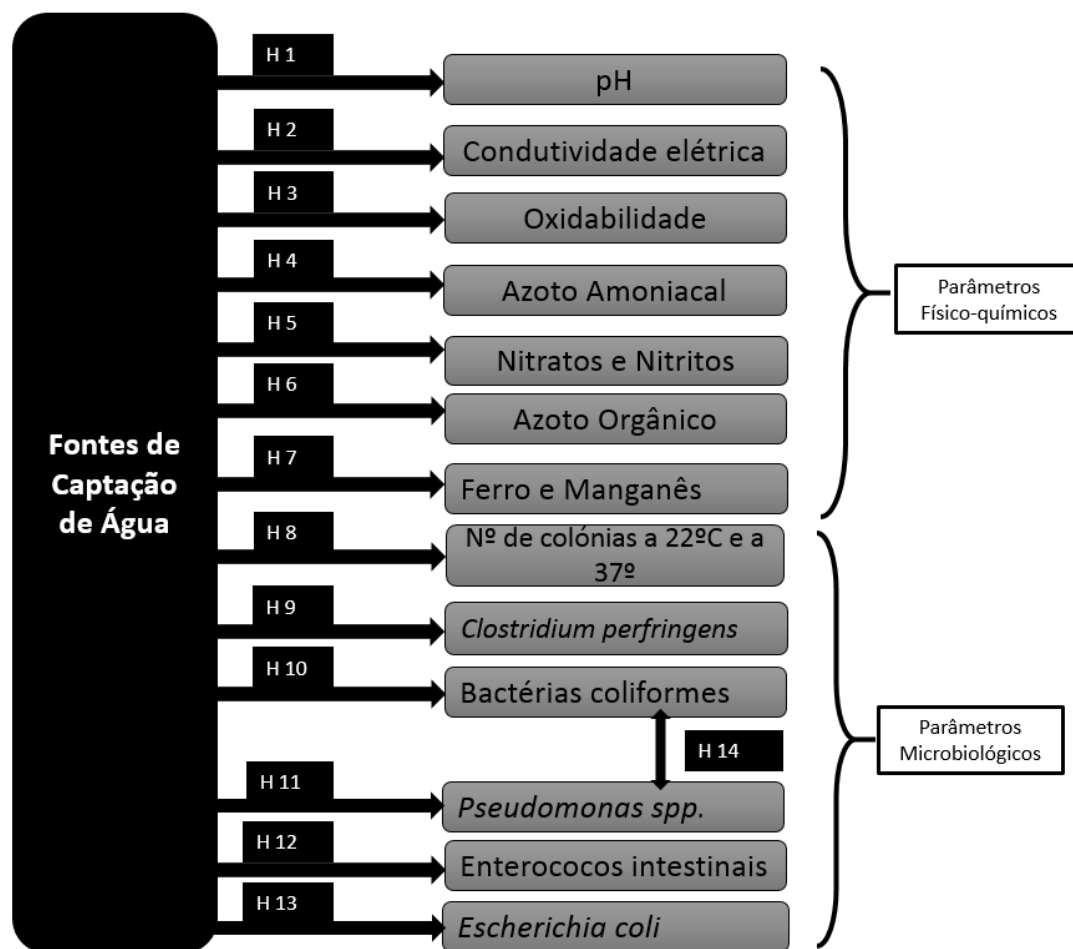


Figura 6: Modelo Conceptual

A água é um dos mais importantes compostos para o ecossistema e, devido ao aumento da população humana, industrialização, utilização de fertilizantes na agricultura e outras atividades sintéticas, a sua qualidade é colocada em causa (Manjare *et al.*, 2010), tornando-se necessário avaliar a sua qualidade em intervalos regulares de tempo, nomeadamente parâmetros físico-químicos e microbiológicos. Sliva e Williams (2001) referem que características hidrográficas naturais, tais como topografia e geologia superficial podem influenciar a qualidade da água, por isso, neste estudo, pretendeu-se verificar se existem diferenças significativas na qualidade da água, nas diferentes fontes de captação.

De acordo com a evidência científica, a qualidade da água depende da fonte de captação, quer em relação aos parâmetros físico-químicos, quer microbiológicos. Por isso, Ponciano (2010) refere que a água utilizada para a higienização dos equipamentos de ordenha deverá ser, preferencialmente, da rede. Assim, foram formuladas as seguintes hipóteses:

Hipótese 1: A média de pH obtida depende da fonte de captação de água.

Hipótese 2: A média de condutividade elétrica obtida depende da fonte de captação de água.

Hipótese 3: A média de oxidabilidade obtida depende da fonte de captação de água.

Hipótese 4: A média de azoto amoniacal obtido depende da fonte de captação de água.

Hipótese 5: A média de nitratos e nitritos obtida depende da fonte de captação de água.

Hipótese 6: A média de azoto orgânico obtida depende da fonte de captação de água.

Hipótese 7: A presença de valores superiores ao recomenda pelo DL nº 306/2007, em relação ao ferro e manganês, encontra-se relacionado com a fonte de captação de água.

Hipótese 8: A presença de colónias, a 22°C e a 37°C, superior aos valores desejáveis recomendados pelo DL nº 306/2007 de 27 de Agosto depende da fonte de captação de água.

Hipótese 9: A presença de *Clostridium perfringens* depende da fonte de captação de água.

Hipótese 10: A presença de *bactérias coliformes* depende da fonte de captação de água.

Hipótese 11: A presença de *Pseudomonas* spp. depende da fonte de captação de água.

Hipótese 12: A presença de *Enterococos intestinais* depende da fonte de captação de água.

Hipótese 13: A presença de *Escherichia coli* depende da fonte de captação de água.

Hipótese 14: Existe correlação entre a presença de *bactérias coliformes* e a presença de *Pseudomonas* spp.

4. Resultados e Discussão

Este capítulo encontra-se dividido em quatro partes, na primeira é discutida a proveniência das amostras de água, na segunda analisados os resultados das análises físico-químicas, a terceira onde são apresentados e discutidos os resultados das análises microbiológicas e, por fim, a quarta parte onde é apresentado um resumo dos resultados do modelo conceptual.

4.1. Proveniência das amostras

Das 47 amostras de água analisadas, 14 (30%) eram provenientes de rede pública, 29 (62%) de águas subterrâneas sem tratamento, 2 (4%) de águas subterrâneas com tratamento e 2 (4%) de água superficiais sem tratamento. Assim, verifica-se que a grande maioria das amostras, (66%), se referem a águas que não sofreram qualquer tratamento (Gráfico 1).

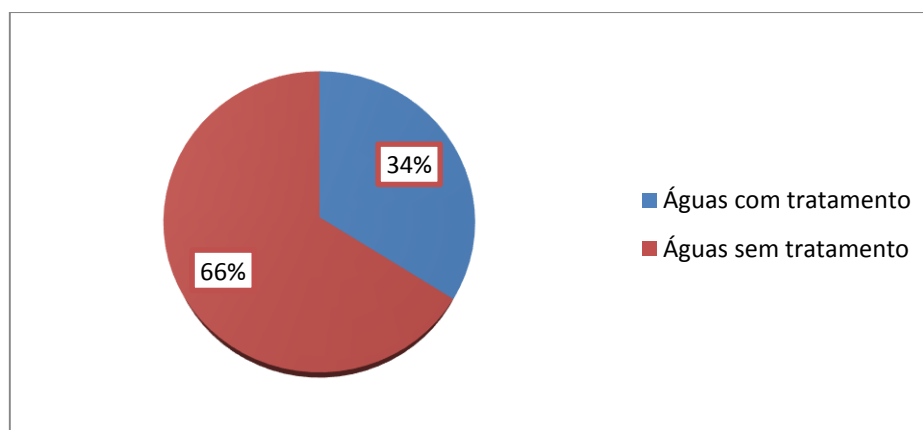


Gráfico 1: Percentagem de amostras com tratamento e sem tratamento

À semelhança deste trabalho, também no estudo efetuado por Lacerda *et al.* (2009), a grande maioria das amostras de água usadas na higienização em explorações de vacas leiteiras no Brasil provinham de fontes de água não tratadas (85%).

Considerando ainda a origem da fonte de captação, podemos verificar que as águas de furo (n=16) são as que predominam, seguindo-se as águas da rede pública (n=14), águas de nascente (n=9), águas de mina (n=4) e, por fim, as águas de barragem (n=2) e as águas de poço (n=2) (Gráfico 2).

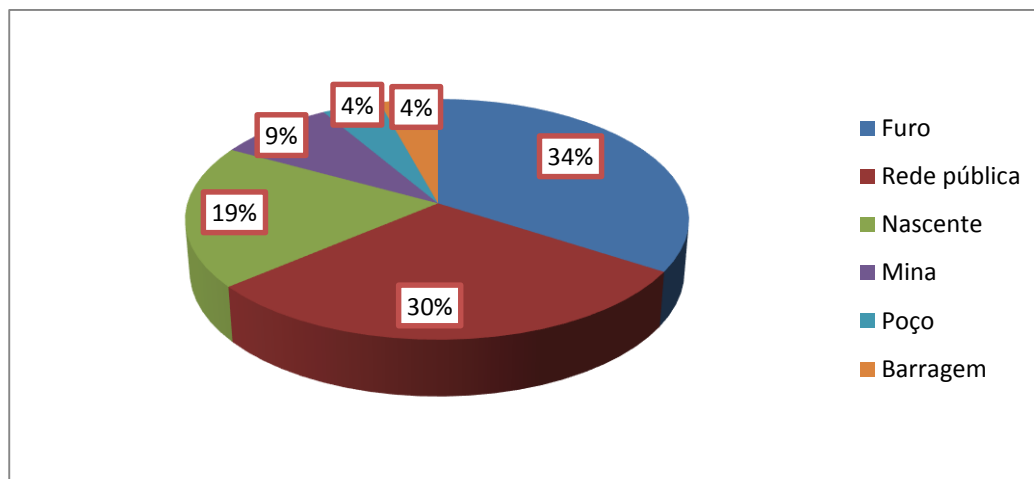


Gráfico 2: Percentagem de amostras em função da sua origem

O elevado número ($n=16;34\%$) de explorações de leite de pequenos ruminantes que usa água não tratada, mais especificamente águas de furo, poderá estar relacionado com a localização das explorações leiteiras, as quais se encontram distantes das zonas habitadas, não tendo acesso a uma rede pública de abastecimento de água. Por outro lado, nem sempre há consciência por parte dos produtores sobre a importância que a potabilidade da água tem na qualidade do leite produzido, como verificado no estudo efetuado por Ponciano (2010). Questões económicas, relacionadas com o custo da instalação e manutenção de um sistema de tratamento de água doméstico ajustado a cada exploração, também devem ser consideradas.

Ponciano (2010), no estudo efetuado pelo mesmo em explorações leiteiras de pequenos ruminantes da região do Rabaçal, verificou que a principal origem das águas utilizadas eram provenientes de furos/poços (42%) e da rede pública (29%), resultados semelhantes aos obtidos por nós.

Tendo em conta a tabela 2, verifica-se que a maioria dos produtores (67%; $n=16$) utiliza a ordenha manual e 33% a ordenha mecânica. Pela observação do gráfico 3 verifica-se que, quer nas explorações com ordenha manual quer nas explorações com ordenha mecânica, se usa, predominantemente, água não tratada, apesar de a percentagem de explorações que usam água não tratada seja maior nas que possuem ordenha mecânica relativamente às que usam ordenha manual. Esta situação pode ser problemática, tendo em conta as características dos equipamentos e utensílios de ordenha e a maior probabilidade de formação de biofilmes associados ao circuito.

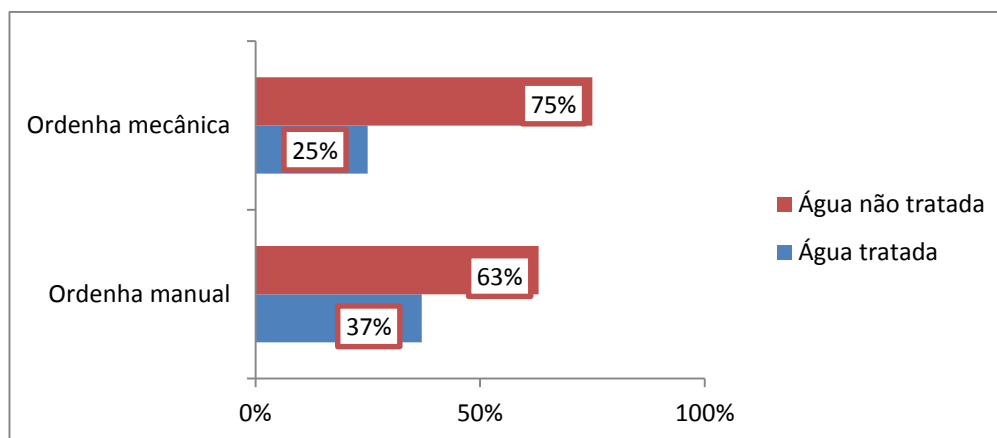


Gráfico 3: Percentagem de explorações que usam água tratada/não tratada em relação ao tipo de ordenha manual/mecânica.

4.2. Resultados e discussão das análises físico-químicas

4.2.1. Apreciação dos resultados físico-químicos tendo em conta o DL nº306/2007

Após a obtenção dos resultados das análises físico-químicas, as amostras de água foram apreciadas tendo em conta os valores paramétricos definidos no DL 306/2007 (Tabela 5).

Tabela 5: Parâmetros físico-químicos avaliados e respetivo valor paramétrico (VP).

Parâmetros	VP (DL nº306/2007)
pH	$\geq 6,5 \leq 9$
Condutividade elétrica	2500 $\mu\text{S}/\text{cm}$
Oxidabilidade	5 mg/L
Amónia	0,5 mg/L
Nitratos + Nitritos	50 mg/L + 0,5 mg/L
Azoto orgânico	-
Ferro	200 $\mu\text{g}/\text{L}$
Manganês	50 $\mu\text{g}/\text{L}$

Nota: O valor paramétrico refere -se à concentração residual do monómero na água, calculada em função das especificações, fornecidas pelo fabricante, da migração máxima do polímero correspondente em contacto com a água. **Fonte:** Adaptado do DL nº306/2007

Os resultados das análises físico-químicas foram reunidos em duas tabelas (Tabela 6 para as amostras de água com tratamento e Tabela 7 para as amostras de água sem tratamento). Nestas tabelas as amostras foram apreciadas, tendo em conta os valores paramétricos definidos no DL 306/2007 (Tabela 5), em: (1) Todos os valores respeitam

os limites legais; (2) Um ou mais valores não respeitam os limites legais. Para que a análise das tabelas se torne mais fácil, os valores que se encontram fora dos limites estabelecidos pelo DL enunciado apresentam-se a sombreado. Encontram-se, também, apresentados os valores médios, mínimo e máximo, o desvio padrão e o coeficiente de variação para os diferentes parâmetros físico-químicos avaliados, à exceção do ferro e manganês, uma vez que a grande maioria das amostras apresentaram valores inferiores ao limite de deteção (LD).

Tabela 6: Resultados das análises físico-químicas das amostras de água com tratamento

Origem da amostra de água	Produtor	Colheita	pH	CE (µS/cm)	Oxidabilidade a Quente (mg/l)	Azoto Amoniacal (mg/l)	Nitratos + Nitritos (mg/L)	Azoto Orgânico (mg/L)	Fe (µg/l)	Mn (µg/l)	Apreciação de acordo com o decreto lei nº 306/2007
Águas da rede pública (n=14)											
Rede Pública	9	C1	7,1	128,4	0,192	0,42	0,49	0,42	<LD	<LD	1
		C2	6,85	138,5	0	0	0	0,63	<LD	<LD	1
	11	C1	7,4	171,7	0	0,42	0,42	0,42	<LD	<LD	1
		C2	7,35	107,1	0	0,7	0,35	0,49	<LD	<LD	2
	12	C1	7	109,3	0	0,42	0,42	0,42	61,3	<LD	1
		C2	7,4	98,8	0	0,49	0,35	0,49	<LD	<LD	1
	15	C1	6,34	168,1	0	0,56	0,35	1,12	<LD	<LD	2
		C2	7,6	132,2	0	0,49	0,28	0,07	<LD	<LD	1
	16	C1	6,5	170,7	0	0,35	0,28	0,98	<LD	<LD	1
		C2	7,3	133,6	0	0,49	0,21	0,07	<LD	<LD	1
	18	C1	6,34	167,7	0,096	0,42	0,49	0,63	<LD	<LD	2
		C2	7,25	107,9	0	0,35	0,35	0,42	<LD	<LD	1
	20	C1	6,65	183,7	0	0,42	0,42	0,63	<LD	<LD	1
		C2	7,25	176,3	0	0,49	0,49	0,07	<LD	<LD	1
Águas subterrâneas com tratamento (n=2)											
Poço	8	C1	6,37	142,9	0	0,49	0,42	2,1	<LD	<LD	2
		C2	6,4	83,8	0	0,35	0,49	1,33	<LD	<LD	2
Mínimo			6,34	83,80	0,00	0,00	0,00	0,07	—	—	
Máximo			7,60	183,70	0,19	0,70	0,49	2,10	61,3	—	
Média			6,94	138,79	0,02	0,43	0,36	0,64	—	—	
Desvio padrão			0,45	31,48	0,05	0,14	0,13	0,53	—	—	
Coeficiente Variação			0,03	7,14	0,15	0,05	0,05	0,43	—	—	

(1) Todos os valores respeitam os limites legais; (2) Um ou mais valores não respeitam os limites legais; LD – Limite de deteção; Os valores sombreados encontram-se fora dos limites legais; c1 – primeira colheita; c2 – segunda colheita.

Tabela 7: Resultados das análises físico-químicas das amostras de água sem tratamento

Origem da amostra de água	Produtor	Colheita	pH	CE (µS/cm)	Oxidabilidade (mg/l)	Azoto Amoniaco (mg/l)	Nitratos + Nitritos (mg/L)	Azoto Orgânico (mg/L)	Fe (µg/l)	Mn (µg/l)	Apreciação de acordo com o decreto lei nº 306/2007	
Águas subterrâneas sem tratamento (n=29)												
Furo	1	C1	6,58	95	0,136	0,56	0,49	0,98	188,3	<LD	2	
		C2	5,9	85,9	0,128	0	0	0,7	<LD	<LD	2	
	6	C1	6,6	269	0,328	0,35	0,49	0,49	<LD	<LD	1	
		C2	5,8	182,1	0	0	0	0,84	<LD	<LD	2	
	7	C1	6,4	102	0,056	0,49	0,7	1,12	<LD	<LD	2	
		C2	5,9	95,1	1,18	0	0,98	1,19	<LD	<LD	2	
	10	C1	6,8	189	0,08	0,49	0,7	1,12	0,9	<LD	1	
		C2	7,1	131,8	0	0,42	0,42	1,12	<LD	<LD	1	
	14	C1	7,1	117	0,104	0,42	0,42	0,42	<LD	<LD	1	
		C2	7,1	131,7	0	0	0	0,42	<LD	<LD	1	
	17	C1	6,38	242	0,504	0,42	0,42	0,63	3543,6	111	2	
		C2	6,4	166,2	1,1	0,28	0,49	0,07	1553,4	291	2	
	19	C1	6,37	223	0,328	0,42	0,49	0,42	555,4	148,9	2	
		C2	6,2	143,6	0,976	0,42	0,49	0,07	<LD	179,7	2	
	21	C1	6,7	147,2	0,288	0,49	0,7	1,19	<LD	<LD	1	
		C2	6,35	128,7	1,024	0,42	0,7	1,19	<LD	<LD	2	
	Nascente	2	C1	6,6	68,9	0,264	0,35	0,77	0,42	<LD	<LD	1
			C2	5	59	1	0	0,21	0,91	<LD	<LD	2
3		C1	6,1	78,6	0,032	0,35	0,35	0,42	<LD	<LD	2	
		C2	6,6	74	0	0	0	0,42	<LD	<LD	1	
22		C1	7,21	24,7	0,744	0,42	0,42	0,63	<LD	<LD	1	
		C2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
23		C1	6,82	51,7	0,008	0,49	0,49	0,63	<LD	<LD	1	
		C2	6,4	63,4	0	0,35	0,42	0,49	<LD	<LD	2	
24		C1	9,2	17	2,032	0,49	0,42	0,49	<LD	<LD	2	
		C2	8,4	22,4	1,8	0,21	0,28	5,95	<LD	<LD	1	
Mina	4	C1	6,3	57,4	0,568	0,42	0,7	0,98	28,5	<LD	2	
		C2	5,3	42,9	0,112	0,56	0,77	3,29	<LD	<LD	2	
	5	C1	6,2	51,9	0,072	0,42	0,7	0,42	<LD	<LD	2	
		C2	6,35	29,3	2,27	0	0,49	0,42	<LD	<LD	2	
Águas superficiais sem tratamento (n=2)												
Barragem	13	C1	6,82	51,7	0,008	0,49	0,49	0,63	568,5	<LD	2	
		C2	6,4	63,4	0	0,35	0,42	0,49	290,4	<LD	2	
Mínimo			5,00	17,00	0,00	0,00	0,00	0,07	—	—		
Máximo			9,20	269,00	2,27	0,56	0,98	5,95	3543,6	291		
Média			6,56	103,41	0,49	0,33	0,47	0,92	—	—	—	
Desvio padrão			0,78	66,37	0,64	0,19	0,24	1,09				
Coeficiente Variação			0,09	42,60	0,84	0,11	0,13	1,30				

(1) Todos os valores respeitam os limites legais; (2) Um ou mais valores não respeitam os limites legais; LD - Limite de deteção; Os valores sombreados encontram-se fora dos limites legais; c1 - primeira colheita; c2 - segunda colheita.

