

FACULDADE DE ENGENHARIA DA UNIVERSIDADE DO PORTO

**DESNITRIFICAÇÃO EM SEDIMENTOS SUBTIDAIIS DO
ESTUÁRIO DO RIO DOURO**

Catarina Fernanda de Carvalho Pinheiro Teixeira

Dissertação submetida para satisfação parcial
dos requisitos do grau de mestre em Engenharia do Ambiente
(ramo Ambientes Costeiros)

Dissertação realizada sob a supervisão de
Professor Doutor Adriano Agostinho Donas-Bôto Bordalo e Sá,
do Departamento de Estudo das Populações do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel
Salazar da Universidade do Porto
e de
Doutor Rui Alfredo da Rocha Boaventura,
do Departamento de Química da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto

Porto, Dezembro de 2005

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Adriano Bordalo e Sá pela orientação, apoio científico e interesse constante com que acompanhou o desenvolvimento deste trabalho. O seu estímulo e amizade constituíram um contributo fundamental.

Ao meu co-orientador Doutor Rui Boaventura, agradeço a sua disponibilidade total e forma como me recebeu no seu laboratório.

Às minhas colegas de laboratório, Catarina Magalhães, Rita Teixeira, Ana Machado, Sandra Ramos, pelo apoio, excelente ambiente de trabalho e colaboração prestada na aprendizagem das técnicas, no trabalho de campo e de laboratório.

Ao Flávio, pelos mimos, carinho e paciência infinitos. Aos meus pais e irmã, pelo seu apoio incondicional.

Finalmente, quero aqui manifestar o meu reconhecimento e a minha gratidão, a todos aqueles que contribuíram directa ou indirectamente para a realização deste trabalho.

RESUMO

A Directiva de Nitratos da União Europeia (Comunidade Europeia, 1991) exige a aplicação de controlos apropriados ao enriquecimento em nitratos de qualquer curso de água classificada como poluída. Esta definição de poluição refere-se, essencialmente, à eutrofização derivada da elevada concentração de nutrientes, principalmente azoto e fósforo. No estuário do Rio Douro, a concentração de nitrato recebida de montante tem vindo a aumentar nos últimos 10 anos.

A desnitrificação é um processo microbiológico através do qual o nitrato (NO_3^-) é reduzido a óxido nitroso (N_2O) ou azoto molecular (N_2), retirando efectivamente azoto inorgânico do ecossistema. Os sedimentos aquáticos apresentam-se como locais ideais para a desnitrificação

A desnitrificação e produção de óxido nitroso foram estudadas em sedimentos subtidais estuarinos em quatro locais do Rio Douro durante o ano hidrológico 2004/2005. Este trabalho foi realizado na tentativa de investigar a relação entre estes processos e os factores ambientais. Os locais foram escolhidos de modo a representarem uma grande variedade de condições físicas e químicas. Os potenciais de desnitrificação e a produção de N_2O foram medidos usando a técnica de inibição com acetileno.

As taxas de desnitrificação variaram entre 0,2 e 19 $\text{nmol N g}^{-1} \text{ h}^{-1}$, aumentando em direcção a jusante. A produção de N_2O , um gás associado ao efeito de estufa, contabilizou 1,2 a 40,4 % dos gases azotados produzidos, o que coloca os sedimentos subtidais do Rio Douro entre os locais com maior produção potencial desse gás. Para os dois processos foram notadas variações sazonais e espaciais. No entanto, estas variações não foram satisfatoriamente explicadas pela influência directa dos parâmetros medidos indicando meios de regulação mais complexos. A desnitrificação e libertação de N_2O estiveram correlacionadas com a salinidade, concentração de amónia e fosfato, caudal, número total de bactérias na água e conteúdo em matéria orgânica do sedimento. A variação nos potenciais de

desnitrificação foi explicada (61 % da variância total) por um modelo de regressão envolvendo temperatura, salinidade, concentração de nitrito e amônia, carência bioquímica de oxigênio e caudal. Não foi encontrada qualquer relação estatística passível de explicar a produção de N_2O .

ABSTRACT

The European Union Nitrates Directive (91/676/EC; European Community, 1991) requires that appropriate controls on agricultural inputs of NO_3^- must be put in place within the catchment area of any water body classified as polluted. This definition of pollution refers principally to eutrophication arising from increasing nutrient inputs, especially N and P. In the Douro estuary the freshwater inputs of NO_3^- increased in the last decade.

Denitrification is the microbially mediated process whereby NO_3^- is reduced to nitrous oxide (N_2O) or dinitrogen (N_2), effectively removing inorganic nitrogen from the ecosystem. Aquatic sediments present an ideal place for denitrification.

A survey was made of denitrification and N_2O production in subtidal estuarine sediments at four sites in river Douro estuary during the hydrological year of 2004/2005 in order to investigate the relationship between rates and environmental factors likely to influence these processes. The sites were chosen to represent a wide variety of physical and chemical conditions. Denitrification rate and N_2O production were measured using the slurry acetylene blockage technique.

Denitrification rate ranged from 0,2 to 19 $\text{nmol N g}^{-1} \text{ h}^{-1}$, tending to increase in a downstream direction. N_2O production, a greenhouse gas, accounted for 1,2 – 40,4 % of the N gases produced. Thus, the Douro estuary is among the most productive systems in what N_2O is concerned. Seasonal and spatial variability were noted for both processes. This variability was not satisfactorily explained by the factors measured indicating more complex means of regulation. Denitrification rate and N_2O concentration in the sediment were correlated with salinity, ammonium and phosphate concentration, river flow, total number of bacteria in water and organic content of the sediment. The correlations between factors varied among sites. The variation in denitrification rate was explained (62 % total variance) by a model employing measurements of temperature, salinity, nitrite and ammonium

concentrations, biochemical oxygen demand and river flow. No statistical relationships were found to explain N₂O production.