Através da observação da tabela 6, relativa às amostras de água tratadas, verifica-se que 69% destas apresentam todos os valores dentro dos limites legais. Das cinco amostras com valores fora dos limites legais, os parâmetros que não cumpriram foram o pH (n=4) e a amónia (n=2) (Gráfico 4).

No caso das amostras de água não tratada (Tabela 7), a percentagem de amostras que cumprem todos os limites legais é de, apenas, 35%. Neste caso, das vinte amostras com valores fora dos limites legais, 18 (58%) apresentavam valores de pH inferiores a 6,5 ou superiores a 9,0, duas amostras (6%) apresentavam valores de amónia superiores a 0,50 mg/L, cinco amostras (16%) valores de ferro superiores a 200 µg/L e quatro amostras (13%) valores de manganês superiores a 50 µg/L (Gráfico 4).

Relativamente aos parâmetros da condutividade elétrica, da oxidabilidade, dos nitratos e dos nitritos verificou-se que, todos os valores obtidos, cumpriam os limites legais.

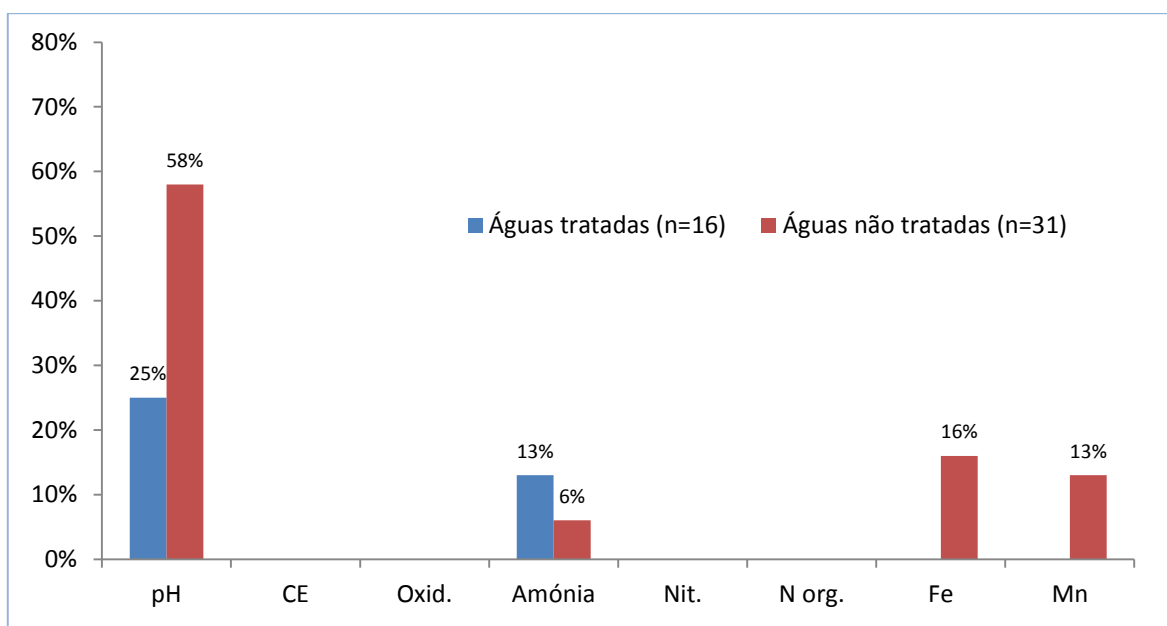


Gráfico 4: Percentagem de incumprimentos para cada parâmetro físico-químico

Com base na observação dos valores médios dos parâmetros analisados, verificamos que estes se encontram dentro dos limites estabelecidos pelo DL nº306/2007. Em relação ao coeficiente de variação, verificamos que o pH é o parâmetro que apresenta menor variabilidade (coeficiente de variação de 0,03 no caso do conjunto das amostras de água tratadas – Tabela 6 - e 0,09 no caso do conjunto das amostras de água não tratadas – Tabela 7), indicando que os valores se encontram homogêneos e existe uma reduzida dispersão relativa dos resultados.

Tal como é referenciado pela bibliografia, as amostras de água tratadas (maioritariamente provenientes de rede pública) apresentam valores inferiores, comparativamente com as amostras provenientes de águas sem tratamento, à exceção

do pH, do azoto amoniacal e da condutividade elétrica em que os valores se encontram superiores. Relativamente ao parâmetro de pH, este encontra-se mais elevado nas amostras de rede pública, situação que já era esperada uma vez que este é um valor corrigido para valores entre 6,5 e 7,5 de forma a garantir a eficiência do processo de desinfecção ao longo da rede de distribuição.

Tendo em conta o maior número de situações de incumprimentos verificadas para o parâmetro pH, quer no grupo das águas tratadas quer no grupo das águas não tratadas, é de referir que esta situação não apresenta efeitos diretos sobre a saúde do consumidor. No entanto, este parâmetro deve ser controlado dado que pode influenciar a ocorrência de fenómenos de corrosão (no caso de valores de pH inferiores a 6,5) ou de incrustação nas canalizações e outros acessórios com os quais a água entre em contacto (no caso de valores de pH superiores a 9,0) (Sousa, 2012).

Os outros parâmetros físico-químicos para os quais foram verificadas situações de incumprimento foram a amónia, o ferro e o manganês. As formas de azoto orgânico e amoniacal estão presentes em detritos oriundos de atividades biológicas naturais e incluem proteínas, ácidos nucleicos e ureia, sendo um parâmetro indicativo da abundância de nutrientes na água e conseqüente possibilidade de eutrofização. Quanto ao manganês, este é o terceiro metal mais abundante na natureza e surge, normalmente, na presença do ferro (APDA, 2013a) facto que pode ser observado na tabela 7 em três das quatro amostras que apresentam valores de manganês superiores a 50 µg/L.

4.2.2. Análise dos resultados físico-químicos em função da fonte de captação

De seguida é apresentada a análise dos resultados dos diferentes parâmetros físico-químicos avaliados em função da fonte de captação. É de referir que, em todos os parâmetros físico-químicos avaliados, à exceção do azoto amoniacal, estes não apresentam diferenças significativas ($p > 0,05$) quando comparados com as épocas de colheita (Anexo XIV).

pH

Relativamente ao parâmetro pH verificaram-se diferenças significativas ($p < 0,05$) (Anexo XV) entre as amostras de água da rede pública e as amostras de água subterrânea sem tratamento, pelo que a hipótese 1 do modelo conceptual, “A média de pH obtida depende da fonte de captação de água”, é suportada.

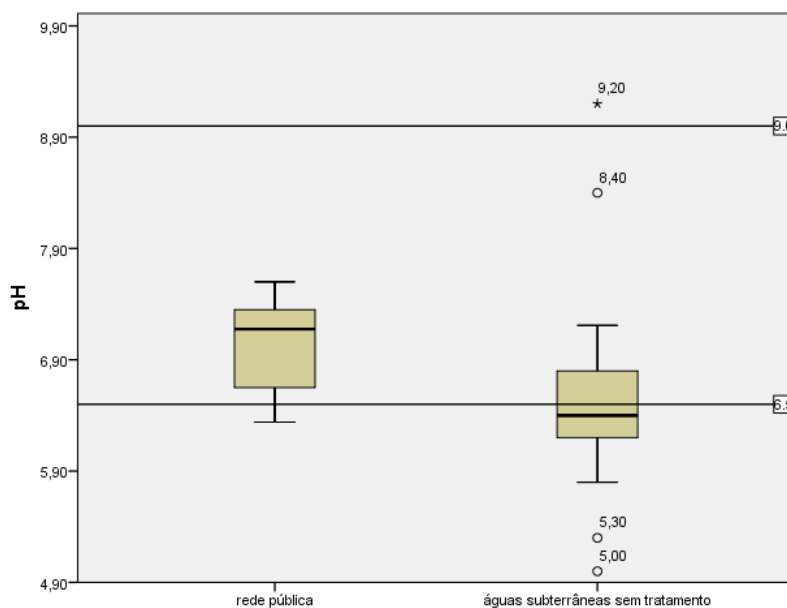


Gráfico 5: Boxplot que traduz a dispersão dos valores de pH em função da fonte de captação

Através da observação do gráfico 5 verificamos que as águas subterrâneas apresentam valores de pH inferiores, quando comparadas com as águas de rede pública. A grande parte das amostras de água de rede pública, como era de esperar pelo que referimos anteriormente, apresentam valores acima dos 6,5, ao passo que as águas subterrâneas sem tratamento apresentam, na sua maioria, valores de pH inferiores a 6,5. As águas subterrâneas analisadas apresentam, geralmente, valores de pH ácidos o que pode ser explicado pelo tipo de estrato rochoso predominante na região em estudo. De facto, o granito constitui a principal formação rochosa da região da beira interior, a qual se caracteriza por ser uma rocha ácida. Sorlini *et al.* (2013), num estudo efetuado pelos mesmos, verificaram que águas subterrâneas sem tratamento apresentavam valores de pH baixos, sendo que 26% das amostras apresentavam valores inferiores a 6,5. No estudo efetuado por Sousa *et al.* (2015), 72,7% das amostras de águas subterrâneas sem tratamento apresentavam valores de pH inferiores a 6,5.

Condutividade Elétrica

Mendes e Oliveira (2004) referem que a condutividade fornece uma boa indicação das modificações na composição de uma água, especialmente da sua concentração total iónica. No entanto, embora permita avaliar de uma forma rápida e global o seu grau de mineralização, não fornece nenhuma indicação das quantidades relativas dos iões dissolvidos presentes.

Embora não se conheça a origem dos minerais, segundo Mendes e Oliveira (2004) referem, parte pode resultar de processos de lixiviação dos solos, tais como aniões carbonatos, bicarbonatos, sulfatos, cloretos, nitratos ou os catiões como o cálcio,

magnésio, sódio, potássio entre outros metais. Outra parte pode provir de efluentes e resíduos agrícolas e/ou industriais, que contaminam essas águas.

Em relação ao parâmetro da condutividade elétrica, relacionando-o com a fonte de captação, verificou-se que este apresenta diferenças significativas ($p < 0,05$) (ver Anexo XV) entre as fontes de captação, pelo que a hipótese 2 do modelo conceptual, “A média de condutividade elétrica obtida depende da fonte de captação de água”, é suportada.

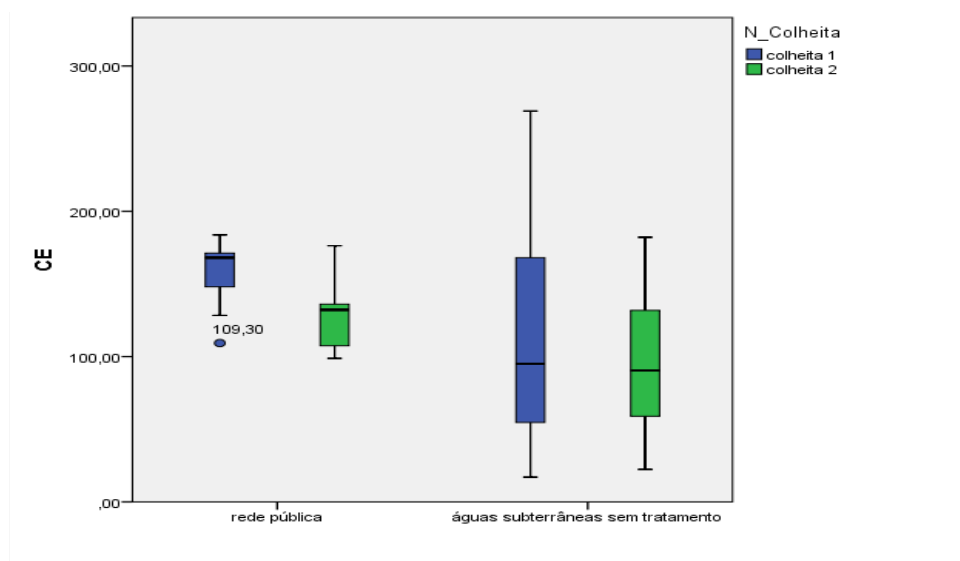


Gráfico 6: *Boxplot* que traduz a dispersão dos valores da condutividade elétrica em função da fonte de captação e da data de colheita de amostra

Através da observação do gráfico 6 verificamos que as águas de rede pública apresentaram valores mais elevados de condutividade, contudo importa referir que todas as amostras de água apresentaram valores inferiores ao valor paramétrico. Os resultados obtidos na rede pública apresentam-se mais homogêneos, quando comparados com as águas subterrâneas sem tratamento, em que a dispersão de dados é superior. Este facto está de acordo com o referido na bibliografia, a qual refere que, tal como esperado, as águas de rede pública não apresentam modificações tão acentuadas como as águas subterrâneas na sua concentração total iónica (Mendes e Oliveira, 2004). Os dados obtidos permitem, também, evidenciar que as águas utilizadas apresentam baixa condutividade, isto é, têm uma mineralização fraca a moderada, o que está igualmente associado ao estrato rochoso de granito, o qual é de difícil meteorização, significando que liberta mais lentamente os iões que constituem os seus minerais constituintes e, por isso, originam águas subterrâneas mais pobres em iões dissolvidos quando comparadas, por exemplo, com águas subterrâneas provenientes de estratos rochosos como os calcários.

Oxidabilidade

A oxidabilidade é o parâmetro utilizado para avaliar indiretamente a quantidade de matéria orgânica presente numa amostra de água, a qual é medida através da quantidade de oxigénio consumido durante a reação de oxidação dessa matéria orgânica pelo permanganato de potássio. A presença de matéria orgânica numa água que se destina a consumo humano é considerada indesejável devido ao facto de poder potenciar a sobrevivência e desenvolvimento de microrganismos, alguns deles eventualmente patogénicos (Mendes e Oliveira, 2004).

Relacionando o parâmetro da oxidabilidade com a fonte de captação, verificou-se que este apresenta diferenças significativas ($p < 0,05$) (ver Anexo XV) entre as fontes de captação, pelo que a hipótese 3, “A média de oxidabilidade obtida depende da fonte de captação de água”, é suportada. Assim, e de forma a tornar mais perceptível essas diferenças é apresentado o gráfico 7.

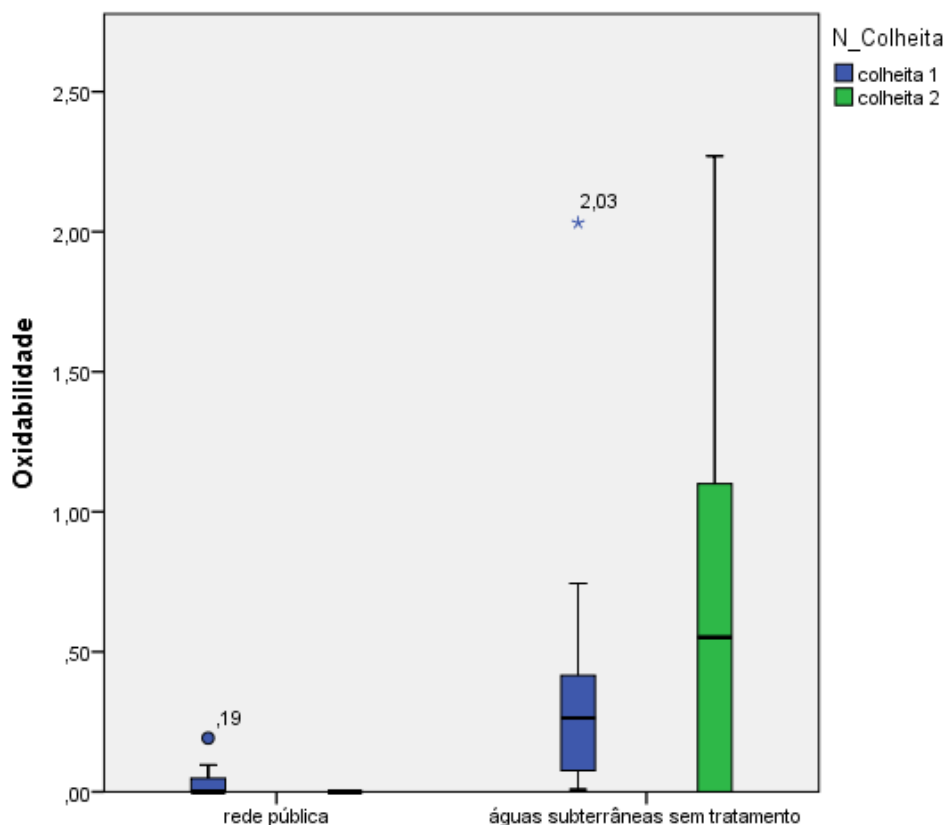


Gráfico 7: Boxplot que traduz a dispersão dos valores da oxidabilidade em função da fonte de captação e da data de colheita de amostra

Através da observação do gráfico 7 e, tendo em conta que o DL nº 306/2007 estabelece como VP $5\text{mgO}_2/\text{L}$, verificamos que os resultados obtidos referentes a este parâmetro são bastante satisfatórios. Tal como seria expectável, os níveis de matéria

orgânica foram mais elevados nas origens de água subterrânea sem tratamento, tanto na colheita 1 como na colheita 2. Tal facto, poderá estar relacionado com o tratamento das águas da rede pública que geralmente, envolve um conjunto de operações e processos destinados à remoção de matéria orgânica presente na água a tratar e que incluem o processo de coagulação/floculação, seguido das operações de sedimentação e filtração (APDA, 2012c).

Os resultados permitem-nos, também, verificar que, ao nível da rede pública, os valores de oxidabilidade se mantiveram relativamente constantes considerando a primeira e a segunda colheita de amostras, o que não se verificou em relação às origens de água não tratada, em que se observou uma forte oscilação entre a primeira e a segunda colheita. De facto, no período outubro-novembro, os valores de oxidabilidade aumentaram, o que poderá estar relacionado com o arrastamento de partículas em suspensão de natureza orgânica em consequência da infiltração das águas das chuvas (Horta, 2015).

Azoto Amoniacal

A APDA (2013b) refere que a presença de amónio na água para consumo humano não é muito relevante para a saúde humana, pois os efeitos toxicológicos são observados apenas em exposições acima de 200mg/Kg de peso corporal.

Relativamente ao parâmetro do azoto amoniacal, relacionando-o com a fonte de captação, verificou-se que este apresenta diferenças significativas ($p < 0,05$) (ver Anexo XV) entre as fontes de captação, pelo que a hipótese 4, “A média de azoto amoniacal obtida depende da fonte de captação de água”, foi suportada. De forma a poder ser analisado minuciosamente, é apresentado o gráfico 8.

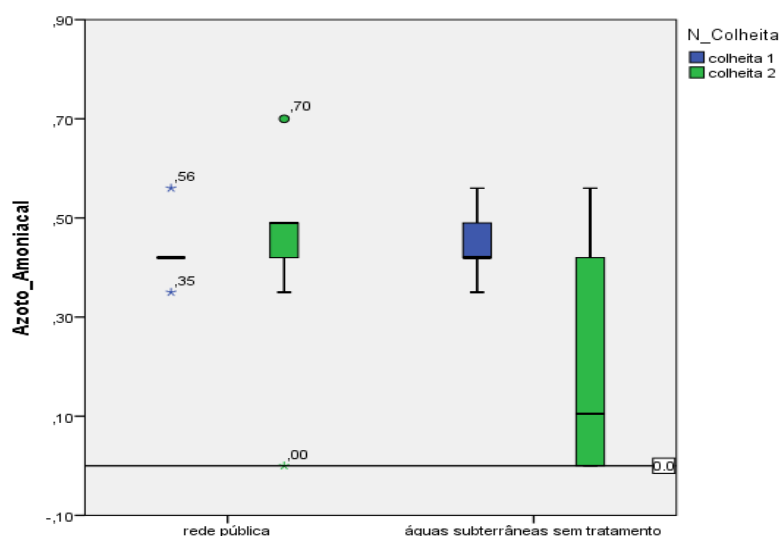


Gráfico 8: Boxplot que traduz a dispersão dos valores do azoto amoniacal em função da fonte de captação e da data de colheita de amostra

Através da observação do gráfico 8 verificamos que nas águas não tratadas se observou uma tendência para uma diminuição acentuada ($\approx 0,25\text{mg/L}$) na concentração de azoto amoniacal, ao passo que nas águas da rede este parâmetro manteve-se constante. A diminuição observada para as águas subterrâneas poderá ser explicada pelo fator de diluição associado ao aumento do nível de água nas toalhas freáticas durante o período das chuvas. Assim, esta menor concentração em azoto amoniacal poderá não significar uma menor contaminação da água por este composto de azoto. APDA (2013b) refere que, nas águas subterrâneas, não existem concentrações elevadas de amónio.

Nitratos e Nitritos

Os nitratos são um dos compostos azotados de maior importância, na medida em que são um componente essencial à formação da biomassa das plantas e dos animais, mas, por outro lado, são também um contaminante relevante nas águas superficiais e subterrâneas utilizadas na produção de água para consumo humano (APDA, 2013c).

Os nitritos são produto um da oxidação do amónio ou da redução dos nitratos. Na água, em condições de oxidação normais, a conversão dos nitritos em nitratos é praticamente imediata (APDA, 2013d).

Em relação ao parâmetro dos nitratos e nitritos, relacionando-o com a fonte de captação, verificou-se que este não apresenta diferenças significativas ($p>0,05$) (ver Anexo XV) entre as fontes de captação, pelo que a hipótese 5, “A média de nitratos e nitritos obtida depende da fonte de captação de água”, não é suportada.

No entanto, e uma vez que se trata de um parâmetro analisado, de forma a proceder à análise dos dados obtidos é apresentado o gráfico 9.

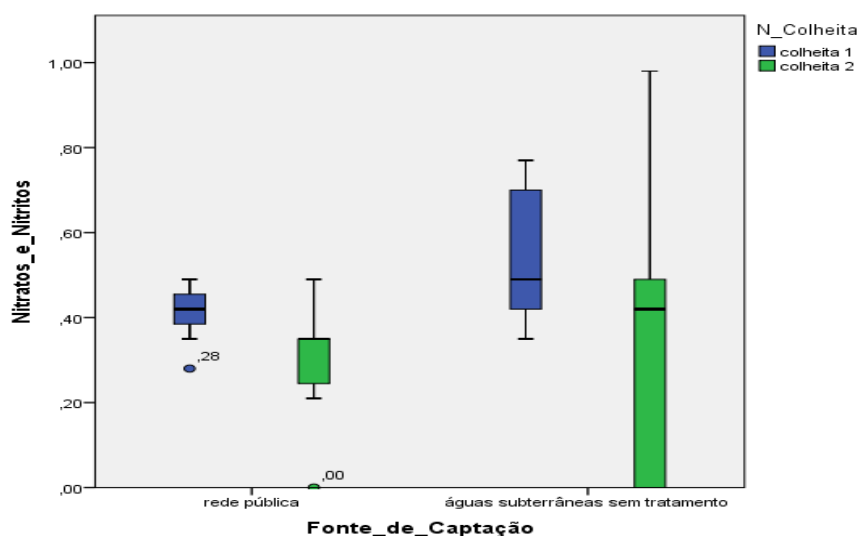


Gráfico 9: *Boxplot* que traduz a dispersão dos valores dos nitratos e nitritos em função da fonte de captação e da data de colheita de amostra

Através da observação do gráfico 9 verificamos que tanto na colheita 1 como na colheita 2, os valores de nitratos e nitritos obtidos nas amostras na rede pública eram menores, quando comparados com os valores das amostras das águas subterrâneas sem tratamento. As concentrações de nitratos em águas superficiais, assim como em águas subterrâneas, aumentam em função da quantidade de fertilizantes azotados aplicados ao solo e dos efluentes e resíduos (industriais, agrícolas e domésticos) descarregados (APDA, 2013c).

Devido à sua solubilidade, e por constituírem as formas azotadas onde o estado oxidativo é máximo, os nitratos podem acumular-se nas águas subterrâneas, sendo que nas regiões onde a agricultura é praticada com intensidade, a ocorrência em lençóis freáticos de concentrações de nitratos pode atingir níveis mais elevados. Também nas regiões onde o solo é contaminado por águas residuais ou sobre a influência de atividades de produção animal, a conversão biológica pode, também, levar à formação de nitratos que se infiltram em profundidades e acumulam nos lençóis freáticos.

Relativamente ao período de colheita, tanto nas águas subterrâneas não tratadas como nas amostras de rede pública, observou-se uma tendência para uma diminuição na concentração de nitratos e nitritos no período de outubro-novembro. A diminuição observada poderá ser explicada, uma vez mais, pelo fator de diluição associado ao aumento do nível de água nas toalhas freáticas durante o período das chuvas.

Importa salientar que, neste trabalho, foi realizada a determinação conjunta de nitratos e nitritos. No DL nº306/2007, contudo, a determinação dos nitratos e nitritos é realizada separadamente tendo um valor paramétrico de 50mg/L e 0,5mg/L, respetivamente. Através do gráfico 9 observamos que todas as amostras apresentam valores paramétricos para os nitratos inferiores ao definido pelo DL.

Azoto Orgânico

Relativamente ao parâmetro do azoto orgânico, relacionando-o com a fonte de captação, verificou-se que este não apresenta diferenças significativas ($p > 0,05$) (ver Anexo XV) entre as fontes de captação, pelo que a hipótese 6, “A média de azoto orgânico obtida depende da fonte de captação de água”, não é suportada.

No gráfico 10 apresenta-se a variação deste composto na primeira e segunda colheitas.

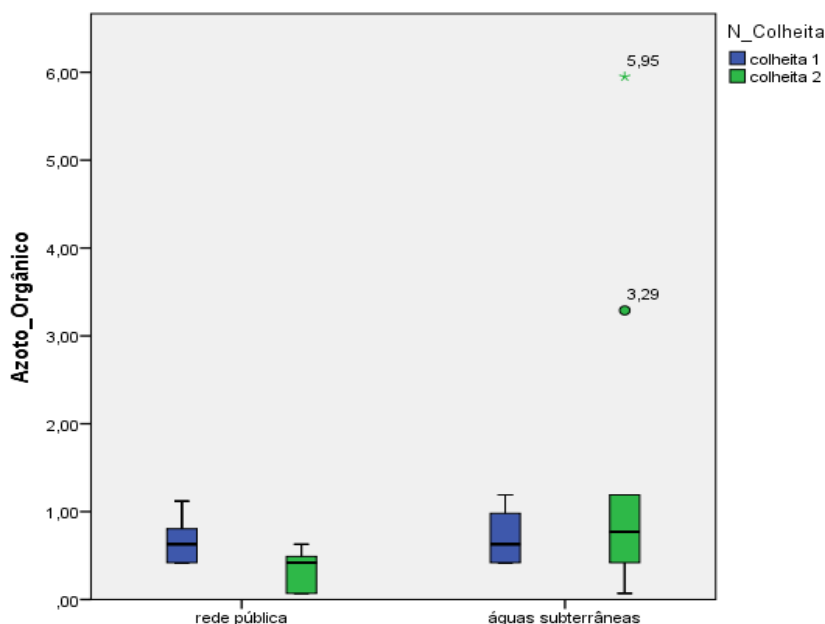


Gráfico 10: *Boxplot* que traduz a dispersão dos valores do azoto orgânico em função da fonte de captação e da data de colheita de amostra

Através da observação do gráfico 10 verificamos que, no caso das águas subterrâneas sem tratamento, se registou um ligeiro aumento a nível da mediana do azoto orgânico, o qual pode ser explicado pelo aumento da matéria orgânica no intervalo de tempo correspondente à colheita 2. Para além disso, já tínhamos obtido um aumento da oxidabilidade nas águas subterrâneas sem tratamento, pelo que era esperado que os compostos orgânicos também pudessem ter sofrido esse aumento, pois Brás (2013) refere que um dos parâmetros químicos associados a compostos orgânicos mensuráveis na água é a oxidabilidade que consiste na quantidade de matéria orgânica quimicamente oxidável.

Nas amostras de água provenientes da rede pública, houve uma diminuição destes compostos de azoto. Esta variabilidade não deverá estar associada a características sazonais mas antes a aspetos pontuais.

Ferro e Manganês

Em virtude de afinidades geoquímicas, o ferro é, quase sempre, acompanhado pelo manganês e, por esse motivo, consideramos que seria pertinente procedermos à sua análise conjunta.

Relativamente a estes parâmetros, verificamos que, apenas se registaram valores, em nove amostras, no caso do ferro e em quatro amostras, para o caso do manganês, pelo que não foi realizado um teste de comparação de médias, mas sim um teste de correlação de variáveis, em que se procurou verificar se o facto das amostras de água

apresentarem valores superiores ao recomendado pelo DL nº 306/2007 se encontrava relacionado com a fonte de captação.

Relativamente a estes parâmetros, relacionando-os com a fonte de captação, verificou-se que não apresentam diferenças significativas ($p > 0,05$) (ver Anexo XV) entre as fontes de captação, pelo que a hipótese 7, “A presença de valores superiores ao recomendado pelo DL nº 306/2007, em relação ao ferro e manganês, encontra-se relacionada com a fonte de captação de água”, não é suportada. No entanto, e uma vez que se tratam de parâmetros analisados, de forma a proceder à análise dos dados obtidos é apresentada a tabela 8.

Tabela 8: Percentagem de incumprimentos relativos ao ferro e manganês

		Manganês	Ferro
Águas subterrâneas sem tratamento	<VP	25 (86%)	24 (83%)
	>VP	4 (14%)	5 (17%)

Através da observação da tabela 8 verificamos que, em relação ao manganês, apenas 14% das amostras de água continham valores superiores ao valor paramétrico ($VP=50\mu\text{g/L}$), dados que apenas se verificaram nas águas sem tratamento. O mesmo ocorreu para o ferro, verificando-se, também, com valores superiores ao estabelecido pelo DL 306/2007 ($VP=200\mu\text{g/L}$), apenas nas águas sem tratamento, com cerca de 17%. Normalmente, o manganês surge na presença do ferro e, através da tabela 7 podemos verificar isso mesmo, pois das quatro amostras de água em que contém manganês acima do valor desejável, três continham, também, ferro acima do valor recomendado. Nestes casos, torna-se importante requerer alguma atenção, pois valores superiores de ferro e manganês conferem às águas um aspeto avermelhado. Para além disso, verifica-se que a presença de ferro promove o crescimento de ferrobactérias que, ao oxidarem o ferro ferroso (Fe^{2+}) a férrico (Fe^{3+}) favorecem a formação de depósitos viscosos nas canalizações (Louros, 1999).

4.3. Resultados e discussão da análise microbiológica

4.3.1. Apreciação dos resultados microbiológicos tendo em conta o DL nº306/2007

Após a obtenção dos resultados das análises microbiológicas, as amostras de água foram apreciadas tendo em conta os valores paramétricos definidos no DL 306/2007 (Tabela 9).

Tabela 9: Parâmetros microbiológicos avaliados e respetivo limite legal

Parâmetros	VP	*(1)	Expressão dos resultados
Número de colónias a 22°C		100	UFC/mL
Número de colónias a 37°C		20	UFC/mL
Contagem de bactérias coliformes	0		UFC/100 mL
Contagem de <i>E. coli</i>	0		UFC/100 mL
Contagem de enterococos intestinais	0		UFC/100 mL
Contagem de <i>Clostridium perfringens</i>	0		UFC/100 mL

UFC- unidades formadoras de colónias; (1)- “*” corresponde ao valor que não é desejável ultrapassar, definido no Decreto-lei nº306/2007. **Fonte:** Adaptado do DL nº306/2007.

Os resultados das análises microbiológicas foram reunidos em duas tabelas (Tabela 10 para as amostras de água com tratamento e Tabela 11 para as amostras de água sem tratamento). De acordo com o DL nº306/2007, estas águas, tal como as águas de consumo humano, deverão ter em conta os VP estabelecidos neste DL. Assim, e tendo em conta os valores definidos no mesmo, as amostras de água foram classificadas como água bacteriologicamente potável (1), água que apresenta valores superiores ao desejável para o número de colónias a 22°C e/ou a 37°C (2) e água imprópria para consumo humano (3). Ou seja, quando as amostras cumpriam os VP definidos pelo DL eram classificadas como águas bacteriologicamente potáveis; quando os resultados cumpriram todos os valores paramétricos à exceção do que o DL nº306/2007 de 27 de agosto considera como desejável para os microrganismos a 22°C e/ou a 37°C, as amostras eram classificadas como águas que apresentam valores superiores ao desejável para os microrganismos a 22°C e/ou a 37°C; por outro lado, sempre que uma amostra apresentava um ou mais resultados para os microrganismos indicadores de contaminação fecal e coliformes totais superiores ao valor paramétrico, estas eram classificadas como águas impróprias para consumo humano.

Nas tabelas 10 e 11 os valores que se encontram fora dos limites estabelecidos pelo DL foram sombreados, para que a análise das tabelas se torne mais fácil. Sombreados a rosa referem-se aos valores que ultrapassam os valores paramétricos legais, os quais não devem ser ultrapassados para que a água possa ser considerada potável, e sombreados a cinzento os valores que ultrapassam os valores indicativos mencionados no DL 306/2007 para os microrganismos a 22°C e os microrganismos a 37°C, valores estes que se forem ultrapassados não constituem condição para classificar as águas como impróprias. Importa salientar que estes devem ser comparados com valores previamente existentes para o mesmo ponto de colheita de amostra e qualquer variação deverá ser estudada quanto à causa.

De referir ainda que os resultados das análises microbiológicas correspondentes à primeira colheita (C1), e apenas estes, já se encontram publicados em Ramos (2014), na sequência do trabalho experimental de fim de curso de licenciatura que foi desenvolvido em paralelo.

Tabela 10: Resultados das análises microbiológicas das amostras de água com tratamento

Origem da água	Produtor	Colheita	MO a 22°C (Nº UFC/mL de água)	MO a 37°C (Nº UFC/mL de água)	<i>Clostridium perfringens</i> (Nº/100mL de água)	Bactérias coliformes (Nº/100mL de água)	<i>Escherichia coli</i> (Nº/100mL de água)	Enterococos intestinais (Nº/100mL de água)	A Apreciação (DL nº306/2007)
Águas da rede pública (n=14)									
Rede Pública	9	C1	1	1,7×10	0	0	0	0	1
		C2	<1	7	0	0	0	0	1
	11	C1	9,6×10	5,9×10	0	5	4	0	3
		C2	1,2×10 ²	1,6×10 ²	0	1	0	0	3
	12	C1	1,1×10 ²	1,2×10 ²	0	0	0	0	2
		C2	11	4	0	2	0	0	3
	15	C1	3	<1	0	0	0	0	1
		C2	7	5	0	0	0	0	1
	16	C1	1,7×10 ²	2,8×10 ²	2	0	0	0	3
		C2	3,4×10	8,9×10	0	0	0	0	2
	18	C1	6	<1	0	0	0	0	1
		C2	7,6×10	12	0	0	0	0	1
	20	C1	12	4	0	2	0	0	3
		C2	4,2×10	4,9×10	0	1	1	0	3
Águas subterrâneas com tratamento (n=2)									
Água subterrânea a c/ tratamento	8	C1	4,5×10	4	0	1,7×10	0	0	3
		C2	1	1	0	0	0	0	1
Nº (%) Incumprimentos			—	—	1	6	2	0	
			—	—	6%	38%	13%	0%	

(1) Água bacteriologicamente potável; (2) Apresenta valores superiores ao desejável para o número de colónias a 22°C e/ou a 37°C; (3) Água imprópria para consumo; C1 – primeira colheita; C2 – segunda colheita.

Tabela 11: Resultados das análises microbiológicas das amostras de água sem tratamento

Origem da água	Produtor	Colheita	MO a 22°C (Nº UFC/mL de água)	MO a 37°C (Nº UFC/mL de água)	<i>Clostridium perfringens</i> (Nº/100mL de água)	Bactérias coliformes (Nº/100mL de água)	<i>Escherichia coli</i> (Nº/100mL de água)	Enterococos intestinais (Nº/100mL de água)	A Apreciação (DL n.º306/2007)	
Águas subterrâneas sem tratamento (n=29)										
Furo	1	C1	5,3×10 ²	2,1×10 ²	0	3,8×10 ²	8	2,2×10	3	
		C2	1,4×10 ²	1,5×10 ²	0	2,8×10 ²	0	0	3	
	6	C1	9,1×10	9,1×10	0	0	0	0	2	
		C2	4,8×10 ³	6,4×10	0	5,0×10 ²	3,0×10 ²	2,7×10 ²	3	
	7	C1	1,0×10 ²	1,0×10 ²	0	13	0	0	3	
		C2	3,7×10	3,6×10	0	0	0	0	2	
	10	C1	4,2×10 ²	1,1×10 ³	0	2	2	9,1×10	3	
		C2	1,9×10 ³	7,9×10	0	3,2×10	8	0	3	
	14	C1	<1	3	0	0	0	0	1	
		C2	3,6×10	10	0	10	0	0	3	
	17	C1	4,5×10 ²	2,3×10 ²	0	0	0	0	2	
		C2	4,1×10	4,7×10	0	0	0	0	2	
	19	C1	3,4×10 ²	1,4×10 ²	0	3,7×10 ²	0	4,8×10	3	
		C2	7,7×10 ²	3,9×10 ²	0	2,8×10 ²	2,8×10 ²	6,4×10	3	
	21	C1	3,9×10 ²	4,0×10	0	2	2	0	3	
		C2	7,6×10 ²	2,8×10 ²	0	0	0	0	2	
	Nascente	2	C1	1,6×10 ²	8,9×10	0	2,0×10	2,0×10	1	3
			C2	9,2×10 ²	1,5×10 ²	0	3,9×10	3,1×10	1,5×10	3
3		C1	8	6	0	2,2×10	1,8×10	0	3	
		C2	1,9×10	3,6×10 ²	0	5	3	0	3	
22		C1	4,0×10	4,3×10	0	1	0	0	3	
		C2	-	-	-	-	-	-	-	
23		C1	2,5×10	1,5×10	0	0	0	0	1	
		C2	1,3×10 ²	1,5×10 ²	1	4,0×10	3,7×10	10	3	
24	C1	2,6×10 ²	3,4×10 ²	0	10	10	2,1×10	3		
	C2	8,6×10	2,4×10	0	0	0	0	2		
Mina	4	C1	3,3×10 ²	1,8×10 ²	0	1,6×10 ³	0	1	3	
		C2	7,3×10	4,3×10	0	2	0	0	3	
	5	C1	9	2	0	10	10	3	3	
		C2	5,2×10 ²	2,3×10 ²	0	2,2×10	0	0	3	
Águas superficiais sem tratamento (n=2)										
Barragem	13	C1	1,5×10 ³	6,0×10 ²	0	1,8×10	7	14	3	
		C2	6,7×10	> 3,0×10 ²	0	6	6	1	3	
Nº (%) Incumprimentos			—	—	1	23	15	13		
			—	—	3%	74%	48%	42%		

(1) Água bacteriologicamente potável; (2) Apresenta valores superiores ao desejável para o número de colónias a 22°C e/ou a 37°C; (3) Água imprópria para consumo; C1 – primeira colheita; C2 – segunda colheita.

Através da observação das tabelas 10 e 11 verifica-se que 44% (7/16) das amostras de água tratada e 74% (23/31) das amostras de água não tratada foram classificadas como águas impróprias para consumo humano. Para além disso, um total de 32 amostras (68%) apresentaram um resultado superior ao desejável pelo DL relativo ao número de microrganismos a 22°C e/ou a 37°C. Embora estes não apresentem preocupação para a saúde pública, os valores elevados podem indicar que existe um foco de contaminação, devendo ser analisadas as causas (Sousa *et al.*, 2015).

4.3.2. Análise dos resultados microbiológicos em função da fonte de captação

De seguida é apresentada a análise dos resultados dos diferentes parâmetros microbiológicos avaliados em função da fonte de captação.

Número de microrganismos a 22°C e a 37° (N° UFC/mL de água)

Através da observação dos gráficos 11 e 12 verificamos que as amostras provenientes da rede pública apresentaram um menor número de amostras com valores superiores ao desejável, tanto a 22° como a 37°C, de acordo com o DL n°306/2007, comparativamente com os resultados das amostras provenientes das águas subterrâneas sem tratamento.

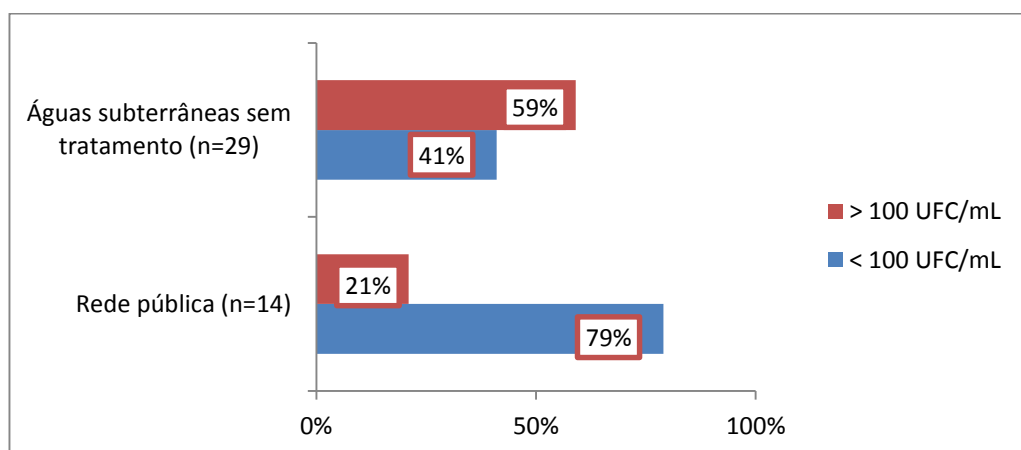


Gráfico 11: Percentagem de amostras de água da rede pública e de amostras de água subterrâneas sem tratamento com um número de microrganismos a 22°C inferior e superior a 100 UFC/mL.