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	O ciclo do azoto	12
1.2	A desnitrificação	16
1.3	Desnitrificação em sedimentos	20
1.3.1	Factores controladores da taxa de desnitrificação	23
1.4	Estuários	25
1.5	Estuário do Rio Douro: breve caracterização	26
1.6	Objectivos	29
2	MATERIAL E MÉTODOS	30
2.1	Locais e estratégia de amostragem	30
2.2	Caracterização do sedimento	32
2.2.1	Matéria orgânica	32
2.2.2	Granulometria	32
2.2.3	Potencial de oxidação-redução e densidade	33
2.2.4	Número total de bactérias	33
2.3	Caracterização física e química da água	34
2.3.1	Medições <i>in situ</i>	34
2.3.2	Nutrientes	34
2.3.3	Número total de bactérias	36
2.3.4	Coliformes fecais	36
2.3.5	Carência bioquímica de oxigénio	36
2.4	Avaliação das taxas de desnitrificação	37
2.5	Tratamento de dados	38
3	RESULTADOS	40
3.1	Caracterização ambiental dos locais de amostragem	40
3.1.1	Caudal	40
3.1.2	Sedimento	41
3.1.3	Número total de bactérias	44

3.1.4	Água de fundo	48
3.2	Taxas de desnitrificação	55
3.2.1	Variação sazonal e espacial	55
3.2.2	Análise de correlação	58
3.2.3	Análise de regressão múltipla	60
4	DISCUSSÃO	63
4.1	Caracterização ambiental dos locais de amostragem	64
4.2	Desnitrificação	66
4.2.1	Metodologia	67
4.2.2	Potenciais de desnitrificação	67
5	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	71
	REFERÊNCIAS	74
	ANEXO A – Medições <i>in situ</i>	88

ÍNDICE DE FIGURAS

1.1	Transformações do azoto no meio ambiente.	14
1.2	Arranjo básico das reductases envolvidas na desnitrificação.	18
1.3	Representação esquemática da circulação do azoto em sedimentos.	21
2.1	Mapa do estuário do Rio Douro com a localização das estações de amostragem.	31
3.1	Variação anual dos valores de $\phi 50$ (diâmetro mediano) para os 4 locais de amostragem entre Outubro de 2004 e Setembro de 2005.	42
3.2	Variação anual da percentagem de matéria orgânica nos sedimentos.	43
3.3	Diagrama de dispersão da percentagem de matéria orgânica (% MO) e o diâmetro mediano ($\phi 50$) do sedimento.	44
3.4	Exemplos de imagens de epifluorescência de preparações de sedimento dos 4 locais de amostragem.	45
3.5	Variação temporal e espacial do número total de bactérias no sedimento e na água de fundo do estuário do Rio Douro.	46
3.6	Diagrama de dispersão do número total de bactérias no sedimento e o potencial de oxidação-redução (ORP) .	47
3.7	Variação mensal da temperatura ($^{\circ}\text{C}$) na água de fundo nas 4 estações entre Outubro de 2004 e Setembro de 2005.	48
3.8	Variação mensal do oxigénio dissolvido (% saturação) na água de fundo nas 4 estações entre Outubro de 2004 e Setembro de 2005.	49
3.9	Variação mensal da salinidade na água de fundo nas 4 estações entre Outubro de 2004 e Setembro de 2005.	50
3.10	Variação mensal do pH na água de fundo nas 4 estações entre Outubro de 2004 e Setembro de 2005.	50
3.11	Variação mensal dos nutrientes dissolvidos nas amostras de águas de fundo: nitratos (NO_3^-), nitritos (NO_2^-), amónia (NH_4^+) e fosfato (PO_4^{3-}).	52
3.12	Variação mensal dos valores de coliformes fecais nas amostras de águas de fundo entre Outubro de 2004 e Setembro de 2005.	54

3.13	Variação mensal dos valores de CBO ₅ nas amostras de água de fundo entre Outubro de 2004 e Setembro de 2005.	55
3.13	Variação mensal dos potenciais de desnitrificação e da razão N ₂ O:N ₂ .	56
3.14	Divisão em grupos homogéneos (<i>Tukey multi-comparion test</i> , $p \leq 0,05$) dos locais de amostragem para as taxas de desnitrificação e percentagens de N ₂ O:N ₂ .	58

ÍNDICE DE TABELAS

2.1	Número de réplicas, precisão e limites de detecção dos métodos de análise de nutrientes usados no presente trabalho.	35
3.1	Média (MD), mínimo (m), máximo (M) e erro padrão (EP) do caudal diário do Rio Douro e precipitação total (T), precipitação mensal mínima (m) e máxima (M) na bacia hidrográfica em território português.	41
3.2	Caudal 3 dias (Q_3) e caudal médio mensal (Q_M) (média \pm erro padrão) registados no rio Douro durante os meses de amostragem.	41
3.3	Média anual (MD), mínimo (m), máximo (M) e erro padrão (EP) das contagens de bactérias nas amostras de sedimento e água, nos locais de amostragem.	46
3.4	Média (MD), mínimo (m), máximo (M) e erro padrão (EP) das concentrações de nutrientes dissolvidos e razão N:P, nos locais de amostragem.	53
3.5	Coeficientes de correlação de Pearson entre processos e variáveis ambientais.	59
A.1	Valores obtidos para os parâmetros medidos <i>in situ</i> na estação I.	89
A.2	Valores obtidos para os parâmetros medidos <i>in situ</i> na estação II.	89
A.3	Valores obtidos para os parâmetros medidos <i>in situ</i> na estação III.	90
A.4	Valores obtidos para os parâmetros medidos <i>in situ</i> na estação IV.	90

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Os problemas crescentes associados com a eutrofização estimularam o estudo da dinâmica de nutrientes em ecossistemas aquáticos, com especial ênfase do ciclo biogeoquímico do azoto, uma vez que as cargas de azoto inorgânico nestes sistemas têm vindo a aumentar.

1.1 O CICLO DO AZOTO

O elemento azoto (N) é um constituinte essencial de todos os seres vivos, cujas proteínas e ácidos nucleicos são macromoléculas azotadas, mas a maioria dos outros materiais biológicos contêm átomos de azoto. Pode-se calcular que plantas e animais nos solos e águas do Planeta contêm juntos cerca de $1,5 \times 10^{10}$ toneladas de N, sendo o ciclo do azoto responsável pela transformação de aproximadamente um quinto deste valor por ano (Postgate, 1987).