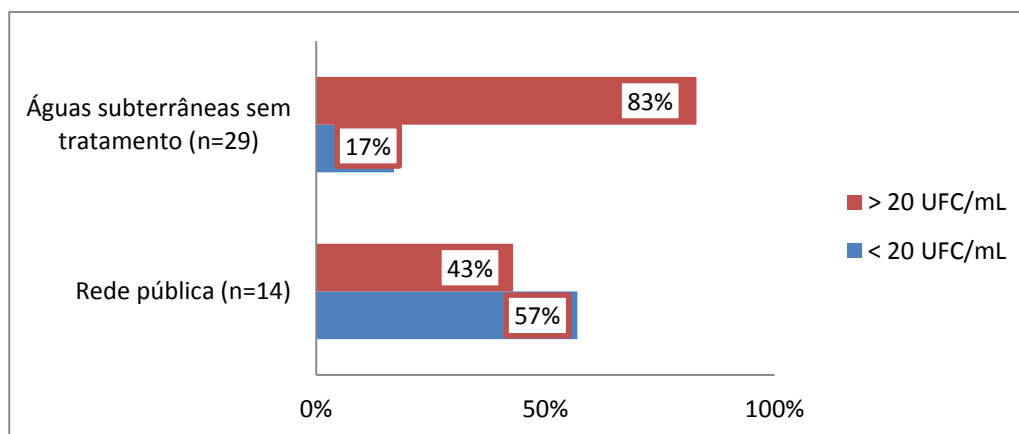


Gráfico 12: Percentagem de amostras de água da rede pública e de amostras de água subterrâneas sem tratamento com um número de microrganismos a 37°C inferior e superior a 20 UFC/mL.

A grande maioria das amostras de água provenientes das águas subterrâneas sem tratamento apresentaram valores de UFC/mL superiores ao desejável, tanto a 22^o (59% das amostras) como a 37^o (83% das amostras), facto que vai ao encontro da bibliografia pesquisada, nomeadamente Sousa *et al.* (2015) que, no estudo efetuado pelos mesmos, obtiveram 81,8% e 72,7% das amostras de águas subterrâneas com valores do número de colónias superiores ao desejável a 22^o e 37^o, respetivamente.

Em relação a estes parâmetros, e relacionando-os com a fonte de captação, a existência de amostras com um número de microrganismos superior aos valores desejáveis descritos no DL n.º306/2007, apresenta diferenças significativas ($p < 0,05$) quando relacionado com a fonte de captação (ver Anexo XVI), pelo que a hipótese 8, “A presença de colónias a 22^oC e a 37^oC, superior aos valores desejáveis recomendados pelo DL n.º 306/2007 de 27 de agosto depende da fonte de captação de água”, é suportada.

Clostridium perfringens

Clostridium perfringens é comum no trato intestinal do homem e de outros animais, encontrando-se largamente distribuído na natureza, principalmente no solo e em águas contaminadas com fezes. Tem um potencial patogénico, devido à produção de toxinas, podendo provocar dores abdominais e diarreias (Mendes e Oliveira, 2004).

Relativamente ao *Clostridium perfringens* este foi detetado em apenas 2 amostras, sendo que uma tinha como fonte de captação a rede pública e a outra era uma água subterrânea sem tratamento. Esta espécie, na forma de esporo, sobrevive a condições ambientais desfavoráveis tendo uma elevada capacidade de resistência a processos de desinfecção mais comuns, nomeadamente com cloro e dióxido de cloro. Este microrganismo é indicador de uma poluição hídrica de origem fecal remota ou intermitente (APDA, 2012d).

Em relação a este parâmetro e, relacionando-o com a fonte de captação, não apresenta diferenças significativas ($p>0,05$) quando relacionado com a fonte de captação (ver Anexo XVI), pelo que a hipótese 9, “A presença de *Clostridium perfringens* depende da fonte de captação de água”, não é suportada.

Tal como já foi referido, uma das amostras que se apresentou contaminada era originária da rede de distribuição, e, por esse motivo, este caso merece uma cuidadosa análise uma vez que esta água, para além da utilização dada para a higiene dos utensílios e equipamentos de ordenha, é consumida pelo produtor e por toda a população abastecida pelo mesmo circuito de distribuição. O DL nº 306/2007 refere que, caso se verifique um incumprimento deste parâmetro, deve-se investigar todo o sistema de abastecimento para identificar existência de risco para a saúde humana. Foi verificado que esta água é proveniente da rede de distribuição do concelho de Proença-a-Nova. Assim, foi realizada uma consulta dos editais “Qualidade da água na rede de distribuição do concelho de Proença-a-Nova” tendo-se verificado 50% de análises em incumprimento para este parâmetro no edital do 1º trimestre de 2014 e 9% de incumprimentos no edital do 3º trimestre de 2014. Foi igualmente verificado que nos dois editais já publicados de 2015, relativos ao 1º e 2º trimestres, não se observaram incumprimentos para este parâmetro, o que nos leva a supor que a origem dos incumprimentos verificados já esteja corrigida. Este resultado está de acordo com a repetição da análise que fizemos (C2), em outubro/novembro, a qual apresentava um resultado para a contagem de *Clostridium perfringens* (UFC/100mL de água) inferior ao VP.

Bactérias coliformes e *Escherichia coli*

Em relação à contagem de bactérias coliformes, observaram-se diferenças significativas ($p<0,05$) quando relacionada com a fonte de captação, pelo que foi suportada a hipótese 10 “A presença de bactérias coliformes depende da fonte de captação de água”.

A análise estatística para o parâmetro da *E. coli* não mostrou uma diferença significativa ($p=0,05$) para a presença de *Escherichia coli* quando relacionada com a fonte de captação (ver Anexo XVI), pelo que a hipótese 13, “A presença de *Escherichia coli* depende da fonte de captação de água”, não foi suportada.

De forma a tornar perceptível a importância dos parâmetros descritos, quando comparados com a fonte de captação, foi elaborado o gráfico 13, que nos mostra a percentagem de amostras que violam o valor paramétrico para as bactérias coliformes e *E. coli*.

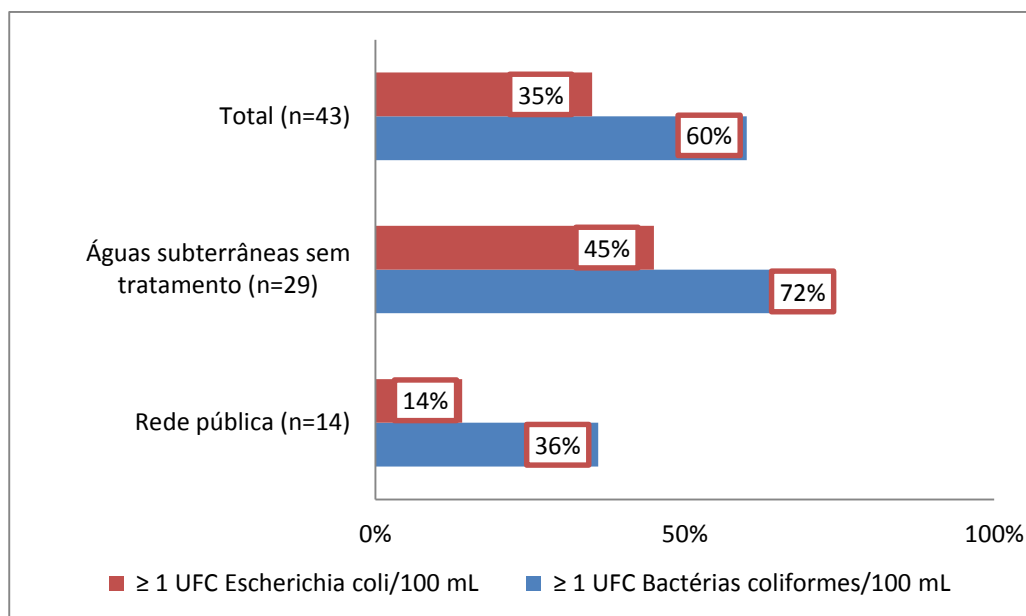


Gráfico 13: Percentagem de amostras em incumprimento ($\geq 1\text{UFC}/100\text{mL}$) relativamente aos parâmetros bactérias coliformes e *E. coli* em amostras de água da rede pública e em amostras de água subterrâneas sem tratamento

Através da observação do gráfico 13 verificamos que 36% das amostras provenientes da rede pública e 72% das amostras de águas subterrâneas sem tratamento apresentaram valores superiores ao legislado (0 UFC/100mL) para as bactérias coliformes. É de referir que 40% (2/5) das amostras da rede pública que apresentam uma contagem de bactérias coliformes superior ao limite legal (0 UFC/100mL) ultrapassam, também, o limite legal para a contagem de *E. coli* (0 UFC/100mL). O mesmo acontece com 62% (13/21) das amostras de águas subterrâneas sem tratamento. Este facto vai ao encontro da bibliografia pesquisada, nomeadamente Sousa *et al.* (2015) que, no estudo efetuado pelos mesmos em águas de captações privadas do distrito de Castelo Branco, obtiveram em 54,5% das amostras de águas subterrâneas sem tratamento valores de bactérias coliformes e *E. coli* superiores ao recomendado pelo DL n^o306/2007. Porto *et al.* (2011) verificaram que 11,5% das amostras de água provenientes da rede pública no Brasil apresentavam valores de bactérias coliformes superiores ao VP.

Através da análise do gráfico 13 verificamos, também, que 14% (2/14) das amostras provenientes da rede pública e 45% (13/29) das amostras de águas subterrâneas sem tratamento apresentaram valores superiores ao legislado (0 UFC/100mL) para a *E. coli*. Importa salientar que esta bactéria é considerada o mais específico indicador de contaminação fecal recente, e da eventual presença de organismos patogénicos, indicando a necessidade de estudo desse parâmetro, para eliminar a contaminação por origem fecal (Amorim & Porto, 2001).

Enterococos intestinais

Em relação a este parâmetro, e relacionando-o com a fonte de captação, observaram-se diferenças significativas ($p < 0,05$) (ver Anexo XVI), pelo que a hipótese 12, “A presença de enterococos intestinais depende da fonte de captação de água”, é suportada.

De forma a tornar perceptível a importância nos parâmetros descritos, quando comparados com a fonte de captação, foi elaborado o gráfico 14.

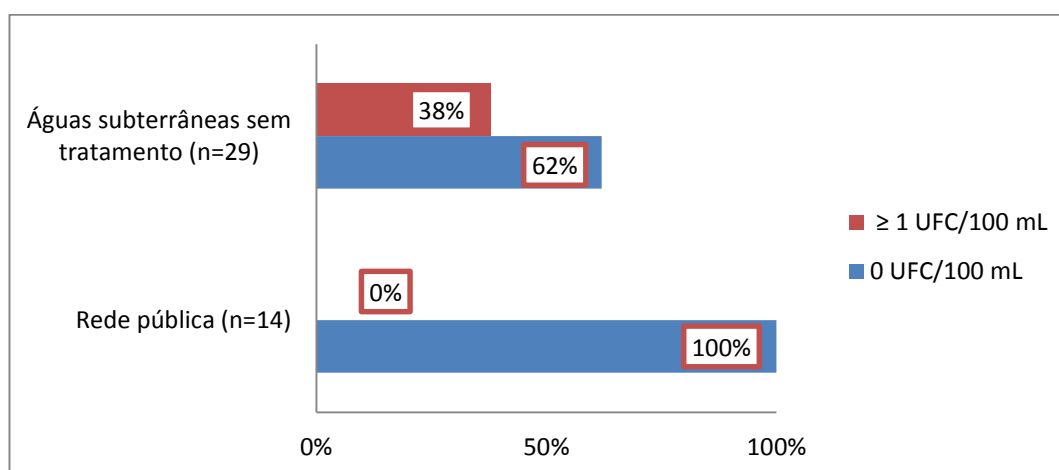


Gráfico 14: Percentagem de amostras em incumprimento ($\geq 1\text{UFC}/100\text{mL}$) relativamente ao parâmetro enterococos intestinais em amostras de água da rede pública e em amostras de água subterrâneas sem tratamento

Através da observação do gráfico 14 verificamos que os enterococos intestinais foram apenas detetados nas águas subterrâneas sem tratamento (38%;n=11). Já no estudo efetuado por Sousa *et al.* (2015) foi verificado que 54,5% das amostras de água analisadas, provenientes de águas subterrâneas, se encontravam contaminadas por estas bactérias.

Os enterococos intestinais são indicadores de contaminação fecal recente, com viabilidade na água por um curto período de tempo, no entanto, por um intervalo de tempo superior ao da espécie *E. coli* (WHO, 2006), pelo que, quando presentes na água, deve ser realizado um estudo de forma a serem investigadas as possíveis causas de contaminação Sousa *et al.* (2015).

4.3.3. Contagem de *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas spp.*

De acordo com a legislação em vigor, a pesquisa e contagem de *Pseudomonas aeruginosa* é apenas realizada para águas engarrafadas (DL nº 306/2007) no entanto, a presença destas bactérias no leite tem vindo a ser associada a um dos problemas que

afeta a qualidade dos queijos, nomeadamente o surgimento de manchas à superfície (Lerich e Fayolle, 2012). Para além de *Ps. aeruginosa*, outras espécies do género *Pseudomonas* podem igualmente induzir defeitos graves, como a coloração amarelada, verde acastanhado ou azul na superfície dos queijos. Para além disso, estes microrganismos podem, ainda, atrasar a maturação dos queijos, promover sabor e textura indesejáveis e levar, desta forma, à depreciação do produto (Lerich e Fayolle, 2012).

Assim, numa primeira fase, efetuámos a contagem de *Ps. aeruginosa* e de *Pseudomonas* spp. com o intuito de conhecer o grau de contaminação da água usada nas explorações que fornecem leite a uma queijaria, água essa que é usada na higienização diária do equipamento e utensílios que contactam com o leite (Tabela 12). Isolados bacterianos de culturas características de *Pseudomonas* spp. nos meios de cultura usados nesta análise foram posteriormente purificados e caracterizados.

A contagem deste microrganismo foi, apenas, efetuada na segunda colheita, em outubro/novembro, um total de 23 amostras de água.

Tabela 12: Resultados da contagem de *Ps. aeruginosa* e *Pseudomonas* spp. nas amostras de água colhidas em outubro/novembro (n=23)

Fontes de Captação	Produtor	<i>Pseudomonas</i> spp. (UFC/100mL de água)	<i>Ps. aeruginosa</i> (UFC/100mL de água)
Rede Pública (n=7)	9	0	0
	11	0	0
	12	6	0
	15	24	0
	16	> 80	0
	18	0	0
	20	57	0
Águas subterrâneas sem tratamento (n=14)	1	0	0
	6	19	19
	7	0	0
	10	13	0
	14	2	0
	17	3	0
	19	360	0
	21	0	0
	2	15	0
	3	7	0
	24	30	0
	23	> 80	0
	4	34	0
	5	3	0
Águas superficiais sem tratamento (n=1)	13	6	0
Águas subterrâneas com tratamento (n=1)	8	0	0
Total de amostras com ≥ 1UFC/100mL (%)		16 (70%)	1 (4%)

Através da observação da tabela 12 verificamos que, das 23 amostras de água analisadas para este parâmetro, a grande maioria (70%), encontra-se contaminada por *Pseudomonas* spp. Em relação à espécie *Pseudomonas aeruginosa* importa salientar que, apenas no produtor 6, foi possível a sua confirmação, o que corresponde a 4% dos produtores. Este produtor usa água não tratada de furo, produz leite de ovelha e faz a ordenha manual. Pela observação da tabela 11 podemos constatar que a água deste produtor, de todas as analisadas microbiologicamente, é a que apresentou as contagens mais elevadas para microrganismos a 22°C ($4,8 \times 10^2$ UFC/mL), microrganismos a 37°C ($6,4 \times 10^2$ UFC/mL), coliformes totais ($5,0 \times 10^2$ UFC/100mL), *E. coli* ($3,0 \times 10^2$ UFC/100mL) e enterococos intestinais ($2,7 \times 10^2$ UFC/100mL), o que prova que esta água é de muito má qualidade, com os valores paramétricos de todos os parâmetros, à exceção de *Clostridium perfringens*, ultrapassados. Do ponto de vista da avaliação físico-química, esta água cumpre todos os VP à exceção do pH cujo valor é de 5,8.

Para além do produtor 6, destacamos, também, a água do produtor 19 pelo facto de ser esta a amostra com a contagem mais elevada de *Pseudomonas* spp. ($3,6 \times 10^2$ UFC/100mL). Esta também é uma água não tratada de furo, usada na exploração de leite de ovelha do produtor 19 para a higienização da máquina de ordenha e outros utensílios e equipamentos que contactam com o leite. À semelhança do que sucede com o produtor 6, também a água do produtor 19 apresenta contagens elevadas e superiores aos VP para microrganismos a 22°C ($7,7 \times 10^2$ UFC/mL), microrganismos a 37°C ($3,9 \times 10^2$ UFC/mL), coliformes totais ($2,8 \times 10^2$ UFC/100mL), *E. coli* ($2,8 \times 10^2$ UFC/100mL) e enterococos intestinais ($6,4 \times 10^2$ UFC/100mL).

Em relação a este parâmetro, e relacionando-o com a fonte de captação, a presença de *Pseudomonas* spp. não apresenta diferenças significativas ($p > 0,05$) quando relacionada com a fonte de captação (ver Anexo XVII), pelo que a hipótese 11, “A presença de *Pseudomonas* spp. depende da fonte de captação de água”, não é suportada. No entanto, Cerqueira *et al.*, (2006) realçam a relação existente entre a contaminação do leite por estes microrganismos e a água utilizada nas superfícies e equipamentos que entram em contacto com o mesmo, sendo que, para os autores, as contagens destes microrganismos aumentam significativamente em águas de baixa qualidade. Em concordância com o referido por estes autores, verificámos uma maior percentagem de amostras de água não tratada contaminadas com *Pseudomonas* spp. em relação às amostras de água tratada (Gráfico15).

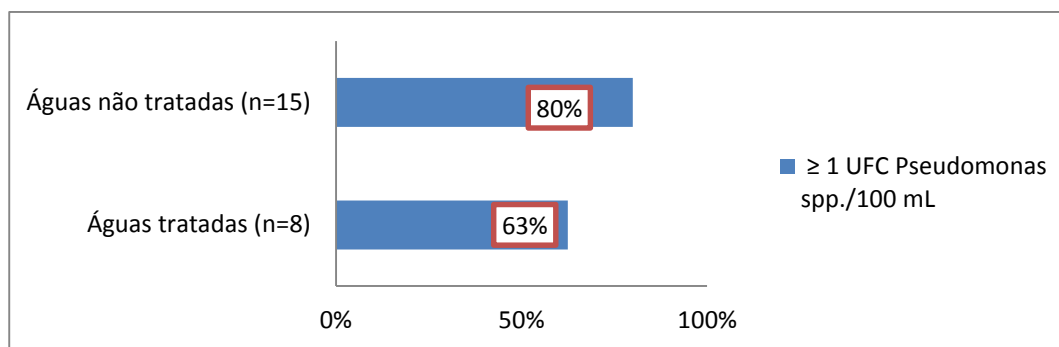


Gráfico 15 - Percentagem de amostras com contagem de *Pseudomonas* spp. ≥ 1 UFC/100mL em amostras de água com e sem tratamento

A formação de biofilmes nos equipamentos da indústria de laticínios pode levar à contaminação dos alimentos por microrganismos patogénicos ou por microrganismos de deterioração, sendo que as *Pseudomonas fluorescens* são particularmente importantes como bactérias de deterioração para os fabricantes de laticínios devido à produção de enzimas extracelulares (Lindsay *et al.*, 2002).

Num trabalho realizado por Heras *et al.* (1999) foi possível identificar *Pseudomonas aeruginosa* em 17 amostras de leite sendo que o equipamento de ordenha, que foi lavado com água contaminada, foi referido como uma das possíveis causas de contaminação. Júnior e Beloti (2012) mencionam que falhas na higiene das instalações e da ordenha é um dos fatores predisponentes à contaminação. Por isso, Ponciano (2010) refere que a monitorização regular da qualidade da água proveniente de origens não controladas é uma prioridade.

Relação entre bactérias coliformes e *Pseudomonas* spp.