O ciclo do azoto é constituído por transformações múltiplas de compostos azotados, mediadas principalmente, por bactérias. O ciclo do azoto controla a disponibilidade de nutrientes azotados e, em última análise, a produtividade biológica nos sistemas aquáticos. A actividade humana influencia o ciclo de azoto, inclusive nos oceanos e alguns produtos azotados gasosos do metabolismo microbiano estão associados ao efeito de estufa causando a destruição da camada de ozono, pelo que encontram-se,

potencialmente, envolvidos no controlo do clima da Terra (Schlesinger, 1997; Zehr & Ward, 2002).

Os compostos azotados ocorrem sob diversas formas, que podem ser descritas em termos da sua estrutura química, estado de oxidação e fase sólido – líquido – gasoso. A complexidade do ciclo é demonstrada na Figura 1.1, onde se notam as reacções oxidação/redução envolvidas na transformação do azoto, cujo estado de oxidação varia entre o nitrato (NO_3^- , +5), a forma mais oxidada e a amónia (NH_4^+ , -3), para além dos compostos existentes nos estados intermédios. Estas transformações incluem: (i) redução de nitrato (NO_3^-) e nitrito (NO_2^-) a óxido nítrico (NO), óxido nitroso (N_2O) e azoto molecular (N_2) (desnitrificação), (ii) conversão de amónia a azoto orgânico por processos assimilativos, (iii) produção de NH_4^+ a partir da decomposição de azoto orgânico (amonificação), (iv) oxidação da NH_4^+ a NO_2^- e NO_3^- (nitrificação), (v) redução de N_2 a NH_4^+ e azoto molecular (fixação de azoto), (vi) redução de NO_3^- a NH_4^+ (redução dissimilativa de nitrato a amónia), (vii) oxidação de NH_4^+ a N_2 com NO_3^- ou NO_2^- como aceitador de electrões (oxidação anaeróbia da amónia). Estas conversões biogeoquímicas podem ser energeticamente favoráveis (p. ex., nitrificação e desnitrificação) ou desfavoráveis (p. ex., fixação de azoto), sendo processos fundamentais na biossíntese e bioenergética microbiana (Madigan *et al.*, 2003).

O complexo ciclo do azoto possui então algumas reacções chave que, de seguida, se descrevem, de forma resumida:

- 1) Fixação do azoto - A maioria dos microrganismos pode assimilar N sob várias formas, ainda que não consigam, em geral, utilizar o N_2 directamente. Embora 79% da atmosfera da Terra seja composta por azoto molecular, este importante reservatório de azoto está indisponível directamente para animais e plantas. A fixação do azoto é o processo de redução da molécula de N_2 a amónia, com adição de 3 electrões por átomo. Envolve a quebra de uma ligação tripla ($\text{N}\equiv\text{N}$), cuja energia de activação muito elevada requer grande quantidade de energia celular. A capacidade fixar azoto é encontrada apenas em alguns procariotas e,

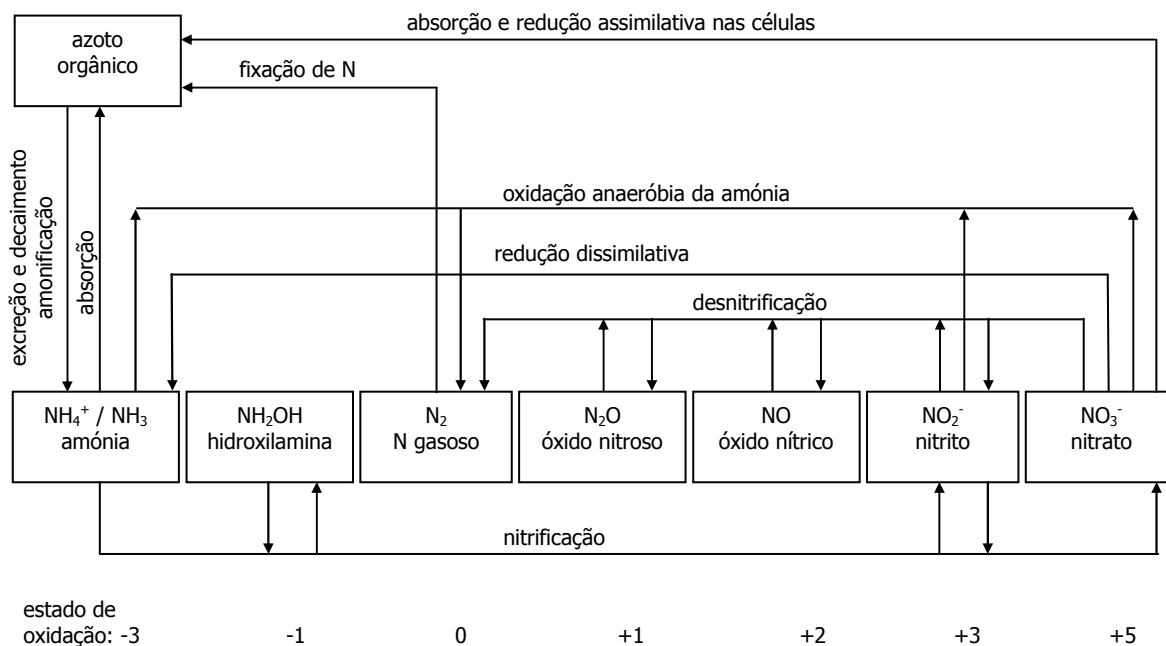


Figura 1.1 Transformações do azoto no meio ambiente (adaptado de Knox, 2001).

aparentemente, surgiu nas bactérias relativamente cedo. Este grupo especializado possui a enzima chave do processo, a nitrogenase, e inclui bactérias anaeróbicas, fotossintéticas e cianobactérias (Postgate, 1987; Ward, 1992; Herbert, 1999).

- 2) Amonificação - Toda a matéria viva contém macromoléculas azotadas, como ácidos nucleicos, proteínas e açúcares poliaminados, além de compostos de baixo peso molecular, que se tornam disponíveis após morte celular para os organismos decompositores ou quando são excretados para o meio onde se inserem. A amonificação envolve processos de hidrólise e desaminação durante a decomposição do material orgânico com a libertação de amónia (Ward, 1992; Herbert, 1999).

- 3) Nitrificação - A oxidação de amónia a nitrato é um processo que envolve dois passos: o primeiro mediado por bactérias oxidantes de amónia (ex. *Nitrosomonas*) produz nitrito que é oxidado a nitrato, sendo esta segunda etapa mediada por bactérias oxidantes de nitrito (ex. *Nitrobacter*). Normalmente, estes dois passos estão fortemente interligados, não se observando por isso acumulação de nitrito no ambiente. A nitrificação é um processo estritamente procariótico,

realizada por poucos microrganismos, que são quimolitotróficos aeróbios (Postgate, 1987; Ward, 1992; Herbert, 1999).

- 4) Desnitrificação - Processo microbiológico, envolvendo uma série de quatro reduções, através do qual bactérias heterotróficas oxidam a matéria orgânica usando nitrato como aceitador de electrões. O produto final é azoto gasoso – azoto molecular (N_2) ou óxido nitroso (N_2O) (Ward, 1992; Zumft, 1997; Herbert, 1999). A desnitrificação é um processo importante de remoção efectiva de azoto de sistemas aquáticos (Nixon, 1981).

- 5) Redução dissimilativa de nitrato a amónia (DNRA) – Um segundo mecanismo de redução de nitrato, também chamado de amonificação de nitrato, envolve bactérias heterotróficas, predominantemente fermentativas, com a capacidade de reduzir nitrato a amónia (Koike & Hattori, 1978; Herbert, 1999). Em contraste com a desnitrificação, a DNRA conserva o azoto fixado no sistema. Este processo assume alguma importância em ambientes organicamente ricos e com baixas concentrações de nitrato (Rysgaard *et al.*, 1996; Bonin *et al.*, 1998; Master *et al.*, 2005).

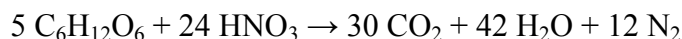
- 6) Oxidação anaeróbia da amónia (ANAMMOX) - A desnitrificação tem sido descrita como o único processo importante de remoção de azoto da *pool* existente em ambientes naturais. Recentemente, no entanto, descobriu-se que a amónia pode ser oxidada anaerobicamente em sedimentos na presença de nitrato ou nitrito (Mulder *et al.*, 1995; van de Graaf *et al.*, 1995) e que esta via alternativa pode contribuir significativamente para a produção bentónica de N_2 (Dalsgaard & Thamdrup, 2002). Por outro lado, em sedimentos superficiais e na presença de oxigénio, pode ocorrer a oxidação de N orgânico e NH_4^+ pelo óxido de manganês (MnO_2), com formação de N_2 (Luther *et al.*, 1997).

1.2 A DESNITRIFICAÇÃO

Sendo o processo, por excelência, de remoção de azoto do meio aquático, convém analisá-lo com algum detalhe.

A desnitrificação é conhecida há mais de um século como sendo o principal mecanismo de conversão do azoto combinado, a forma disponível para os eucariotas, em azoto molecular gasoso, completando assim o ciclo do azoto. Recentemente, a desnitrificação tem recebido uma atenção acrescida por ser a fonte principal de NO e N₂O, gases de importância fundamental para a destruição do ozono atmosférico e para o aquecimento global (Ye *et al.*, 1994).

As bactérias desnitrificantes usam NO₃⁻ como aceitador de electrões na oxidação anaeróbia da matéria orgânica libertando N₂ gasoso através da seguinte reacção:



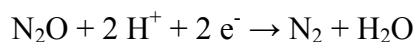
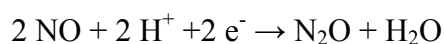
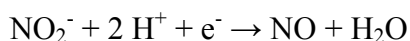
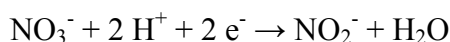
que produz 570 kcal/mole (Delwiche, 1970).

No meio aquático, a desnitrificação tem início quando começa a haver depleção de oxigénio ao longo da coluna de água ou nos sedimentos (abaixo do nível de penetração do oxigénio) em resultado da indução de um sistema enzimático em bactérias aeróbias facultativas que apenas podem utilizar óxidos azotados quando o nível de oxigénio está fortemente reduzido ou ausente.

As bactérias com capacidade para realizar a desnitrificação pertencem a uma grande variedade de grupos e englobam vários tipos de características fisiológicas. As chamadas *Proteobacteria* constituem a vasta maioria dos organismos capazes de realizar a desnitrificação. Nos procariotas e alguns fungos filamentosos, a redução de nitratos a intermediários gasosos é um processo respiratório, isto é, a redução do nitrato é acoplada à síntese de ATP via cadeia de transporte de electrões. Com poucas excepções, as bactérias desnitrificantes podem também respirar oxigénio

como aceitador terminal de electrões. Este gás está, geralmente, disponível em concentrações suficientes para funcionar como o aceitador de electrões preferido. No entanto, quando o oxigénio se torna limitante, a capacidade de utilizar nitrato como oxidante terminal permite às bactérias desnitrificantes continuar a respiração usando um aceitador de electrões alternativo (Zumft, 1997; Shapleigh, 2001).

A redução de nitrato a azoto molecular é um processo que se desenvolve em vários passos:



A desnitrificação completa até ao produto final, o azoto gasoso, requer quatro grupos separados de enzimas para a redução do nitrato e três óxidos de azoto intermédios (Figura 1.2).

No primeiro passo da desnitrificação, a redução de dois electrões de nitrato a nitrito é catalizada pela nitrato reductase. Quatro tipos de nitrato reductase foram descritos até ao presente: uma nitrato reductase eucariótica assimilativa e três enzimas bacterianas: uma enzima citoplasmática, uma enzima respiratória associada à membrana e uma enzima periplasmática dissimilativa (Einsle & Kroneck, 2004). O dador directo de electrões usado pela nitrato reductase é a quinona membranar. (Zumft, 1997; Shapleigh, 2001; Einsle & Kroneck, 2004).

A presença da N_2O reductase pode ser identificada independentemente das outras reductases porque muitos organismos podem crescer com o N_2O como único oxidante terminal. Apesar da reacção ser bastante exergónica ($\Delta G^0 = -340 \text{ kJ mol}^{-1}$) devido à estabilidade do produto final (N_2), o óxido nitroso é relativamente inerte à temperatura ambiente e a sua transformação requer um catalizador eficaz (Einsle & Kroneck, 2004). A actividade desta enzima é estritamente dependente de cobre.