Uma vez que as *Pseudomonas* spp. são das bactérias psicrótróficas mais importantes no que diz respeito à qualidade do leite, e sabendo que no estudo realizado por Leriche e Fayolle em 2012 estes autores obtiveram uma correlação positiva ($P < 0,0001$, $R^2 = 0,31$) entre as *Pseudomonas* e as bactérias coliformes, tentou-se verificar se, no nosso caso, a correlação era também positiva e de que forma estavam correlacionadas. Para além disso, Leriche e Fayolle (2012) referem que quando esta correlação é observada, tal facto explica-se por más práticas de higiene, que irão ter consequências negativas na qualidade do leite.

Após a análise estatística dos nossos dados verificámos que a correlação entre as *Pseudomonas* spp. e as bactérias coliformes também foi significativa ($p < 0,05$), verificando-se existir relação entre estes dois microrganismos nas amostras analisadas (ver Anexo XVIII), pelo que a hipótese 14, “Existe correlação entre a presença de bactérias coliformes e a presença de *Pseudomonas* spp.”, é suportada.

4.3.4. Caracterização de isolados de *Pseudomonas* spp. e potencial para promover defeitos de cor em queijos

Culturas características de *Pseudomonas* spp. nos meios de cultura usados nesta análise foram isoladas, purificadas e caracterizadas. Foi obtido um total de 83 isolados presumíveis *Pseudomonas* spp., obtidos inicialmente a partir do meio de cultura seletivo CN Agar para *Pseudomonas*. Destes, um grupo selecionado de 20 isolados (pelo menos um isolado por amostra com colónias características) foram identificados ao nível específico, com recurso à galeria bioquímica miniaturizada API 20NE (Figura 7), tendo sido identificadas três espécies de *Pseudomonas* (*Ps. fluorescens* – 60%; *Ps. putida* – 10%; *Ps. aeruginosa* – 5%) (Gráfico 16). Quatro dos isolados pertenciam a microrganismos próximos do género *Pseudomonas*, nomeadamente *Brevundimonas diminuta*/*Oligella urethralis* (15%) e *Burkholderia pseudomallei*/*Pseudomonas fluorescens* (5%). Um dos isolados não obteve identificação com o API 20NE.



Figura 7: Identificação de uma cultura desconhecida como *Pseudomonas aeruginosa*, através da utilização de uma galeria bioquímica API 20NE

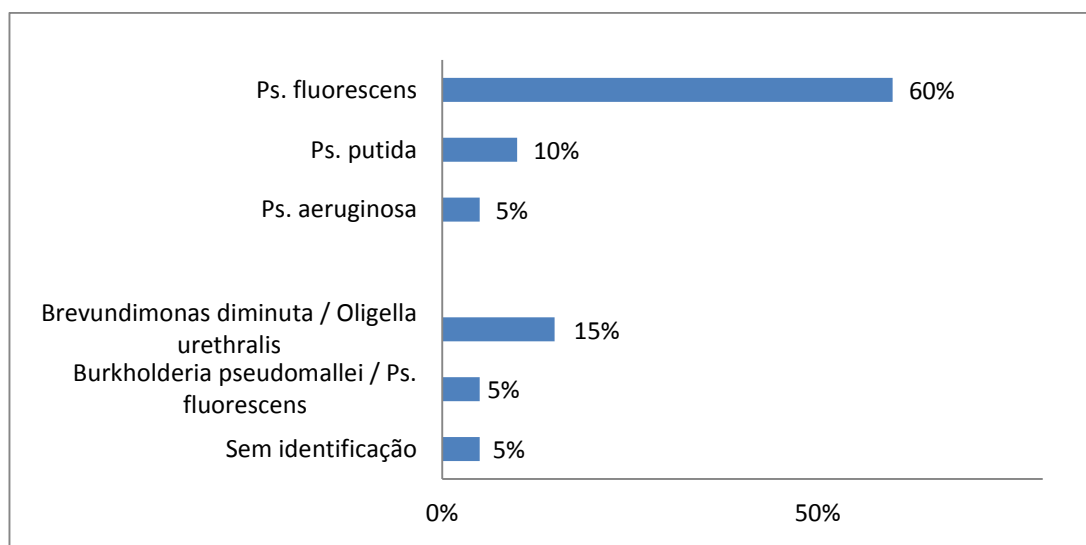


Gráfico 16: Frequência relativa (%) de espécies identificadas entre os 20 isolados identificados com recurso ao API 20NE

A perda de qualidade devido à multiplicação destas bactérias no queijo pode traduzir-se por alterações do aspeto, textura, *flavor* e aroma (Lerliche e Fayolle, 2012), as quais conduzem a elevadas perdas económicas. Para além deste aspeto, a presença de algumas espécies, como *Pseudomonas aeruginosa*, constitui um problema de saúde pública pelo facto desta bactéria ser considerada um microrganismo patogénico oportunista para o Homem e os animais (Arslan *et al.*, 2011). No que toca às alterações do aspeto, *Pseudomonas fluorescens* tem sido frequentemente associada a alterações importantes da cor da superfície dos queijos devido à produção por esta espécie de vários pigmentos (Martin *et al.*, 2011).

Em relação à *Brevundimonas diminuta*, Zhang *et al.* (2014) referem que a presença desta pode aumentar a probabilidade de mastite em vacas leiteiras e Han e Andrade (2005) verificaram que esta espécie contribui para o desenvolvimento de infeções na pessoa com doença oncológica.

Tendo em conta que a água é considerada a principal fonte de contaminação do leite por *Pseudomonas spp.*, que as espécies deste género estão associadas a defeitos de cor da superfície dos queijos (Tormo *et al.*, 2004), e que os queijos produzidos na queijaria em estudo são produzidos a partir de leite cru (sem qualquer tratamento térmico que destrua estes microrganismos), entendeu-se pertinente avaliar a capacidade dos 83 isolados presumíveis *Pseudomonas spp.* produzirem pigmentos fluorescentes nos meios de cultura seletivos *King B Agar*, *CN Agar* para *Pseudomonas* e *Cetrimide Agar*, e escurecerem o meio de cultura Agar Queijo (Carreira *et al.*, 1998). Este meio tem na sua composição queijo curado (200g/L de meio) e o escurecimento deste meio após a sua inoculação com as culturas testadas é um bom meio para avaliar o seu potencial como agentes do acastanhamento da casca do queijo.

Pela observação do gráfico 17 podemos constatar que a grande maioria dos isolados caracterizados tem potencial para promover defeitos de cor na superfície dos queijos que venham a ser produzidos com leite contaminado com as águas a partir das quais foram obtidos os isolados.

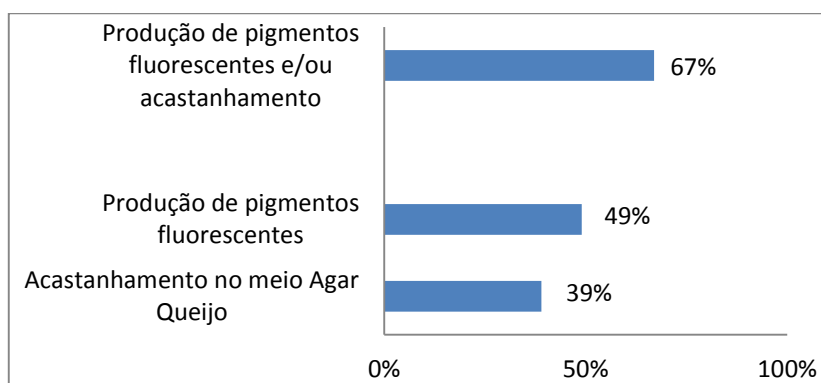


Gráfico 17: Frequência relativa (%) dos isolados (n=23) com capacidade para produzirem pigmentos fluorescentes e/ou promoverem o acastanhamento no meio Agar Queijo

Na figura 8 podemos observar culturas crescidas no meio de cultura King B Agar e no meio Agar Queijo. Neste último caso é possível observar na mesma placa de Petri culturas que promoveram o acastanhamento do meio e culturas que não apresentam esta característica. As fotografias foram tiradas no verso das placas de Petri.

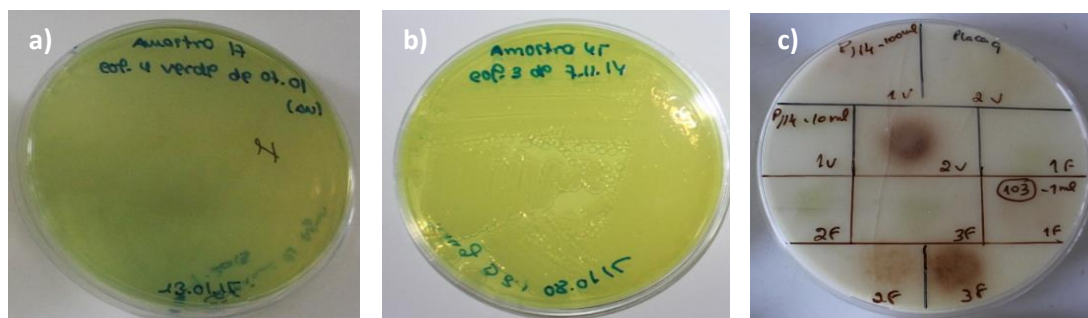


Figura 8: Aspeto de culturas de *Ps. aeruginosa* (a) e *Ps. fluorescens* (b) no meio King B e de culturas de *Pseudomonas* spp. em Agar Queijo (c)

4.3.5. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* numa amostra de água de leite e no ambiente

No decorrer do trabalho foi, também, alvo de estudo a pesquisa de *Listeria monocytogenes* numa amostra de água do produtor 24, uma vez que na altura em que este trabalho estava a decorrer foi identificada esta bactéria numa amostra de leite cru produzido nessa exploração. Assim, pretendeu-se perceber se a *Listeria monocytogenes* estava presente no leite devido a alguma contaminação proveniente da água utilizada nas lavagens ou nalgum dos utensílios ou equipamentos utilizados. Para isso, foi realizada a pesquisa numa amostra de água, numa amostra de leite e recorreu-se, também, à colheita de cinco amostras ambientais através de zangaratoas em superfícies (base do tanque, homogeneizador do tanque, torneira do tanque, fundo da bilha e fundo de um balde). No entanto, observou-se que, em todas as amostras, o resultado foi negativo para a pesquisa de *Listeria monocytogenes*.

Apesar de termos verificado ausência de *L. monocytogenes* na amostra de água, o mesmo não aconteceu para o género *Listeria* spp. Após o enriquecimento de 25mL da amostra de água foram isoladas colónias características de *Listeria* spp. quer em ALOA Agar quer em Oxford Agar. Após a realização dos testes de confirmação (hemólise, teste CAMP) e a caracterização bioquímica com o API Listeria foi possível concluir que a amostra de água se encontrava contaminada com duas outras espécies, *Listeria ivanovii* e *L. seeligeri*. O facto de se terem isolado duas espécies de *Listeria* a partir da mesma amostra leva-nos a pensar que a mesma foi contaminada por mais do que uma fonte. Uma possível fonte de contaminação da água subterrânea em zonas de exploração pecuária poderá ser a infiltração através do solo de bactérias presentes nas

fezes dos animais, alguns dos quais podendo excretar microrganismos patogénicos como *L. monocytogenes* de forma assintomática (Pintado *et al.*, 2009).

De acordo com os autores Linke *et al.* (2014), o solo e a água demonstram representar nichos cruciais para a transmissão de *Listeria monocytogenes*. No estudo realizado pelos mesmos, 467 amostras de solo e 68 de água foram recolhidas em 12 sítios geológicos e ecológicos distintos na Áustria, de 2007 a 2009, tendo-se verificado a presença de *Listeria* em 30% e 26% das amostras de solo e água, respetivamente. Neste estudo as espécies dominantes no solo e na água foram *L. innocua*, *L. ivanovii* e *L. seeligeri*.

Apesar das amostras analisadas terem apresentado um resultado negativo para a pesquisa de *Listeria monocytogenes*, seria importante continuar a realizar essa análise, devendo haver um acompanhamento mais frequente a este produtor uma vez que se verificou a presença de *L. ivanovii*. De acordo com González-Zorn *et al.* (1999), *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* têm propriedades de virulência idênticas, contudo diferem na patogenicidade. Enquanto a *L. monocytogenes* provoca listeriose numa grande variedade de animais de sangue quente, incluindo aves, mamíferos e o Homem, a *L. ivanovii* afeta, quase exclusivamente, os ruminantes.

4.4. Resumo dos resultados do modelo conceptual

Tendo em conta o modelo conceptual e os resultados obtidos neste estudo foi realizada a figura 9, que mostra, de uma forma genérica, os resultados obtidos. Assim, nas hipóteses em que foi obtida correlação entre as variáveis foi colocado (+), nas hipóteses em que não foi verificada correlação entre as variáveis foi colocado (-).

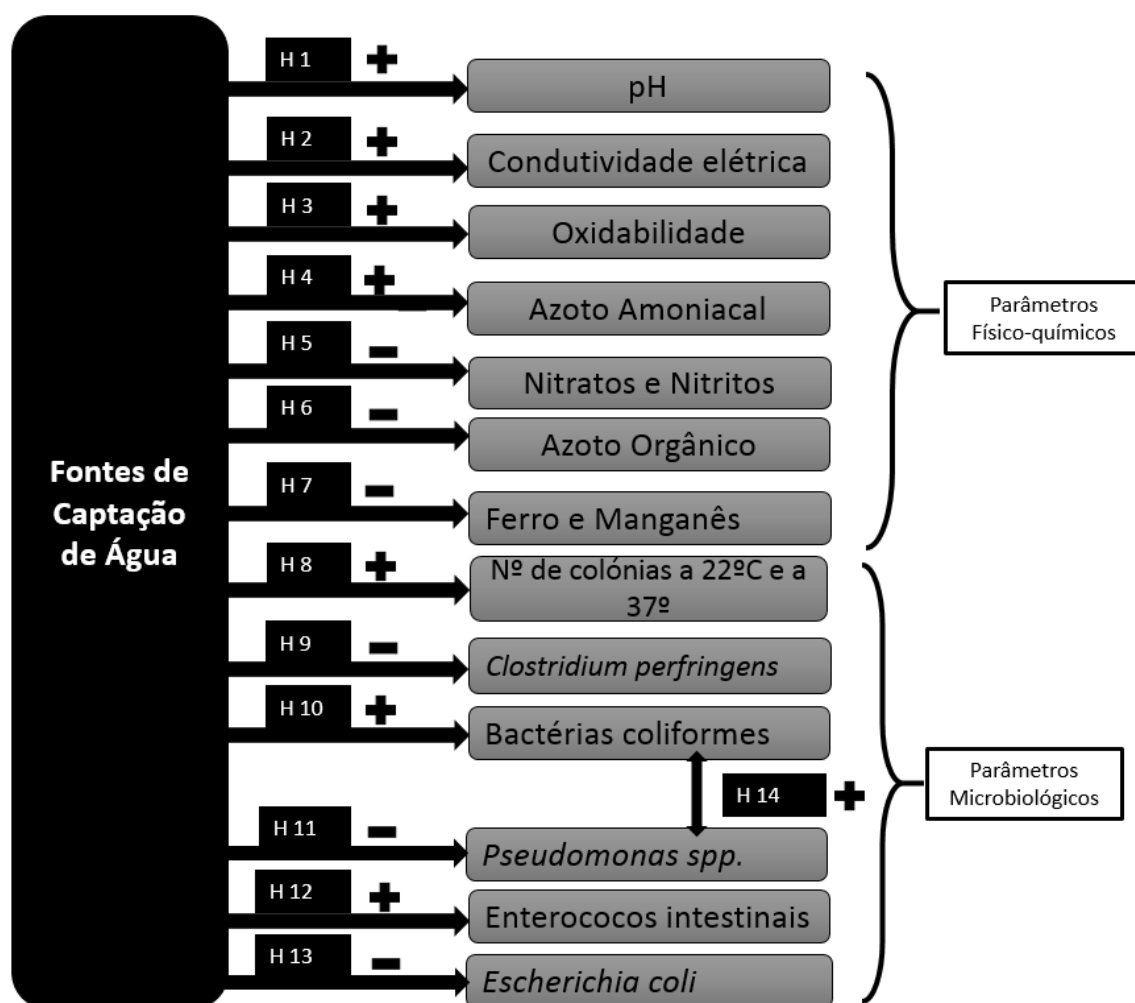


Figura 9 - Síntese dos resultados das correlações testadas

Em relação às hipóteses testadas, foi verificada correlação entre a variável independente fonte de captação e as variáveis dependentes pH, condutividade elétrica, oxidabilidade, azoto amoniacal, nº de colónias a 22°C e 37°C, bactérias coliformes e enterococos intestinais. Pelo contrário, não foi obtida correlação entre a fonte de captação e as variáveis nitratos e nitritos, azoto orgânico, ferro e manganês, *Clostridium perfringens*, *Pseudomonas spp.* e *Escherichia coli*. A hipótese que correlacionava a presença de bactérias coliformes com a presença de *Pseudomonas spp.* foi suportada.

5. Considerações finais

Este trabalho incidiu numa empresa sediada na Beira Baixa, produtora de queijos, que conta com 40 produtores de leite, sendo que apenas foram tidos em consideração para o estudo 24. Foram realizadas duas análises a cada produtor, em alturas do ano diferentes (maio/junho e primeira colheita e outubro/novembro a segunda colheita). Das 47 amostras de água realizadas, a grande maioria (62%) eram provenientes de águas subterrâneas sem tratamento.

Das 14 hipóteses testadas, em 8 foi verificada correlação entre as variáveis, pela que as hipóteses que correlacionavam a fonte de captação com o pH, condutividade elétrica, oxidabilidade, azoto amoniacal, nº de colónias a 22°C e 37°C, bactérias coliformes e enterococos intestinais foram suportadas, assim como a hipótese que correlacionava a presença de bactérias coliformes com a presença de *Pseudomonas* spp. Pelo contrário, em 6 hipóteses testadas não foram obtidas correlações entre as variáveis, ou seja não foi obtida correlação entre a fonte de captação e as variáveis nitratos e nitritos, azoto orgânico, ferro e manganês, *Clostridium perfringens*, *Pseudomonas* spp. e *Escherichia coli*.

Através do estudo efetuado verificou-se que, com base nos parâmetros físico-químicos indicados no DL nº306/2007 para uma água de consumo e que seja destinada à indústria alimentar, relativamente às 47 amostras de água analisadas referente aos parâmetros físico-químicos, 31% (n=5) e 65% (n=20) das amostras analisadas com tratamento e sem tratamento, respetivamente, apresentam resultados insatisfatórios para a qualidade da água, verificando-se o maior número de incumprimentos (n=15) a nível do parâmetro de pH.

Em relação aos parâmetros microbiológicos indicados no Decreto-lei nº306/2007 para uma água de consumo humano e que seja destinado à indústria alimentar, foi verificado que a grande maioria das amostras analisadas 44 % (n=7) e 74% (n=23) apresentam resultados incompatíveis com os requisitos estabelecidos pelo DL nº306/2007 para consumo humano, sendo que os maiores números de incumprimentos se verificam nos coliformes totais (n=29; 62%). É de salientar, que foi detetado *Clostridium perfringens* numa amostra de rede pública. Este resultado merece uma cuidadosa e minuciosa análise uma vez que esta água, para além da utilização dada para a higiene dos utensílios e equipamentos de ordenha, é consumida pelo produtor e por toda a população das localidades próximas. Relativamente à pesquisa de *Pseudomonas* spp. foi verificado que, das 23 amostras de água, a grande maioria (70%) encontrava-se contaminada por *Pseudomonas* spp., sendo que apenas foi isolada *Pseudomonas aeruginosa* num único produtor. Para além disso, dos isolados presumíveis *Pseudomonas* spp., foi verificado que produziram alterações na coloração dos meios de cultura, pelo que, poderão promover defeitos a nível da coloração à superfície dos queijos.

Em relação à pesquisa de *Listeria monocytogenes*, apesar de todas as amostras analisadas terem apresentado um resultado negativo na identificação da mesma, seria importante continuar a realizar essa análise, devendo ser realizado um acompanhamento mais cuidadoso ao produtor identificado pela empresa.

Com a realização deste trabalho torna-se visível a importância da qualidade da água que os produtores de leite utilizam para a higienização do local e utensílios de ordenha, verificando-se que, no caso de águas não tratadas, há sempre alguma incerteza quanto à potabilidade da água, tornando-se necessárias análises regulares para assegurar um controlo mais efetivo. Assim propõe-se a realização de um trabalho interativo de promoção da saúde junto à população do meio rural, instruindo-a sobre a importância da qualidade da água utilizada nas propriedades, a adoção de medidas para protegê-la e o tratamento das águas comprometidas, visando minimizar a ocorrência de doenças de origem hídrica e a melhoria da qualidade do leite produzido nessas propriedades.

A grande limitação deste estudo prende-se com o número diminuído de amostras, mas principalmente, com o facto de apenas duas amostras de água serem obtidas através de águas subterrâneas com tratamento e, duas amostras de água serem obtidas de águas superficiais sem tratamento, impossibilitando a inclusão destas nos testes de correlação efetuados, por não ser significativo. Desta forma, pensamos que será pertinente a inclusão destes grupos para futuros estudos, assim como comparar estes resultados com outros obtidos através de produtores de leite de outra empresa.

6. Referências bibliográficas

- Abelho, M. (2010). *Manual de Monitorização Microbiológica Ambiental I- Qualidade Microbiológica da Água*. Curso de Especialização Tecnológica em Qualidade Ambiental. Instituto Politécnico de Coimbra. Acedido a 22/06/2015. Disponível em: http://www.esac.pt/Abelho/Monitor_ambiental/Manual%20parte%202.pdf
- Amenu, K., Spengler, M., Markemann, A. & Zárate, A. (2014). Microbial quality of water in rural households of Ethiopia: Implications for milk safety and public health. *Journal of Health, Population and Nutrition*, 32(2):190-197
- Amorim, M. & Porto, E. (2001). *Avaliação da qualidade bacteriológica das águas de cisternas: estudo de caso no município de Petrolina*. 3º Simpósio Brasileiro De Captação De Água De Chuva No Semi-Árido. Acedido a 20/08/2015. Disponível em: http://www.abcmac.org.br/files/simpósio/3simp_miriamcleide_avaliacaodaqualidadebacteriologica.pdf
- APDA (2012a). *FT-QI-05 – Ferro*. Associação Portuguesa de Distribuição e Drenagem de Águas. Acedido a 22/06/2015. Disponível em: http://www.apda.pt/site/upload/FT-QI-05-Ferro_21102012.pdf
- APDA (2012b). *FT-MB-03 – Escherichia coli*. Associação Portuguesa de Distribuição e Drenagem de Águas. Acedido a 22/06/2015. Disponível em: http://www.apda.pt/site/ficheiros_eventos/201212041542-ft_mb_03_escherichia_coli.pdf
- APDA (2012c). *FT-QI-07 – Oxidabilidade*. Associação Portuguesa de Distribuição e Drenagem de Águas. Acedido a 22/06/2015. Disponível em: http://www.apda.pt/site/upload/FT-QI-07-Oxidabilidade_23102012.pdf
- APDA (2012d). *FT-MB-05 – Clostridium perfringens*. Associação Portuguesa de Distribuição e Drenagem de Águas. Acedido a 22/06/2015. Disponível em: http://www.apda.pt/site/ficheiros_eventos/201212041543-ft_mb_05_clostridium_perfringens.pdf
- APDA (2012e). *FT-MB-04 - Enterococos intestinais*. Associação Portuguesa de Distribuição e Drenagem de Águas. Acedido a 22/06/2015. Disponível em: http://www.apda.pt/site/ficheiros_eventos/201212041543-ft_mb_04_enterococos_intestinais.pdf
- APDA (2013a). *FT-QI-18 – Manganês*. Associação Portuguesa de Distribuição e Drenagem de Águas. Acedido a 22/06/2015. Disponível em: http://www.apda.pt/site/ficheiros_eventos/201311151218-ft_qi_18_manganes.pdf
- APDA (2013b). *FT-QI-13 – Amónio*. Associação Portuguesa de Distribuição e Drenagem de Águas. Acedido a 22/06/2015. Disponível em: <http://www.apda.pt/site/upload/FT-QI-13-Amonio.pdf>
- APDA (2013c). *FT-QI-15 - Nitratos*. Associação Portuguesa de Distribuição e Drenagem de Águas. Acedido a 22/06/2015. Disponível em: http://www.apda.pt/site/ficheiros_eventos/201302261001-ft_qi_15_nitratos.pdf
- APDA (2013d). *FT-QI-14 – Nitritos*. Associação Portuguesa de Distribuição e Drenagem de Águas. Acedido a 22/06/2015. Disponível em: http://www.apda.pt/site/ficheiros_eventos/201302261000-ft_qi_14_nitrito.pdf
- Arizona Department of Health Services. (2015). *Waterborne Diseases*. Acedido a 18/07/2015. Disponível em: <http://www.azdhs.gov/phs/oids/epi/waterborne/list.htm>
- Arslan, S., Eyi, A. & Ozdemir, F. (2011). Spoilage potentials and antimicrobial resistance of *Pseudomonas* spp. *Journal of Dairy Science*, 94(12):5851-5856

Beleza, J. (2005). *Simulação das Concentrações de Cloro Residual e Trihalometanos em Redes de Distribuição de Água para Consumo Humano*. Dissertação apresentada para obtenção do grau de mestre em Engenharia do Ambiente. Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto.

Brás, M. (2013). *Caracterização das águas de Trás-os-Montes. Estudo comparativo dos resultados da Terra Fria e da Terra Quente*. Dissertação apresentada para obtenção do grau de mestre em Tecnologia Ambiental. Escola Superior Agrária de Bragança.

CAP.(2009). *Código de boas práticas na exploração pecuária*. Lisboa. Acedido a 22/06/2015. Disponível em:
http://www.cap.pt/0_users/file/Agricultura%20Portuguesa/Pecuaria/Exploracao%20Pecuaria/Codigo%20Boas%20Praticas%20Exploracao%20Pecuaria%202009.pdf

Carreira, A., Paloma, A., & Loureiro, V. (1998). Pigment producing yeasts involved in a brown surface discoloration of ewes' cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 41: 223-230.

Cerf, O., Donnat, E., Farm HACCP Working Group. (2011). Application of hazard analysis – Critical control point (HACCP) principles to primary production: what is feasible and desirable? *Food control*, 22:1839-1843.

Cerqueira, M., Picinin, L., Fonseca, L., Souza, M., Leite, M., Penna, C. & Rodrigues, R. *Qualidade da água e seu impacto na qualidade microbiológica do leite*. Acedido a 21/08/2015. Disponível em <http://cbql.com.br/biblioteca/cbql2/IICBQL273.pdf>

Chye, F., Abdullah, A. & Ayob, M. (2004). Bacteriological quality and safety of raw milk in Malaysia. *Food Microbiology*, 21 (5):535-41.

Decreto –Lei nº306 de 27 de Agosto. Diário da República. 1ª série. nº 164. Ministério do ambiente, do ornamento do território e do desenvolvimento regional.

Donnelly, C. (2001). *Listeria monocytogenes*: A continuing challenge. *Nutrition Reviews*, 59 (6): 183-194.

Duarte, P. (2011). *Microrganismos Indicadores de Poluição Fecal em Recursos Hídricos*. Monografia apresentada para obtenção de Pós-Graduação em Microbiologia. Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais

EFSA (2015). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA Journal*. 13(1):3991.

ERSAR (2011). *A reforma dos serviços de águas em Portugal. Trabalho apresentado no seminário – Política da água: da progressiva harmonização do quadro legal e institucional à operacionalização das estratégias de intervenção*. Entidade Reguladora de Águas e Resíduos. Acedido a 22/07/2015. Disponível em <http://www.ersar.pt/website/>

ESACB (2007). *Laboratório de Microbiologia: Procedimentos gerais para a colheita e acondicionamento de amostras de água para análise microbiológica*. Acedido a 09/07/2015. Disponível em: http://docentes.esa.ipcb.pt/labmicro/fich_aux/Procedimentos_colheita_aguas.pdf

Fernandes, L. (2014). *Avaliação Microbiológica e Físico-Químicas da Qualidade da Água para o Consumo Humano na Província do Planalto Central – Huambo – Angola*. Dissertação apresentada para obtenção de grau de mestre em Qualidade e Segurança Alimentar. Escola Superior Agrária de Bragança

González-Zorn, B., Domínguez-Bernal, G., Suárez, M., Ripio, M., Veja, Y., Novella, S. & Vázquez-Boland, J. (1999). The smcL gene of *Listeria ivanovii* encodes a sphingomyelinase C that mediates bacterial escape from the phagocytic vacuole. *Molecular Microbiology*, 33 (3): 510-523.

Gowen, A. (2012). Water and Food Quality. *Contemporary Materials*, III(1): 31-37.

- Han, X. & Andrade, R. (2005). Brevundimonas diminuta infections and its resistance to fluoroquinolones. *Journal Antimicrob Chemother*, 55 (6):853–859
- Heras, A., Domínguez, L., López, I. & Fernández, F. (1999). Outbreak of acute ovine mastitis associated with Pseudomonas aeruginosa infection. *Veterinary Record*, 145 (4):111-112.
- Holm, C., Mathiasen, T. & Jespersen, L. (2004). A flow cytometric technique for quantification and differentiation of bacteria in bulk tank milk. *Journal of Applied Microbiology*, 97 (5): 935-41
- João, J., Rosa, C., Neto, A., Picinin, L., Fuck, J. & Marin, G. (2011). Qualidade da água utilizada na ordenha de propriedades leiteiras do Meio Oeste Catarinense. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, 10(1):9-15
- Júnior, J. & Beloti, V. (2012). Mastite Bovina e seu Reflexo na Qualidade do Leite – Revisão de Literatura. *Revista Eletrônica de Educação e Ciência (REEC)*, 2(2):1-12
- Kinzelman, J., Ng, C., Jackson, E., Gradus, S., & Bagley, R. (2003). Enterococci as indicators of Lake Michigan recreational water quality: Comparison of two methodologies and their impacts on public health regulatory events. *Applied and Environmental Microbiology*, 69:92-96
- Kirby, R., Bartram, J. & Carr, R. (2003). Water in food production and processing: quantity and quality concerns. *Food Control*, 14 (5):283-299.
- Lacerda, L., Mota, R. & Sena, M. (2009). Qualidade microbiológica da água utilizada em fazendas leiteiras para limpeza das tetas de vacas e equipamentos leiteiros em três municípios do estado Maranhão. *Arq. Inst. Biol.*, 76(4):569-575
- Landim, P. (2003). *Análise Estatística de Dados Geológicos*. 2ª Edição. Editora Unesp, Brasil.
- Lagger, J., Mata, H. & Pechin, G. (2000). La importância de la calidad del agua en producción lechera. *Veterinaria Argentina*, 27 (165):346-354.
- Lerliche, F. & Fayolle, K. (2012). No seasonal effect on culturable pseudomonads in fresh milks from cattle herds. *Journal of Dairy Science*, 95(5): 2299-306
- Lindsay, D., Brozel, V., Mostert, J. & Holy, A. (2002). Differential efficacy of a chlorine dioxide-containing sanitizer against single species and binary biofilms of a dairy-associated *Bacillus cereus* and a *Pseudomonas fluorescens* isolate. *Journal of Applied Microbiology*, 92:352-361
- Linke, K., Ruclerrl, I., Burugger, K., Karpeskova, R., Walland, J., Muri-Klinger, S., Tichy, A., Wagner, M. & Stessl, B. (2014). Reservoirs of *Listeria* species in three environmental ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(18): 5583-5592.
- Louros, P. (1999). *Contribuição para a avaliação da eficiência do processo de tratamento utilizado para a água de um furo, destinada ao fabrico de refrigerantes*. Relatório de Estágio para obtenção do grau de Licenciatura de Engenharia de Ordenamento dos Recursos Naturais. Instituto Politécnico de Castelo Branco
- Mallet, A. (2007). *Quantificação e identificação de Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa e Aeromonas hydrophila em água de propriedades leiteiras*. Dissertação apresentada para obtenção do grau de mestre em Ciência dos Alimentos. Minas Gerais – Brasil
- Manjare, S., Vhanalakar, S. & Muley, D. (2010). Analysis of water quality using physicochemical parameters tamdalge tank in Kolhapur District, Maharashtra. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*, 1(2):115-119
- Mapa do Distrito de Castelo Branco. (2015). Acedido a 22/07/2015. Disponível em: https://www.google.pt/search?q=mapa+do+distrito+de+castelo+branco&espv=2&biw=1366&bih=599&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0CAYQ_AUoAWoVChMIraj1weWQxwIVQ8cUCh2VbACL#imgrc=K_A2-Cx0Rz53QM%3A

Martin, N., Murphy, S., Ralyea, R., Wiedmann, M. & Boor, K. (2011). When cheese gets the blues: *Pseudomonas fluorescens* as the causative agent of cheese spoilage. *Journal of Dairy Science*, 94(6):3176-3183

Mendes, B. (2010). *Microbiologia da água*. Lidel-Edições técnicas, Lisboa. ISBN 978-972-757-515-2.

Mendes, B. & Oliveira, J. (2004). *Qualidade da Água para Consumo Humano*. Lidel-Edições técnicas, Lisboa

Miguel, P., Fleury, A., Mello, C., Nakano, D., Lima, E., Turrioni, J. (...), Pureza, V. (2012). *Metodologia de Pesquisa em Engenharia de Produção*. 2ª Edição. Elsevier Editora, Brasil.

Mota, F. (2013). *Avaliação físico-química e microbiológica da qualidade da água em 7 fontanários do concelho de Castelo de Vide*. Relatório de Estágio para obtenção do grau de Licenciatura de Nutrição Humana e Qualidade Alimentar-Instituto Politécnico de Castelo Branco

Nogva, H., Rudi, K., Naterstad, K., Holck, A. & Lillehaug, D. (2000). Application of 5'-nuclease PCR for quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in pure cultures, water, skim milk, and unpasteurized whole milk. *Appl Environ Microbiol*, 66(10):4266-4271.

Oliveirinha, F. (2001). *Contribuição para a avaliação da qualidade da água de abastecimento no concelho do Fundão no ano 2000*. Relatório de Estágio para obtenção do grau de Licenciatura de Engenharia de Ordenamento dos Recursos Naturais. Instituto Politécnico de Castelo Branco

Perkins, N., Kelton, D., Hand, K., MacNaughton, G., Berke, O. & Leslie, K. (2009). An analysis of the relationship between bulk tank milk quality and wash water quality on dairy farms in Ontario. *Journal of Dairy Science*, 92(8):3714-3722

Pestana, M. & Gageiro, J. (2008). *Análise de dados para ciências sociais: A complementaridade do SPSS*. 5ª Edição. Sílabo, Lisboa

Piana, S., Farina, L., Falconi, F. & Busarello, J. (2014). Avaliação da Qualidade Microbiológica da Água de Propriedades Leiteiras dos Municípios de Campo Bonito, Cascavel e Guaraniáçu, *Ciências Biológicas e da Saúde*, 35(1):25-34

Pintado, C.M.B.S., Grant, K.A., Halford-Maw, R., Hampton, M.D., Ferreira, M.A.S.S., McLauchlin, J. (2009). Association between a case study of asymptomatic ovine listerial mastitis and the contamination of soft cheese and cheese processing environment with *Listeria monocytogenes* in Portugal. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6(5): 569-575

Ponciano, R. (2010). *Avaliação da Qualidade Higiênica da Produção de Leite de Pequenos Ruminantes e de Queijo Fresco da Região do Rabaçal*. Dissertação apresentada para obtenção do grau de mestre em Segurança Alimentar. Universidade Técnica de Lisboa – Faculdade de Medicina Veterinária.

Porto, M., Oliveira, A., Fai, A. & Stamford, T. (2011). Coliformes em água de abastecimento de lojas fast-food da região metropolitana de Recife. *Ciência Saúde Coletiva*. 16(5): 2653-2658

Ramos, M. (2014). Avaliação da qualidade da água utilizada em explorações de leite de pequenos ruminantes. Relatório de Estágio para obtenção do grau de Licenciatura de Nutrição Humana e Qualidade Alimentar. Instituto Politécnico de Castelo Branco.

Rand, M.C., Greenberg, A.E., Taras, M.J. (1975) *Standard Methods for the Examination of water and Wastewater*. 14th edition. Washington: Joint Editorial Board

Rebello, H. & Mansilha, C. (2013). Avaliação de águas subterrâneas: Estudo de Aaguns parâmetros físico-químicos. Acedido a 22/07/2015. Disponível em: http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/PublicacoesRepositorio/Documents/observacoesN52013_artigo1.pdf

Regulamento (CE) N° 852 (2004) do parlamento Europeu e do Conselho de 29 de Abril de 2004 relativo à higiene dos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia*. Acedido a 22/06/2015. Disponível em: http://www.apicarnes.pt/pdf/legislacao/Reg_852_2004.pdf

Regulamento (CE) N° 853 (2004) do parlamento Europeu e do Conselho de 29 de Abril de 2004 que estabelece regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal. *Jornal Oficial da União Europeia*. Acedido a 22/06/2015. Disponível em: <https://www.ipma.pt/export/sites/ipma/bin/docs/institucionais/regul.853.2004.pdf>

Rice, E., Baird, R., Eaton, A. & Clesceri, L. (2012). *Standard Methods for the Examination of water and Wastewater*. 22nd edition. Washington: Joint Editorial Board

Silva, L. (2010). *Controlo da qualidade da água de consumo humano no concelho da Povoação (São Miguel): diagnóstico e implicações para a saúde pública*. Dissertação apresentada para obtenção do grau de mestre em Ambiente, Saúde e Segurança. Universidade dos Açores

Silva, L. & Williams, D. (2001). Buffer zone versus whole catchment approaches to studying land use impact on river water quality. *Water Research*, 35(14):3462-3472

Sorlini, S., Palazzini, D., Sieliechi, J. & Ngassoum, M. (2013). Assessment of physical-chemical drinking water quality in the Logone valley. *Sustainability*, 5(7):3060-3076

Sousa, V. (2012). Avaliação da qualidade da água em 10 fontanários do concelho de Castelo Branco. Relatório de Estágio para obtenção do grau de Licenciatura de Nutrição Humana e Qualidade Alimentar. Instituto Politécnico de Castelo Branco

Sousa, A., Taveira, M. & Silva, L. (2015). Groundwater from private drinking water wells: Imminent public health issue. *Water Resources*, 42(4):517-524

Tormo, H., Barral, J., Laithier, C., Le Mens, P., Reyrolles, D., Carrère, C., Finiel, P., Leriche, F. (2004). Guide d'appui technique pour l'accident de fromagerie à la ferme "Pseudomonas fluorescens" – Technologie lactique. Fédération Nationale des Éleveurs de Chèvres. Disponível em http://www.accident-fromagerie.fr/IMG/pdf/Guide_Pseudomonas.pdf

Viegas, S. (2009). *Alterações do Estado de Saúde Associadas à Alimentação: Contaminação microbiológica dos Alimentos*. Acedido a 30/08/2015. Disponível em: http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/Publicacoes/Outros/Documents/AlimentacaoNutricao/Alimentacao_INSA_online.pdf

Vilar, M., Otero, J., Sanjuán, M., Diéguez, F., Varela, M. & Yus, E. (2012). Implementation of HACCP to control the influence of milking equipment and cooling tank on the milk quality. *Trends in Food Science & Technology*, 23(1):4-11

Zhang, R., Huo, W., Zhu, W. & Mao, S. (2014). Characterization of bacterial community of raw milk from dairy cows during subacute ruminal acidosis challenge by high-throughput sequencing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95 (5): 72-79

WHO. (2006). *Guidelines for drinking-water quality: Microbial fact sheets*. Acedido a 09/07/2015. Disponível em: http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq0506_11.pdf

WHO. (2015). *How does safe water impact global health?*. Acedido a 09/07/2015. Disponível em: <http://www.who.int/features/qa/70/en/#content>

ANEXOS

Anexo I: Parâmetros de avaliação da qualidade da água destinada ao consumo humano de acordo com o Decreto-lei nº 306/2007 de 27 de agosto

Parâmetros e valores paramétricos

Parte I do Anexo I do DL nº306/2007 - Parâmetros microbiológicos

1 - Os valores paramétricos para a água destinada ao consumo humano fornecida por redes de distribuição, por fontanários não ligados à rede de distribuição, por pontos de entrega, por camiões ou navios-cisterna, por reservatórios não ligados à rede de distribuição ou utilizada numa empresa da indústria alimentar são os seguintes:

Parâmetro	Valor paramétrico	Unidade
<i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>).	0	Número/100 ml.
Enterococos	0	Número/100 ml.

2 - Os valores paramétricos para as águas colocadas à venda em garrafas ou outros recipientes são os seguintes:

Parâmetro	Valor paramétrico	Unidade
<i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>).	0	Número/250 ml.
Enterococos	0	Número/250 ml.
<i>Pseudomona aeruginosa</i> .	0	Número/250 ml.
Número de colónias a 22°C.	100	Número/ml.
Número de colónias a 37°C.	20	Número/ml.