O último passo da redução do óxido nitroso a azoto molecular pode ser bloqueado, pelo que o produto final da desnitrificação não é necessariamente o azoto molecular. O acetileno (C_2H_2) inibe a redução de N_2O , embora não seja conhecido o mecanismo de acção. Por este motivo, o acetileno tem sido muito útil no estudo da desnitrificação (Zumft, 1997; Shapleigh, 2001). Assim sendo, o óxido nitroso pode ser libertado ou consumido durante a desnitrificação.

O maior pré-requisito para a desnitrificação é a disponibilidade de nitrato (incluindo nitrito). No caso do ambiente marinho a fonte predominante é o nitrato derivado da nitrificação, ainda que o nitrato da camada de água adjacente se possa misturar no sedimento por bioturvação, bioirrigação ou difusão. Além disso, a desnitrificação é fortemente dependente da temperatura, da concentração de oxigénio e da disponibilidade da matéria orgânica. Há também evidências que a desnitrificação pode ser indirectamente afectada por taxas de redução de sulfato elevadas, uma vez que a presença de sulfuretos inibe completamente a nitrificação que por sua vez é necessária à desnitrificação (Seitzinger, 1988). Geralmente, as condições mais apropriadas para a desnitrificação ocorrem quando os níveis de disponibilidade de carbono são intermédios, ou seja, quando o carbono não é limitante nem para a respiração aeróbia nem para a nitrificação (fonte de nitrato), mas a redução de sulfato é ainda baixa ou ausente (Hensel & Zabel, 2000).

As áreas estuarinas e zonas costeiras são locais de produção activa de óxido nitroso (N_2O), através da desnitrificação (Usui *et al.*, 2001; Dong *et al.*, 2002; Punshon & Moore, 2004, Magalhães *et al.*, 2005b). A carga de nutrientes de origem terrestre juntamente com a proximidade entre as zonas bântica e pelágica devido às baixas

profundidades estimulam os processos bacterianos (Usui *et al.*, 2001). Um apanhado de estudos realizados em sistemas costeiros (Seitzinger, 2000) revela que a remoção de azoto inorgânico pela actividade desnitrificante pode atingir os 100 %.

1.3 DESNITRIFICAÇÃO EM SEDIMENTOS

Os nutrientes (N e P) são importantes no controle da produção primária em ecossistemas aquáticos. A disponibilidade de N e P dentro do ecossistema é, parcialmente, função da taxa de enriquecimento externo do sistema e da remoção permanente dentro do sistema por processos biológicos, químicos e/ou físicos. O azoto pode ser nutriente limitante em muitos estuários, sistemas costeiros, plataforma continental, lagos e rios (Seitzinger, 1990; Cornwell *et al.*, 1999).

As zonas estuarinas são locais de importância fundamental nos processos biogeoquímicos que ocorrem à escala global, principalmente, porque representam uma via preferencial de transporte de material proveniente dos continentes para os oceanos.

Medidas levadas a cabo com um micro-sensor combinado para O₂ e N₂O indicaram que a desnitrificação está restrita a uma fina camada anóxica abaixo da zona óxica (Christensen *et al.*, 1989). A desnitrificação é o mais importante processo biológico que produz azoto livre. Remove compostos de azoto fixados e, por isso, exerce uma retroacção negativa sobre a eutrofização. Por exemplo, a desnitrificação em rios e ambientes costeiros diminui em cerca de 40% o teor em azoto de origem continental transportado para os oceanos (Seitzinger, 1988).

A desnitrificação em sedimentos ou águas anóxicas remove N dos sistemas aquáticos visto que o azoto gasoso produzido é libertado para a atmosfera. A desnitrificação em sistemas aquáticos contribui, assim, para a diminuição da quantidade de azoto disponível para a produção primária, assim como diminui o transporte de N ao longo

do gradiente rio-mar. Em sistemas aquáticos que recebem N de fontes externas, a remoção de uma porção de N via desnitrificação pode ajudar a controlar o grau de eutrofização do sistema.

Os sedimentos aquáticos apresentam-se como um ambiente propício para a desnitrificação (Figura 1.3). São um local de concentração de matéria orgânica a partir da coluna de água que, após decomposição, liberta NH_4^+ . A amónia é, de seguida, disponibilizada para a nitrificação e subsequente desnitrificação. Além disso, o NO_3^- da água adjacente pode difundir-se para os sedimentos, especialmente em sistemas relativamente eutróficos, onde a concentração de NO_3^- na água é elevada. Estas características, em combinação com a justaposição de faixas aeróbias e anaeróbias nos microambientes da interface sedimento – água, conduz à elevada capacidade de desnitrificação em sedimentos aquáticos (Seitzinger, 1990; Seitzinger, 2000).

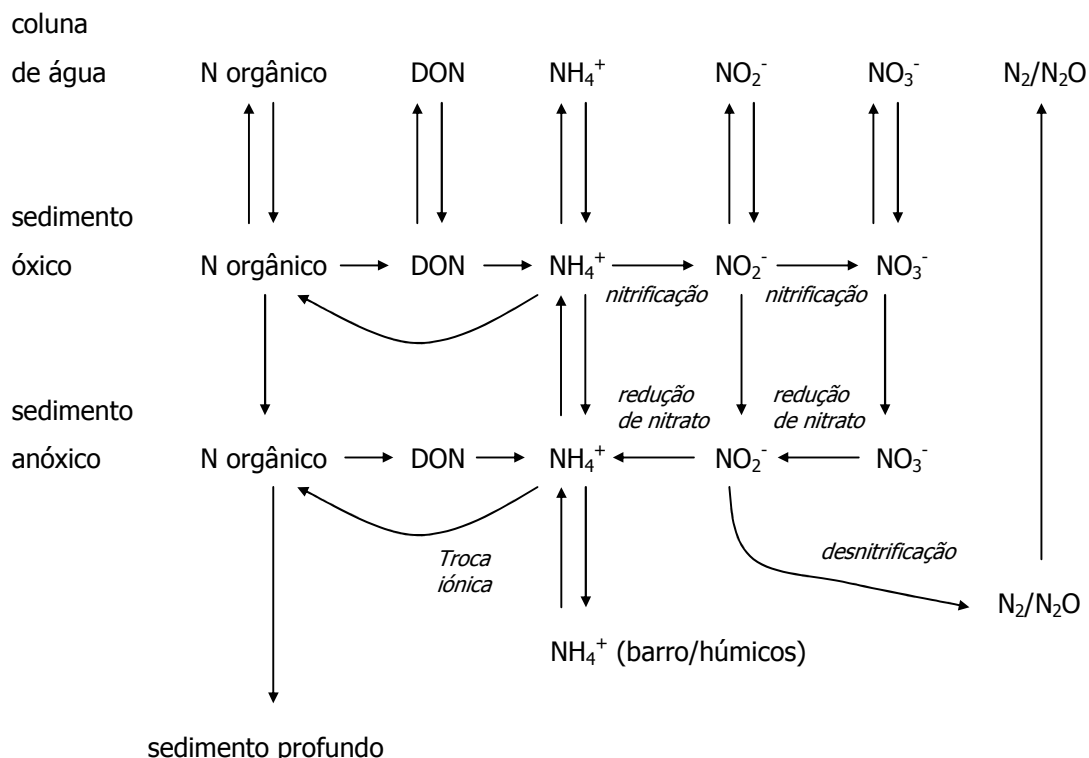


Figura 1.3 Representação esquemática da circulação do azoto em sedimentos (Herbert, 1999).

A desnitrificação é, assim, um processo relativamente ubíquo em sedimentos aquáticos. As taxas de desnitrificação mais baixas ocorrem, geralmente, em sedimentos de alto mar ($0,03$ a $4 \mu\text{mol N m}^{-2} \text{h}^{-1}$), com taxas em sedimentos da plataforma continental cerca de uma ordem de magnitude mais elevadas (até $20 \mu\text{mol N m}^{-2} \text{h}^{-1}$) (Seitzinger, 1990; Herbert, 1999). Em lagos oligotróficos a moderadamente eutróficos, as taxas de desnitrificação variam geralmente entre 2 a $60 \mu\text{mol N m}^{-2} \text{h}^{-1}$, sendo as taxas mais altas encontradas em lagos eutróficos (20 a $292 \mu\text{mol N m}^{-2} \text{h}^{-1}$). Algumas das taxas mais elevadas de desnitrificação ocorrem em sedimentos estuarinos muito poluídos ($> 500 \mu\text{mol N m}^{-2} \text{h}^{-1}$) (Seitzinger, 1990); no entanto, as taxas na maioria dos estuários variam entre 5 a $250 \mu\text{mol N m}^{-2} \text{h}^{-1}$. No estuário do Rio Douro, foram medidos valores de desnitrificação entre 9 e $360 \mu\text{mol N m}^{-2} \text{h}^{-1}$, em sedimentos arenosos e biofilmes rochosos na zona intertidal (Magalhães *et al.*, 2005b).

A desnitrificação é também activa em rios. A maioria dos estudos é conduzida em rios relativamente eutróficos com taxas de desnitrificação variando geralmente desde 40 até $2121 \mu\text{mol N m}^{-2} \text{h}^{-1}$ (Seitzinger, 1990). A maioria das medições de desnitrificação em sistemas de água pouco profundas é de sistemas temperados que presentemente recebem quantidades consideráveis de nutrientes de origem antropogénica.

Em muitos sistemas aquáticos, os sedimentos são uma fonte importante de azoto recirculado (NH_4^+ e NO_2^-) para a produção primária. Por exemplo, em estuários e zonas costeiras, a recirculação de azoto a partir dos sedimentos contribui entre 20% e 80% para as necessidades de N do fitoplâncton (Seitzinger, 1990; Herbert, 1999). No entanto, uma maior porção do azoto orgânico recirculado através dos sedimentos aquáticos não regressa à coluna de água sob a forma de NH_4^+ ou NO_3^- , sendo removida pela desnitrificação. Neste caso, a remoção de azoto pela desnitrificação nos sedimentos nestes sistemas pode assim ser importante para a regulação da produção de algas e/ou macrófitas.

1.3.1 FACTORES CONTROLADORES DA TAXA DE DESNITRIFICAÇÃO

O conhecimento da importância da remoção de azoto via desnitrificação, em rios e estuários, é limitado pela potencial regulação deste processo por factores hidrológicos, biológicos, químicos e geológicos. Todos os processos que ocorrem em zonas estuarinas estão sujeitos à influência de inúmeros factores (marés, caudal fluvial, intrusão salina, temperatura) que se caracterizam por forte variabilidade espacial e temporal.

No caso específico da desnitrificação, um número de factores foi identificado pela sua influência sobre as taxas de desnitrificação em sedimentos aquáticos, onde se incluem o oxigénio, os nitratos, a matéria orgânica, o pH, a temperatura e compostos tóxicos de origem antropogénica (Knowles, 1982; Seitzinger, 1990; Pfenning & McMahon, 1998; Kim *et al.*, 1997; Barnes & Owens, 1998; Cornwell *et al.*, 1999; Herbert, 1999; Joye & An, 1999; van Luijn *et al.*, 1999; Dong *et al.*, 2002; Kemp & Dodds, 2002; Wang *et al.*, 2003). Muitos destes factores estão interrelacionados, resultando em padrões de desnitrificação espaciais e temporais complexos.

A disponibilidade de NO_3^- é um factor importante no controlo das taxas de desnitrificação em muitos sedimentos aquáticos pois está na base das reacções subsequentes. As taxas de desnitrificação medidas em *slurries* de sedimento homogeneizado aumentam em função da concentração de NO_3^- e geralmente podem ser descritas por uma cinética do tipo Michaelis-Menten. A taxa de desnitrificação *in situ* para uma dada concentração de NO_3^- é espacialmente variável. Esta variabilidade sugere que outros factores além da concentração de NO_3^- (ex., conteúdo orgânico, população de desnitrificantes, etc.) são importantes para o controlo de taxas de desnitrificação (Seitzinger, 1990; Barnes & Owens, 1998; Cornwell *et al.*, 1999; Herbert, 1999).