Parte II do Anexo I do DL nº306/2007 - Parâmetros químicos

Os valores paramétricos para a água destinada ao consumo humano fornecida por redes de distribuição, por fontanários não ligados à rede de distribuição, por pontos de entrega, por camiões ou navios-cisterna, por reservatórios não ligados à rede de distribuição, utilizada numa empresa da indústria alimentar ou posta à venda em garrafas ou outros recipientes, são os seguintes:

	Valor paramétrico	Unidade	Observações
Acrilamida	0,10	µg/l	V. n. 1.
Antimônio	5,0	µg/l Sb	
Arsénio	10	µg/l As	
Benzeno	1,0	µg/l	
Benzo(a)pireno	0,010	µg/l	
Boro	1,0	mg/l B	
Bromatos	25 (de 25 de Dezembro de 2003 até 25 de Dezembro de 2008). 10 (após 25 de Dezembro de 2008).	µg/l BrO ₃	V. n. 2.
Cádmio	5,0	µg/l Cd	
Crómio	50	µg/l Cr	V. n. 3.
Cobre	2,0	mg/l Cu	V. n. 3.
Cianetos	50	µg/l Cn	
1,2 dicloroetano	3,0	µg/l	
Epicloridrina	0,10	µg/l	V. n. 1.
Fluoretos	1,5	mg/l F	
Chumbo	25 (de 25 de Dezembro de 2003 até 25 de Dezembro de 2013). 10 (após 25 de Dezembro de 2013).	µg/l Pb	V. n. 3 e 4.
Mercurio	1	µg/l Hg	
Níquel	20	µg/l Ni	V. n. 3.
Nitratos	50	mg/l NO ₃	V. n. 5.
Nitritos	0,5	mg/l NO ₂	V. n. 5.
Pesticida individual	0,10	µg/l	V. n. 6 e 7.
Pesticidas — total	0,50	µg/l	V. n. 6 e 8.
Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP)	0,10	µg/l	Soma das concentrações dos compostos especificados. V. n. 9.
Selénio	10	µg/l Se	
Tetracloroetano e tricloroetano	10	µg/l	Soma das concentrações dos compostos especificados.
Trihalometanos — total (THM)	150 (de 25 de Dezembro de 2003 até 25 de Dezembro de 2008). 100 (após 25 de Dezembro de 2008).	µg/l	Soma das concentrações dos compostos especificados. V. n. 10.
Cloreto de vinilo	0,50	µg/l	V. n. 1.

Nota 5 — Compete às entidades gestoras, nomeadamente dos sistemas com estações de tratamento de água, assegurar à saída dessas estações a condição $[\text{nitratos}]/50 + [\text{nitritos}]/3 \leq 1$, em que os parênteses rectos representam as concentrações em mg/l para os nitratos (NO₃) e para os nitritos (NO₂), bem como do valor limite de 0,10 mg/l para os nitritos.

Parte III do Anexo I do DL n.º 306/2007 - Parâmetros indicadores

Os valores paramétricos estabelecidos apenas para afeitos de controlo da qualidade da água destinada ao consumo humano fornecida por redes de distribuição, por fontanários não ligados à rede de distribuição, por pontos de entrega, por camiões ou navios-cisterna, por reservatórios não ligados à rede de distribuição, utilizada numa empresa da indústria alimentar ou posta à venda em garrafas ou outros recipientes, são os seguintes:

Parâmetro	Valor paramétrico	Unidade	Observações
Alumínio	200	µg/l Al	
Amónio	0,50	mg/l NH ₄	
Cálcio	-	mg/l Ca	V. n. 1, 2 e 5.
Cloretos	250	mg/l Cl	V. n. 1.
<i>Clostridium perfringens</i> (incluindo esporos)	0	N/100 ml	V. n. 6.
Cor	20	mg/l PtCo	
Condutividade	2 500	µS/cm a 20°C	V. n. 1.
Dureza total	-	mg/l CaCO ₃	V. n. 1, 4 e 5.
pH	≥ 6,5 e ≤ 9	unidades de pH	V. n. 1 e 7.
Ferro	200	µg/l Fe	
Magnésio	-	mg/l Mg	V. n. 1, 3 e 5.
Manganês	50	µg/l Mn	
Microcistinas — LR total	1	µg/l	V. n. 16.
Cheiro, a 25°C	3	Factor de diluição	
Oxidabilidade	5	mg/l O ₂	V. n. 8.
Sulfatos	250	mg/l SO ₄	V. n. 1.
Sódio	200	mg/l Na ⁺	
Sabor, a 25°C	3	Factor de diluição	
Número de colónias	Sem alteração anormal	N/ml a 22°C	V. n. 17 e 18.
Número de colónias	Sem alteração anormal	N/ml a 37°C	V. n. 17 e 18.
Bactérias coliformes	0	N/100 ml	V. n. 9.
Carbóno orgânico total (COT)	Sem alteração anormal	mg/l C	V. n. 10 e 18.
Turvação	4	UNT	V. n. 11.
α-total	0,5	Bq/l	V. n. 12 e 14.
β-total	1	Bq/l	V. n. 12 e 14.
Tritio	100	Bq/l	V. n. 12 e 14.
Dose indicativa total	0,10	mSv/ano	V. n. 13, 14 e 15.
Desinfectante residual	-	mg/l	V. n. 19.

Notas

1 — A água não deve ser factor de deterioração dos materiais com os quais está em contacto, ou seja, deve ser desejavelmente equilibrada. Para verificar esta propriedade, podem ser utilizados diversos métodos, nomeadamente o índice de Langelier (IL), que, desejavelmente, deve estar compreendido entre - 0,5 < IL < + 0,5.

2 — Não é desejável que a concentração de cálcio seja superior a 100 mg/l Ca.

3 — Não é desejável que a concentração de magnésio seja superior a 50 mg/l Mg.

4 — É desejável que a dureza total em carbonato de cálcio esteja compreendida entre 150 mg e 500 mg/l CaCO₃.

5 — Quando um sistema de abastecimento é gerido apenas por uma entidade gestora, estes parâmetros devem ser também determinados a montante da distribuição, no âmbito do programa de controlo operacional.

6 — Caso se verifique o incumprimento deste valor paramétrico, deve ser investigado todo o sistema de abastecimento para identificar existência de risco para a saúde humana devido à presença de outros microrganismos patogénicos, por exemplo, o *Cryptosporidium*. Os resultados de todas as investigações devem ser incluídas no relatório trienal.

7 — Para a água sem gás contida em garrafas ou outros recipientes, o valor mínimo do pH pode ser reduzido para 4,5 unidades. Para a água, em garrafas ou outros recipientes, naturalmente rica ou artificialmente enriquecida em dióxido de carbono, o valor mínimo pode ser mais baixo.

8 — Nos controlos de inspecção, a análise da oxidabilidade não é obrigatória desde que nessa amostra seja determinado o teor de COT. Esta nota não se aplica às zonas de abastecimento com volumes médios diários inferiores a 10 000 m³, devendo ser sempre determinada a oxidabilidade no controlo de rotina 2.

9 — A unidade é N/250 ml para as águas contidas em garrafas ou outros recipientes.

10 — A análise do parâmetro COT é obrigatória para todas as zonas de abastecimento com volumes médios diários superiores a 10 000 m³.

11 — No caso de águas superficiais, o valor paramétrico da turvação à saída do tratamento deve ser 1 UNT.

12 — Frequências de controlo a estabelecer posteriormente no anexo II ao presente decreto-lei.

13 — Com excepção do trítio, potássio-40, radão e produtos de desintegração do radão, frequências de controlo, métodos de controlo e localizações mais adequadas para os pontos de controlo a estabelecer posteriormente no anexo II ao presente decreto-lei.

14 — As propostas a apresentar nos termos da n. 11, sobre frequências de controlo, e da n. 12, sobre frequências de controlo, métodos de controlo e localizações mais adequadas para os pontos de controlo, do anexo II ao presente decreto-lei serão adoptadas nos termos do artigo 12.º da Directiva n.º 98/83/CE.

15 — A dose indicativa total só é determinada quando ocorrem incumprimentos dos parâmetros α-total e ou β-total. Nestes casos procede-se à determinação das concentrações dos radionuclídeos específicos emissores α e ou β.

16 — Este parâmetro deve ser determinado à saída da estação de tratamento de água, quando há suspeitas de eutrofização da massa de água superficial. Caso seja confirmado um número de cianobactérias potencialmente produtoras de microcistinas superior a 2000 células/ml deve ser aumentada a frequência de amostragem, no âmbito do programa de controlo operacional.

17 — Não é desejável que o número de colónias a 22°C e a 37°C seja superior a 100 e 20, respectivamente.

18 — Sem alteração anormal significa, com base num histórico de análises, resultados dentro dos critérios estabelecidos pelas entidades gestoras. Quando ocorre uma alteração anormal, é desejável que a entidade gestora averigüe as respectivas causas.

19 — Recomenda-se que as concentrações deste parâmetro estejam entre 0,2 e 0,6 mg/l de cloro residual livre. A determinação deste parâmetro não é obrigatória nas situações previstas no n.º 3 do artigo 9.º do presente decreto-lei.

Anexo II: Fluxograma para a determinação do potencial hidrogeniónico (pH) em amostras de águas

Determinação do potencial hidrogeniônico (pH) em amostras de águas

Ligar o aparelho e deixá-lo estabilizar pelo menos durante 30 minutos;

Lavar o eletrodo com água destilada e secar com papel de filtro. Esta operação deverá repetir-se sempre que se mude de amostra ou solução e no final de cada leitura;

Mergulhar de seguida o eletrodo em soluções de pH conhecido (soluções tampão) e, se necessário ajustar ao valor pH respetivo;



Lavar novamente o eletrodo com água destilada e voltar a secar com papel absorvente;

Colocar 50mL de amostra num copo de precipitação e mergulhar o eletrodo na água a analisar. Anotar o valor respetivo;



Terminadas as leituras, lavar novamente o eletrodo com água destilada voltar a secar com papel absorvente e colocá-lo no copo com a solução KCl.

Anexo III: Fluxograma para a determinação da condutividade elétrica em amostras de águas

Determinação da condutividade elétrica em amostras de águas

Carregar na tecla ON/OFF e deixar estabilizar o aparelho cerca de 30 minutos;



Lavar a célula com água destilada e limpar com papel absorvente. Medir 50 mL de amostra para um copo de precipitação;

Introduzir a célula na amostra, clicar na tecla AR e depois carregar na tecla RUN/ENTER;

Esperar que o aparelho leia a condutividade. Quando a leitura estabilizar, registrar o valor;

Lavar o eletrodo, com água destilada, abundantemente, e se necessário prosseguir com as leituras das restantes amostras.

Anexo IV: Fluxograma para a determinação da Oxidabilidade em amostras de Águas

Determinação da Oxidabilidade em amostras de Águas

Medir 100 mL de amostra para um erlenmeyer;

Em paralelo com as amostras deve-se fazer um **ensaio em branco**, que contenha todos os reagentes que a amostra contém, substituindo apenas o volume da amostra por água destilada;

Adicionar 10 mL de ácido sulfúrico a 1:3;

Adicionar 5 mL de solução de permanganato de potássio e agitar bem;

Levar à ebulição durante 10 minutos;

Juntar 5ml de ácido oxálico, agitar até ao desaparecimento da cor púrpura;

Titular com permanganato de potássio até ao aparecimento da cor rosa ténue

Registrar o volume do titulante gasto.

Apresentação dos resultados

$$\text{Oxidabilidade ao permanganato (mg O}_2\text{/l)} = \frac{V_A - V_B}{V_a} \times 0,08 \times 1000$$

VA- Volume titulante gasto na amostra

VB- Volume titulante gasto no Branco

Va- Volume de amostra

Anexo V: Fluxograma para a determinação dos compostos de azoto em amostras de Águas

Determinação dos compostos de azoto em amostras de Águas

Azoto Amoniacal

Colocar 100 ml de amostra num erlenmeyer de 250 mL;

Verificar o pH e caso necessário neutralizar a 7 com NaOH (base) ou H₂SO₄ (ácido);

Colocar a amostra num tubo de kjeldahl;

Adicionar 5 ml de solução tampão;

Verificar novamente o pH e ajustar, caso necessário, a 9,5;

Levar a destilar no aparelho de Kjeldahl, recolhendo o destilado (100mL) para um Erlenmeyer, contendo 20 mL de ácido bórico;
- Destilação I



Titular o destilado com a solução de H₂SO₄ 0,02N, até ao aparecimento da cor púrpura, registar o volume de titulante gasto.

Apresentação dos resultados

$$\text{Azoto amoniacal} = \frac{V1(H2SO4)ml \cdot 700}{V2 \text{ ml de amostra}}$$

V1- Volume de titulante gasto

V2- Volume da amostra

Nota:

1ml de H₂SO₄ (0.002 N) corresponde a 280 mg/l de NH⁴⁺

1ml de H₂SO₄ (0.05 N) corresponde a 700 mg/l de NH⁴⁺

Nitratos e Nitritos

Ao resíduo da destilação I adicionar 0,5g da liga de Devarda



Levar a destilar novamente;

Recolher aproximadamente 100 mL do destilado, num erlenmeyer, contendo 20 mL de ácido bórico;
- Destilação II



Titular o destilado com uma solução de H_2SO_4 (0,02N), até que ocorra o aparecimento da cor

Registrar o volume de titulante gasto;

Apresentação dos resultados

$$\text{Nitratos+Nitritos} = \frac{V_1(H_2SO_4)ml \cdot 700}{V_2 \text{ ml de amostra}}$$

V1- Volume de titulante gasto

V2- Volume da amostra

Azoto Orgânico

Deixar arrefecer o resíduo da destilação II;

Medir 100mL para um Erlenmeyer de 500 mL;

Juntar 50ml do reagente de digestão;

Levar a ebulição (dentro da hotte) e continuar até que se desenvolva uma cor amarela clara, depois continuar a ebulição por mais 30 minutos;

Deixar arrefecer dentro da hotte;

Adicionar 0,5 mL de solução alcoólica de fenolftalaina e diluir com água destilada até +/- 150

Adicionar 50 mL de solução de hidróxido de tiosulfato de sódio;

Levar ao destilador, recolhendo aproximadamente 100mL do destilado, num Erlenmeyer contendo 20 mL de ácido bórico;

Titular com H₂SO₄ (0,02N) até ao aparecimento da cor púrpura e registar o volume do titulante gasto.



Apresentação dos resultados

$$\text{Azoto Orgânico} = \frac{V1(H2SO4)ml * 700}{V2 \text{ ml de amostra}}$$

V1- Volume de titulante gasto

V2- Volume da amostra

Anexo VI: Fluxograma para a determinação dos metais pesados em amostras de Águas

Determinação dos metais pesados em amostras de Águas

Ferro e Manganês

Em 50 mL de amostra adicionar 6 mL de HCl concentrado e 2 mL de HNO₃ e deixar toda a noite dentro da hotte;



No dia seguinte, colocar os tubos no suporte do digestor tapados com um vidro de relógio dentro da hotte;

Ligar o aparelho e deixar correr o programa durante 2 horas a uma temperatura de 150°C . Terminado o programa desligar o aparelho e deixar



Levantar e lavar os vidros de relógio com um esguicho com água ultra pura para recolher eventuais perdas para dentro do tubo;

Filtrar com um filtro de pregas, elaborado com papel de filtro nº 42, para um balão de 100 mL (previamente descontaminado com solução de ácido nítrico a 5%), lavando sempre o tubo onde a amostra digeriu;



Com água ultra pura perfaz-se aos 100mL;

Após a digestão as leituras são efectuadas por Espectrofotometria de Absorção Atômica.



**Anexo VII: Tabela síntese dos microrganismos analisados
com respetivos meios de cultura e reagentes utilizados**

Tabela síntese dos meios/reagentes utilizados nas determinações dos microrganismos

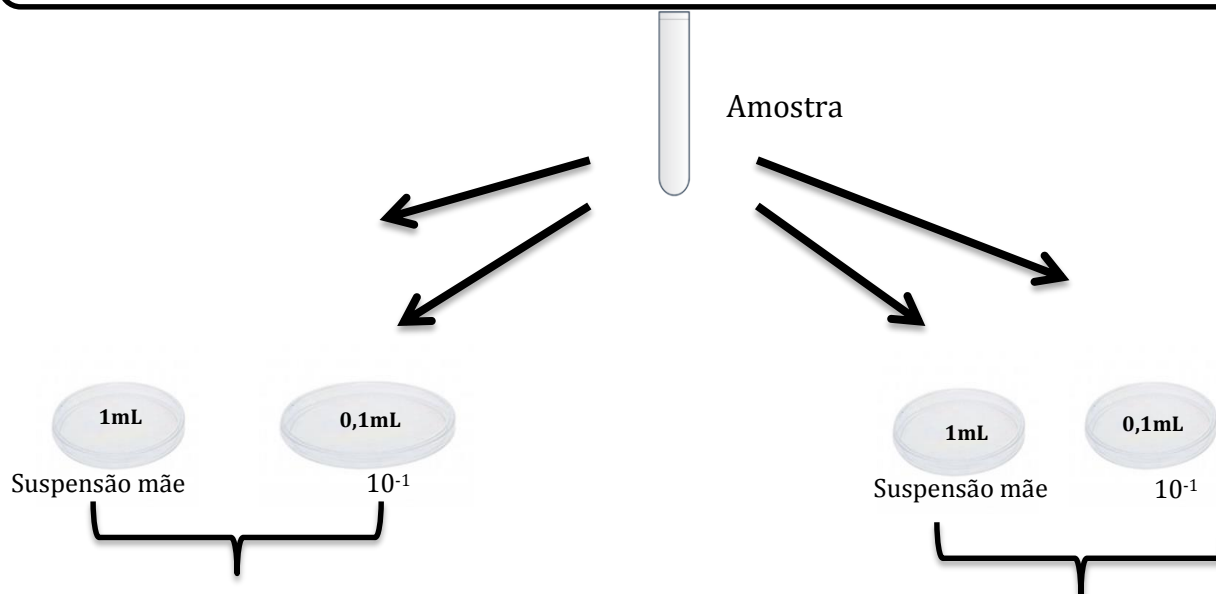
Microrganismos	Meios de cultura/Reagentes		Marca	Referência
Microrganismos a 22°C e a 37°C	Extrato de levedura e agar		Biokar	BK 153 HA
Bactérias coliformes e <i>E. coli</i>	Tergitol 7 Agar +		Biokar	BK 123 HA
	TCC Supplement 12.5			BS 02608
	Tryptone Soy Agar		Himédia	M290
	Caldo de triptofano		Biokar	BK 163 HA
	Reagente de Kovacs		LIOFILCHEM	80271
Enterococos Intestinais	Slanetz and Bartley Agar		Biokar	BK 037 HA
	Bile Esculin Agar			BK 158 HA
<i>Clostridium perfringens</i>	TSC Agar		Biokar	BK 031 HA
	D- cyclocerina			BS 00608
	Agar Sangue		BioMérieux	43041
	Lactose Gelatina		Himédia	M 9871
	Meio Mobilidade Nitratos			M 630
<i>Listeria monocytogenes</i>	TSYEA	TSA	Himedia	M290-500G
		Extrato de levedura	Merck	1.037.530.500
	Oxford Agar		Oxoid	CM0856
	ALOA		Biomérieux	AEB520080
	Caldo Fraser		Merck	1.103.980.500
	Suplementos 1ºCaldo		Merck	1.000.920.010
	Suplementos 2º Caldo		Merck	1.000.930.010
<i>Pseudomonas</i>	CNPseudomonas Agar		Biokar	BK 165 HA
	King B Agar		Biokar	BK 172 HA
	Cetrimida Agar		Merck	105.284
	Caldo de acetamida		Biokar	BM095
	Reagente da oxidase		Merck	8.211.020.010

Anexo VIII: Fluxograma para a contagem e deteção do número de colónias a 22°C e a 37°C: NF EN ISO 6222-1999

Contagem de colónias a 22°C e a 37°C

Preparação e sementeira

Preparar a amostra, proceder às diluições e semear os meios de cultura segundo a ISO 8199, a EN ISO 5667-3 e a ISO 6887



Incubar a 37°C durante 48h

Incubar a 22°C durante 72h

Após pipetar o volume de amostra para cada placa de Petri esterilizada, adicionar cerca de 15 mL de meio de cultura Extrato de levedura Agar (BK 153 HA);

Agitar em movimento em cruz e, deixar sobre a bancada até solidificar;

Incubar as placas a 22°C e a 37°C;

Ao fim do período de incubação contar o número de colónias em cada placa.

Expressão de resultados

$$N = \frac{\Sigma C}{V(n_1 + 0,1 \times n_2) \times d}$$

C- colónias

V-volume

N1- nº de placas da 1ª diluição

N2- nº de placas da 2ª diluição

d- 1ª diluição usada

**Anexo IX: Fluxograma para a contagem de coliformes e
Escherichia coli: NF EN ISO 9308-1:2000**

Pesquisa e quantificação de *E. coli* e bactérias coliformes

Filtração

Filtrar 100 mL de amostra através de uma membrana com um poro de 0,45µm com grelha de contagem

Incubação e diferenciação

Com ajuda de uma placa esterilizada colocar a membrana numa placa com Tergitol 7 Agar (BK 123 HA) + TTC Supplement 12.5mg (BS 02608)

Incubar a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ durante $21 \pm 3\text{h}$ (prolongar o período incubação a $44^\circ\text{C} \pm 24\text{h}$ se não se observarem colónias características) pois, podem estar na amostra bactérias termotolerantes

Após o período de incubação examinar as membranas, considerando como típicas, independentemente do tamanho, as de coloração amarela, consideradas lactose positivas

Confirmação

Repicar preferencialmente todas as colónias típicas (mínimo de 10), para *Tryptone Soy Agar* (BK031HA) para a realização do teste de oxidase.



Teste Oxidase

Incubar a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ durante $21 \pm 3\text{h}$

Verter 2-3 gotas de reagente de oxidase sobre em papel de filtro.

Com a ajuda de uma ansa de plástico espalhar uma parte da cultura sobre o papel de filtro. A reacção considera-se positiva se após 30 segundos aparecer uma coloração azul/violeta escuro.