A fauna e flora locais podem ter um efeito significativo na estimulação da desnitrificação (Seitzinger, 1990; Rysgaard *et al.*, 1995; Barnes & Owens, 1998; Cornwell, 1999). A bioturvação mobiliza NO_3^- e oxigénio para a nitrificação a partir

da água sobrenadante ou de sedimentos superficiais para camadas mais profundas. O oxigénio transportado através de rizomas e raízes de macrófitas e libertado em zonas previamente anóxicas, pode estimular a nitrificação, fornecendo adicionalmente NO_3^- para a desnitrificação. As macrófitas podem também estimular a desnitrificação por aumentarem a quantidade de matéria orgânica degradável nos sedimentos através da retenção de detritos orgânicos a partir da coluna de água. As algas bentónicas podem reduzir a taxa de desnitrificação em sedimentos superficiais devido à produção de oxigénio durante a fotossíntese (An & Joye, 2001; Sundbäck & Miles, 2002). Mas, em sedimentos arenosos, de baixo conteúdo orgânico o efeito pode ser inverso via aumento da matéria orgânica nos sedimentos (Seitzinger, 1990).

O padrão sazonal de variação da desnitrificação num sistema depende de quais os factores controladores do processo num dado período. A presença de nitratos na água sobrenadante é a maior fonte de NO_3^- para a desnitrificação em sistemas muito poluídos, onde a sua concentração é elevada. As variações sazonais da concentração de NO_3^- na coluna de água são um factor determinante nas taxas de desnitrificação nestes sistemas (Seitzinger, 1990). Por outro lado, existe uma relação próxima entre a nitrificação na zona óxica e a desnitrificação na zona anóxica (Nishio *et al.*, 1983). As taxas de respiração do sedimento têm também um papel importante na dinâmica da nitrificação e desnitrificação. Baixas taxas de desnitrificação foram encontradas em sedimentos com baixas taxas de respiração (Cook *et al.*, 2004). Em ambientes aquáticos contendo baixas concentrações de NO_3^- na água (zonas costeiras) conteúdos maiores de O_2 vão estimular a desnitrificação, ocorrendo o oposto em sistemas onde as concentrações de NO_3^- são elevadas (lagos e rios eutróficos) (Rysgaard *et al.*, 1994; Cornwell *et al.*, 1999).

1.4 ESTUÁRIOS

A palavra estuário deriva do latim *aestus*, significando calor, fervente ou maré. Especificamente, o adjectivo *aestuarium* significa tidal ou sujeito à acção das marés (Day *et al.*, 1989). Os dicionários, no entanto, centram-se no encontro entre mar e rio. A definição de Pritchard (1967): *um estuário é uma massa costeira de água semi-encerrada, com ligação livre ao mar e na qual a água do mar é comensuravelmente diluída com água doce proveniente da drenagem terrestre é, talvez, a mais citada na literatura científica. Outras definições foram surgindo, nomeadamente a proposta por Fairbridge (1980) que descreve um estuário, como: uma entrada de mar que alcança um vale fluvial até ao limite da propagação da maré, divisível em 3 sectores; (a) estuário marítimo ou inferior, com ligação livre ao mar aberto; (b) estuário médio, sujeito a mistura intensa entre água doce e salgada; e (c) estuário superior ou fluvial, com água doce mas sujeito a acção tidal diária. Os limites entre estes sectores são variáveis e sujeitos a mudanças constantes nas descargas fluviais.*

Estas definições são baseadas essencialmente em características físicas e geológicas. Ao longo dos anos, foram desenvolvidos diferentes esquemas de classificação para os tipos de estuários, com base no tipo de circulação e estratificação da água (Pritchard, 1967a), segundo a amplitude tidal (Davies, 1964), dando relevância às características biológicas (Laffoley & Hiscock, 1993) ou a acidentes geográficos (Elliot & McLusky, 2002).

Os estuários podem ser considerados como zonas de transição funcionais entre os habitats de água doce e marinho, embora as suas características físicas e biológicas mais importantes não sejam de transição, mas sim específicas (Odum, 1997). O papel desempenhado pelos estuários, enquanto recurso natural, advém do seu posicionamento de interface entre estes dois ecossistemas (Ketchum, 1969). Daí resulta a passagem ininterrupta de nutrientes e matéria orgânica de origem continental, que estão sujeitos à acção de vários processos físicos, geológicos,

químicos e biológicos durante a permanência no interior do estuário (Smith *et al.*, 1987; Joye & Pearl, 1993).

As fontes naturais de nutrientes e matéria orgânica de um estuário podem ser o próprio rio e a zona costeira adjacente, a drenagem das margens e escorrências da precipitação (Bordalo, 1991). Paralelamente, os estuários estão sujeitos a constantes descargas de origem antropogénica tais como os esgotos urbanos, a actividade agrícola e industrial, que contribuem significativamente para o aumento da carga orgânica e a acumulação de nutrientes dentro do sistema estuarino (Ogilvie *et al.*, 1997; van Luijn *et al.*, 1999). A actividade microbiana domina os processos de decomposição e reciclagem dos nutrientes, assumindo uma função importante em toda a estrutura biológica dum estuário (Day *et al.*, 1989). A importância relativa dos processos biológicos, químicos e físicos variam consideravelmente entre os vários ecossistemas estuarinos e dentro do mesmo estuário, de acordo com as diferentes escalas temporais e espaciais.

Os ecossistemas estuarinos são, actualmente, objecto de um crescente interesse científico devido não só ao facto de neles se desenvolverem actividades importantes para o homem, mas também a uma tomada de consciência da função económica e ecológica destes sistemas e à necessidade urgente de os preservar e de lhes restituir as suas capacidades originais (Lasserre, 1979; Constanza *et al.*, 1997).

1.5 ESTUÁRIO DO RIO DOURO: BREVE CARACTERIZAÇÃO

O Rio Douro drena a maior bacia hidrográfica da Península Ibérica. Os 97 600 km² de bacia cobrem cerca de 17 % da Península, dos quais 20 % em Portugal e 80 % em Espanha. O rio desagua no Oceano Atlântico a 41° 08' N; 08° 42' W, entre as cidades de Porto e Vila Nova de Gaia.

Na bacia do Rio Douro existem mais de 50 grandes aproveitamentos hidroeléctricos dispostos ao longo do seu curso principal e afluentes, o último dos quais situa-se a 21,6 km da barra (Crestuma-Lever), tendo entrado em funcionamento em 1985.

O estuário situa-se entre a barra e a barragem de Crestuma-Lever, onde o rio corre num vale encaixado e somente a 2,9 km da barra ocorre o alargamento das margens, atingindo a largura máxima de 1300 m. A barra encontra-se parcialmente obstruída por uma língua de areia extremamente flexível na sua morfologia.