Consideradas colónias de coliformes as de lactose positiva e oxidase negativa.

Teste Indol

Repicar uma colónia para caldo Triptofano e, incubar a 44°C durante 24 horas.

Controlar a produção de indol por adição de 0.2-0.3 mL de reagente de Kovacs (Liofilchem, ref^a80271). O aparecimento de coloração vermelho na superfície do meio confirma a produção de indol. Consideradas colónias de *E. coli* as lactose positivas, oxidase negativa e indol positivo.

Se oxidase negativa

**Anexo X: Fluxograma para a contagem de Enterococos
intestinais: NF EN ISO 7899-2 (2000)**

Deteção e contagem de Enterococos intestinais

Filtrar 100mL de amostra a analisar

Nota: O diâmetro dos poros da membrana é de 0.45 μm (suficiente para reter as bactérias).

Colocar a membrana filtrante sobre a placa com o meio de *Slanetz and Bartley Agar* (BK 037HA)- meio preparado

Incubar a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante $44 \pm 4\text{h}$

Nota: O filtro é colocado sobre um meio sólido seletivo com azida de sódio (para suprimir o crescimento de bactérias Gram- negativas) e com cloreto 2,3,5-trifeniltetrazólio, um corante incolor que é reduzido passando a vermelho em presença de enterococos intestinais.



Confirmação e contagem de enterococos

Com o auxílio de uma pinça estéril transferir a membrana com colónias típicas, sem a virar, para uma placa com *Bile Esculin Agar* (BK 158 HA)

Nota: Consideram-se colónias típicas todas as que tenham forma convexa, com coloração vermelha, castanha ou rosa quer no centro quer na totalidade da colónia.



Incubar a $44^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ durante 2h

Observar a placa, considerando como positivas as de coloração escura, contando-as como colónias de enterococos intestinais.

Nota: Os enterococos intestinais hidrolisam a esculina, produzindo 6,7- dihidroxicumarino que se combina com iões férricos dando origem a um composto escuro que se difunde no meio.



Anexo XI: Fluxograma para a contagem de *Clostridium perfringens* e esporos: National Standard Methods, HPA-referência nº W 5i3.1

Contagem de *Clostridium perfringens*

Filtrar 100 mL da amostra de água, através de uma membrana com um tamanho de poro de 0,45µm;

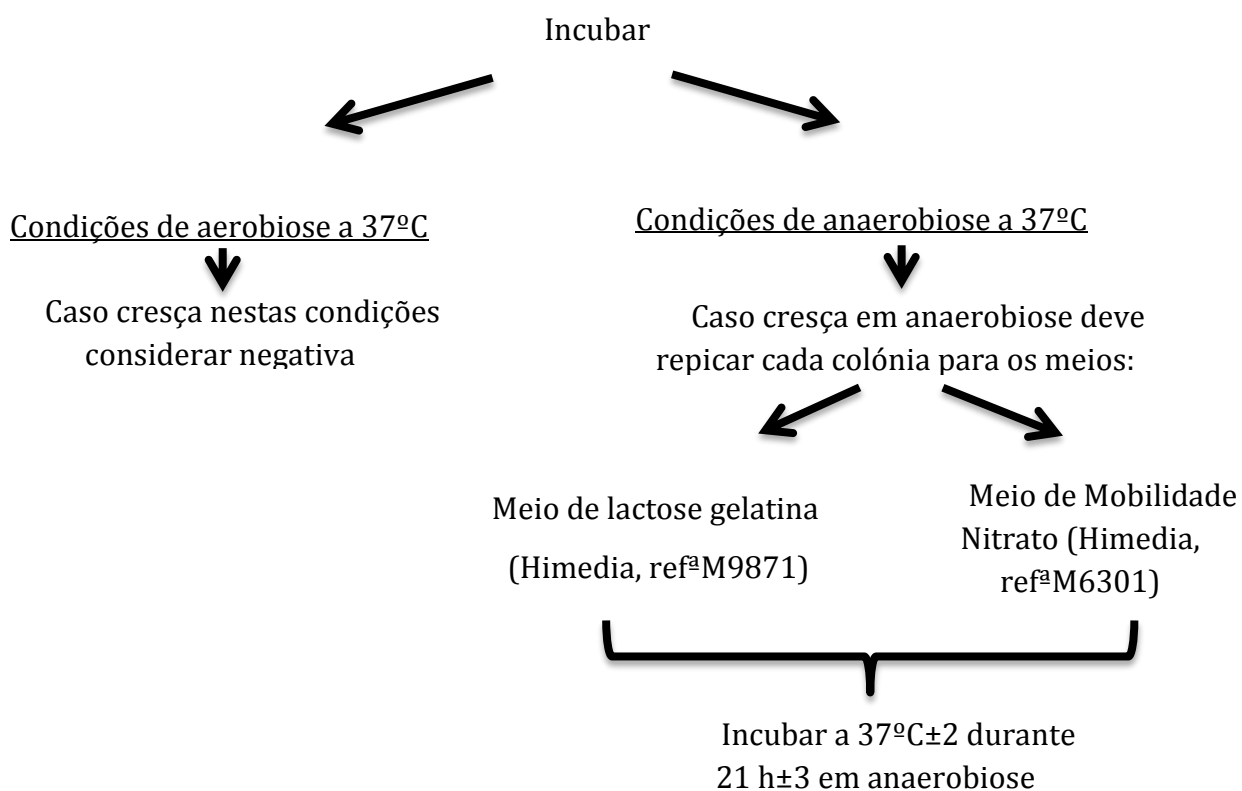
Transferir a membrana filtrante, usando pinça estéril, para uma placa com meio TSC-Agar (Biokar, ref^aBK031HA) suplementado com D-Cyclocerina (Biokar,

Incubar em jarra de anaerobiose a $(44 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ durante $(21 \pm 3)\text{h}$;

Após incubação observam-se as placas e consideram-se colónias suspeitas, de *Clostridium perfringens*, todas aquelas que apresentam uma cor negra ou cinzenta.

Confirmação

Repicar as colónias para duas placas de Agar Sangue (Biomérieux, ref^a43041)



Meio de lactose gelatina

Considera-se lactose positiva se o meio virar para amarelo

Nota: Verifica-se a liquefação da gelatina se após o período de incubação o meio estiver liquefeito e colocado o tubo a uma temperatura de 5°C durante 2 horas se mantiver liquefeito.

Meio de Mobilidade

Nitratos



Incubado a 37°C ±2°C durante 21±3 horas

Permite observar se a colónia repicada é ou não móvel. A sementeira é feita por picada e, se após o período de incubação em anaerobiose se verificar crescimento ao longo da picada é considerado imóvel.

Se se confirmarem avança-se para o teste dos nitratos (pesquisa da redução de Nitratos a Nitritos).

No tubo com Mobilidade Nitratos adiciona-se 0,2 e 0,5 ml de reagente Nit 1 e Nit 2

Se coloração vermelha



Confirma redução dos nitratos a nitritos

Se não houver alteração de cor adiciona-se pó de zinco



Se houver mudança de cor para vermelho a reacção é negativa. Ainda permanecem os nitratos.

Se não houver alteração de cor a reacção é positiva ou seja, os nitratos já passaram a nitritos. Temos assim confirmada a presença de *Clostridium perfringens*.

**Anexo XII: Fluxograma para a contagem e detecção de
Pseudomonas aeruginosa: NF EN 12780:2002**

Contagem e detecção de *Pseudomonas aeruginosa*

Filtração e incubação

Filtrar um volume de água adequado ao tipo de amostra a analisar, de acordo com a norma ISO 8199;

Nota: A membrana deve ser estéril, de ésteres de celulose, com poros de diâmetro 0,45µm

Incubar a 36°C durante 44 ±4h, evitando a perda de humidade;

Colocar a membrana filtrante sobre a placa com meio CN Agar *Pseudomonas* (BK 165 HA);

Nota: Verificar o crescimento das culturas após 21 ±3h e 44 ±4h

Observação das membranas

Contar todas as colónias que produziram uma pigmentação azul/ verde (piocianina) como *Ps. aeruginosa* confirmadas.

Examinar as membranas sob radiação UV, evitando exposições prolongadas de modo a não destruir as colónias.



Contar as colónias que não produziram piocianina mas originaram fluorescência, considerando-as como presumíveis *Ps. aeruginosa*

Confirmar a identidade destas colónias em caldo de acetamida (BM095).

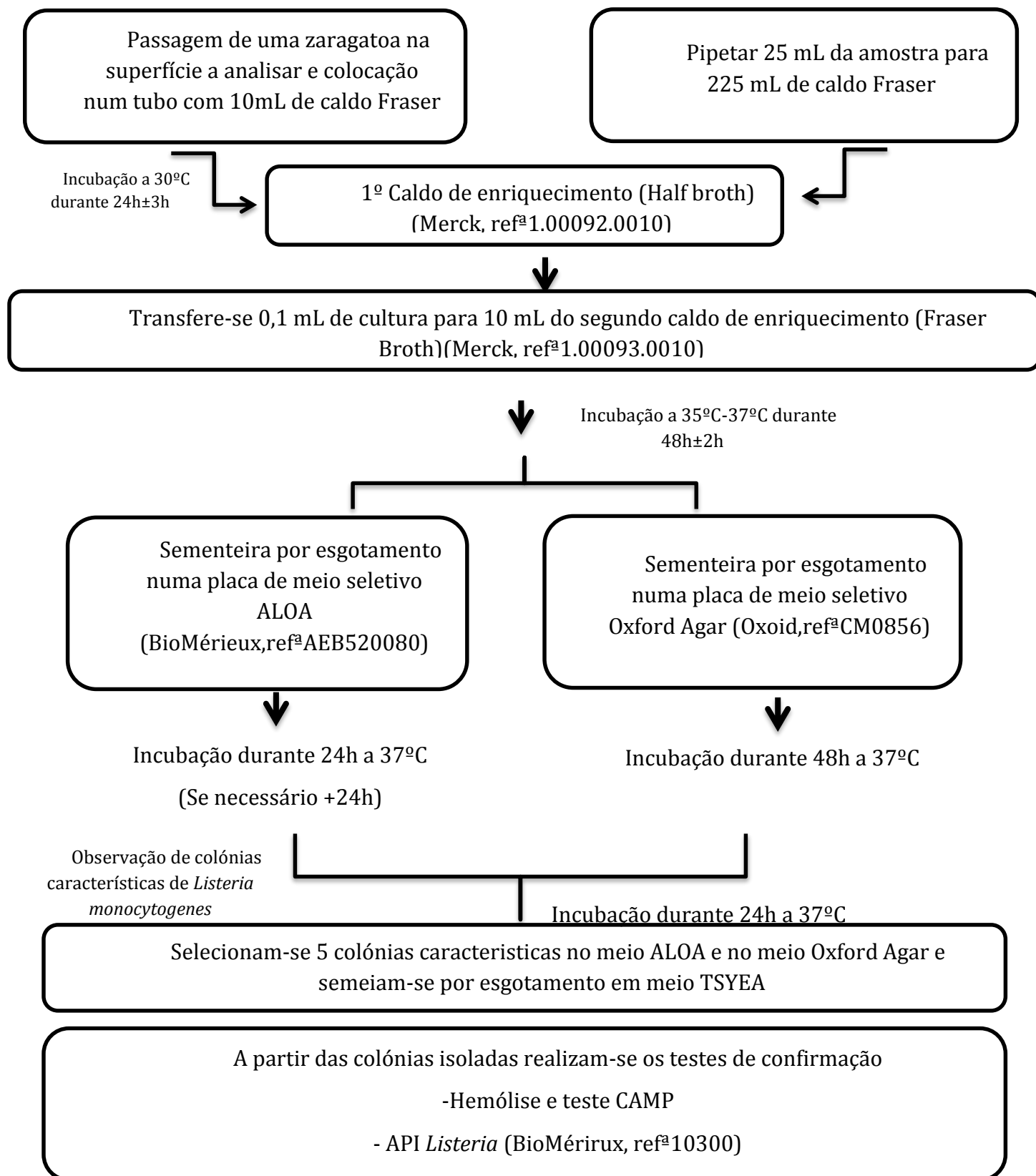


Contar as colónias que não produziram piocianina nem fluorescência, mas sim uma pigmentação castanha/vermelha, considerando-as como presumíveis *Ps. aeruginosa*

Confirmar a identidade destas colónias com o ensaio de oxidase, caldo de acetamida (BM095) e King B Agar (BM105).

Anexo XIII: Fluxograma para a pesquisa de *Listeria monocytogenes*: ISO 11290-1:1996

Pesquisa de *Listeria monocytogenes*



Anexo XIV: Output dos resultados dos testes realizados aos parâmetros físico-químicos, quando comparados com as épocas de colheita (SPSS)

Teste de amostras independentes										
		Teste de Levene para igualdade de variâncias		teste-t para igualdade de Médias						
		Z	Sig.	t	df	Sig. (2 extremidades)	Diferença média	Erro padrão de diferença	95% Intervalo de Confiança da Diferença	
									Inferior	Superior
pH	Variâncias iguais assumidas	3,148	,083	,451	41	,654	,10149	,22486	-,35262	,55560
	Variâncias iguais não assumidas			,449	37,974	,656	,10149	,22613	-,35628	,55927
CE	Variâncias iguais assumidas	4,708	,036	1,188	41	,242	21,65152	18,22547	-15,15557	58,45860
	Variâncias iguais não assumidas			1,199	36,439	,238	21,65152	18,05359	-14,94754	58,25057
Oxidabilidade	Variâncias iguais assumidas	8,902	,005	-1,082	41	,286	-,19158	,17711	-,54926	,16611
	Variâncias iguais não assumidas			-1,071	33,838	,292	-,19158	,17888	-,55516	,17201
Azoto_Amoniacal	Variâncias iguais assumidas	54,067	,000	3,169	41	,003	,16591	,05236	,06017	,27165
	Variâncias iguais não assumidas			3,103	22,496	,005	,16591	,05346	,05518	,27664
Nitratos_e_Nitritos	Variâncias iguais assumidas	5,227	,027	2,453	41	,019	,15924	,06491	,02815	,29034
	Variâncias iguais não assumidas			2,420	29,781	,022	,15924	,06581	,02480	,29368
Azoto_Orgânico	Variâncias iguais assumidas	5,073	,030	-,812	41	,421	-,23909	,29427	-,83338	,35520
	Variâncias iguais não assumidas			-,795	21,733	,435	-,23909	,30075	-,86325	,38506

Correlações

		Ferro	Manganês	N_Colheita
Ferro	Correlação de Pearson	1	,855**	-,085
	Sig. (2 extremidades)		,000	,588
	N	43	43	43
Manganês	Correlação de Pearson	,855**	1	,007
	Sig. (2 extremidades)	,000		,962
	N	43	43	43
N_Colheita	Correlação de Pearson	-,085	,007	1
	Sig. (2 extremidades)	,588	,962	
	N	43	43	43

** . A correlação é significativa no nível 0,01 (2 extremidades).

Anexo XV: Resultados dos testes realizados aos parâmetros físico-químicos (SPSS)

Correlações

		pH_	Fonte_de_Captação
pH_	Correlação de Pearson	1	,418**
	Sig. (2 extremidades)		,005
	N	43	43
Fonte_de_Captaçã o	Correlação de Pearson	,418**	1
	Sig. (2 extremidades)	,005	
	N	43	43

** . A correlação é significativa no nível 0,01 (2 extremidades).

		Fonte_de_ Captação	Ferro	Manganês
Fonte_de_Captaçã o	Correlação de Pearson	1	,190	,223
	Sig. (2 extremidades)		,222	,152
	N	43	43	43
Ferro	Correlação de Pearson	,190	1	,855**
	Sig. (2 extremidades)	,222		,000
	N	43	43	43
Manganês	Correlação de Pearson	,223	,855**	1
	Sig. (2 extremidades)	,152	,000	
	N	43	43	43

** . A correlação é significativa no nível 0,01 (2 extremidades).

Teste de amostras independentes

		Teste de Levene para igualdade de variâncias		teste-t para igualdade de Médias						
		Z	Sig.	t	df	Sig. (2 extremidades)	Diferença média	Erro padrão de diferença	95% Intervalo de Confiança da Diferença	
									Inferior	Superior
CE	Variâncias iguais assumidas	7,278	.010	1,891	41	,066	35,85961	18,96394	-2,43886	74,15807
	Variâncias iguais não assumidas			2,412	40,855	,020	35,85961	14,86859	5,82863	65,89059
Oxidabilidade	Variâncias iguais assumidas	21,702	.000	-2,866	41	,007	-,50129	,17488	-,85448	-,14810
	Variâncias iguais não assumidas			-4,127	28,842	,000	-,50129	,12146	-,74976	-,25282
Azoto_Amoniacal	Variâncias iguais assumidas	4,163	.048	1,861	41	,070	,11138	,05984	-,00947	,23223
	Variâncias iguais não assumidas			2,035	32,528	,050	,11138	,05474	-,00005	,22281
Nitratos_e_Nitritos	Variâncias iguais assumidas	4,023	.052	-1,611	41	,115	-,11586	,07191	-,26109	,02937
	Variâncias iguais não assumidas			-1,979	40,630	,055	-,11586	,05853	-,23411	,00238
Azoto_Orgânico	Variâncias iguais assumidas	2,145	.151	-1,480	41	,147	-,45621	,30830	-1,07883	,16642
	Variâncias iguais não assumidas			-2,028	35,561	,050	-,45621	,22499	-,91270	,00029

Anexo XVI: Resultados dos testes realizados aos parâmetros microbiológicos (SPSS)

Correlações

		Tipo_Captação	MO_a_22°C	MO_a_37°C	Clostridium_perfringens	Bactérias_coliformes	Escherichia_coli	Enterococos
Tipo_Captação	Correlação de Pearson	1	,349*	,407**	,153	,352*	,300	,407**
	Sig. (2 extremidades)		,022	,007	,326	,021	,050	,007
	N	43	43	43	43	43	43	43
MO_a_22°C	Correlação de Pearson	,349*	1	,614**	,237	,373*	,296	,522**
	Sig. (2 extremidades)	,022		,000	,126	,014	,054	,000
	N	43	43	43	43	43	43	43
MO_a_37°C	Correlação de Pearson	,407**	,614**	1	,145	,296	,269	,270
	Sig. (2 extremidades)	,007	,000		,352	,054	,081	,080
	N	43	43	43	43	43	43	43
Clostridium_perfringens	Correlação de Pearson	,153	,237	,145	1	,179	,070	,124
	Sig. (2 extremidades)	,326	,126	,352		,252	,655	,430
	N	43	43	43	43	43	43	43
Bactérias_coliformes	Correlação de Pearson	,352*	,373*	,296	,179	1	,592**	,474**
	Sig. (2 extremidades)	,021	,014	,054	,252		,000	,001
	N	43	43	43	43	43	43	43
Escherichia_coli	Correlação de Pearson	,300	,296	,269	,070	,592**	1	,577**
	Sig. (2 extremidades)	,050	,054	,081	,655	,000		,000
	N	43	43	43	43	43	43	43
Enterococos	Correlação de Pearson	,407**	,522**	,270	,124	,474**	,577**	1
	Sig. (2 extremidades)	,007	,000	,080	,430	,001	,000	
	N	43	43	43	43	43	43	43

*. A correlação é significativa no nível 0,05 (2 extremidades).

**Anexo XVII: Resultados da correlação entre a de
Pseudomonas spp. e fonte de captação**

Correlações

		Pseudomonas	Fonte_Captação
Pseudomonas	Correlação de	1	,224
	Pearson		
	Sig. (2 extremidades)		,330
	N	21	21
Fonte_Captação	Correlação de	,224	1
	Pearson		
	Sig. (2 extremidades)	,330	
	N	21	21

Anexo XVIII: Resultados da correlação entre a presença de Bactérias coliformes e Pseudomonas spp.

Correlações

		Coliformes	Pseudomonas
Coliformes	Correlação de Pearson	1	,438*
	Sig. (2 extremidades)		,037
	N	23	23
Pseudomonas	Correlação de Pearson	,438*	1
	Sig. (2 extremidades)	,037	
	N	23	23

*. A correlação é significativa no nível 0,05 (2 extremidades).

Resumo do modelo

Modelo	R	R quadrado	R quadrado ajustado	Erro padrão da estimativa
1	,438 ^a	,192	,153	,433

a. Preditores: (Constante), Coliformes

ANOVA^a

Modelo		Soma dos Quadrados	df	Quadrado Médio	Z	Sig.
1	Regressão	,933	1	,933	4,978	,037 ^b
	Resíduo	3,937	21	,187		
	Total	4,870	22			

a. Variável Dependente: Pseudomonas

b. Preditores: (Constante), Coliformes

ANOVA^a

Modelo	Soma dos Quadrados	df	Quadrado Médio	Z	Sig.
1 Regressão	,933	1	,933	4,978	,037 ^b
Resíduo	3,937	21	,187		
Total	4,870	22			

a. Variável Dependente: Pseudomonas

b. Preditores: (Constante), Coliformes