O estuário inferior estende-se 3 km a partir da embocadura correspondendo à zona de expansão máxima da cunha salina durante o Inverno; o estuário médio é limitado, a montante, pela intrusão salina durante o Verão (cerca 8 km), o estuário superior compreende o restante percurso até à barragem (Bordalo, 1991; Vieira & Bordalo, 2000).

O estuário, com características mesotidais, tem uma profundidade média de 8,2 m, possui um canal de navegação com 6 m de profundidade e 60 m de largura, mantido à custa de sucessivas dragagens. As marés são semi-diurnas espaçadas sensivelmente de 6 horas, com uma amplitude de 2 a 4 m. O caudal de água doce é, actualmente, de $505 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$.

Nas margens do estuário desenvolveram-se três concelhos ribeirinhos (Porto, Vila Nova de Gaia e Gondomar), que exercem uma grande pressão antropogénica sobre o ecossistema. Para além de receptor de efluentes tratados e não tratados, o estuário é também utilizado para actividades de lazer (banhos, pesca desportiva, desportos náuticos, etc.) e fins comerciais (pesca profissional, navegação fluvial de turismo, extracção de inertes e navegação entre rio e mar de granéis).

Desde 1985, têm sido realizados vários estudos na coluna de água do estuário do Rio Douro. Estes contribuíram para uma melhor percepção do metabolismo bacterio e fitoplanctónico, da dinâmica de nutrientes (Bordalo, 1991; Bordalo, 1993; Bordalo &

Lobo-da-Cunha, 1994) e da hidrodinâmica (Bordalo, 1997; Vieira & Bordalo, 2000; Bordalo & Vieira, 2005) do estuário.

A dinâmica das fases larvar e juvenil da ictiofauna do estuário foi estudada por Ramos (2001). A variação espacial e sazonal de populações de Bacteria e Archaea foi caracterizada em sedimentos intertidais e na coluna de água (Abreu *et al.*, 2003 e Abreu, 2005).

Os sedimentos intertidais do rio Douro foram caracterizados em termos das comunidades macrobênticas e concentração de metais (Mucha *et al.*, 2003; Mucha *et al.*, 2004; Mucha *et al.*, 2005). Estes estudos revelaram um claro sinal de contaminação antropogénica de zinco, cobre, chumbo e crómio em concentrações possivelmente tóxicas para os organismos bentónicos.

A importância da produção primária bêntica e dos fluxos de nutrientes inorgânicos entre sedimentos intertidais e coluna de água foi avaliada por Magalhães *et al.* (2002). Os resultados demonstraram que a produtividade da zona intertidal e a sua capacidade de remoção de nutrientes orgânicos da coluna de água assumem um papel importante no estuário. Os resultados mostram que a diversidade da comunidade de Bacteria não apresentou variabilidade sazonal ou espacial, a diversidade de Archaea apresentou padrões sazonais. Mais recentemente, foram estudados os processos envolvidos no ciclo de azoto inorgânico (N_{inorg}) em sedimentos e biofilmes rochosos da zona intertidal e a sua relação com variáveis ambientais (Magalhães *et al.*, 2005a; Magalhães *et al.*, 2005b). Os resultados revelam que, em termos de balanço total, os sedimentos lodosos funcionam como uma fonte de N_{inorg} para o sistema e os sedimentos arenosos e zonas de biofilme rochoso removem estes compostos do sistema. Foi encontrado também um efeito positivo da concentração de nitratos dissolvidos no processo de desnitrificação e relação directa entre a salinidade e a concentração de amónia na actividade nitrificante.

Na área da ecotoxicologia, têm vindo a ser desenvolvidos estudos usando as espécies *Mugil cephalus* (tainha) e *Platichthys flesus* (solha) como organismos teste (Ferreira *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2005).

1.6 OBJECTIVOS

Desde meados dos anos 70, o interesse na função dos sedimentos estuarinos nos ciclos biogeoquímicos tem vindo a crescer. Os sedimentos são considerados como grandes armadilhas de matéria orgânica. Por outro lado, a decomposição da matéria orgânica pode resultar em trocas de nutrientes com a coluna de água (Rizzo, 1990). Ao mesmo tempo, os sedimentos actuam como potenciais removedores de azoto inorgânico através da desnitrificação. Desta forma, podem contribuir de modo decisivo para o combate à eutrofização dos sistemas aquáticos.

Neste contexto, o trabalho de investigação desenvolvido no âmbito desta tese de mestrado, teve dois objectivos principais:

(i) avaliar espacial e temporalmente a variação dos potenciais de desnitrificação nos sedimentos subtidais do estuário do rio Douro;

(ii) estudar possíveis relações entre as características do sedimento e da qualidade da água com a actividade desnitrificante.

CAPÍTULO 2

MATERIAL E MÉTODOS

2.1 LOCAIS E ESTRATÉGIA DE AMOSTRAGEM

Sendo o estuário do Rio Douro um sistema altamente intervencionado pelo homem e atendendo ao hidrodinamismo que este sistema apresenta, a escolha de locais de amostragem foi ponderada pelas características geomorfológicas e físicas do estuário de modo a caracterizar espacialmente e ao longo do tempo, a ocorrência dos processos em estudo. Assim, foram identificadas quatro zonas para a realização das recolhas, localizadas no estuário inferior – Cantareira (estação I), médio – Massarelos (estação II) e Ribeira (estação III), e superior – Gramido (estação IV) (Figura 2.1). A estação I sofre a influência do exutor da ETAR de Sobreiras, próximo das estações II e III descarregam duas ribeiras que se encontram entubadas (Ribeira de Massarelos e Rio da Vila, respectivamente), a estação IV localiza-se em frente ao cais de Gramido/Avintes, sofrendo menor pressão urbana.

A recolha de amostras decorreu mensalmente durante um período de um ano, entre Outubro de 2004 e Setembro de 2005 cobrindo, portanto, o ano hidrológico 2004/05. As campanhas de amostragem foram realizadas durante a vazante utilizando um barco pneumático. Os sedimentos foram colhidos fora do canal de navegação devido à perturbação exercida pela actividade de extracção de areias.

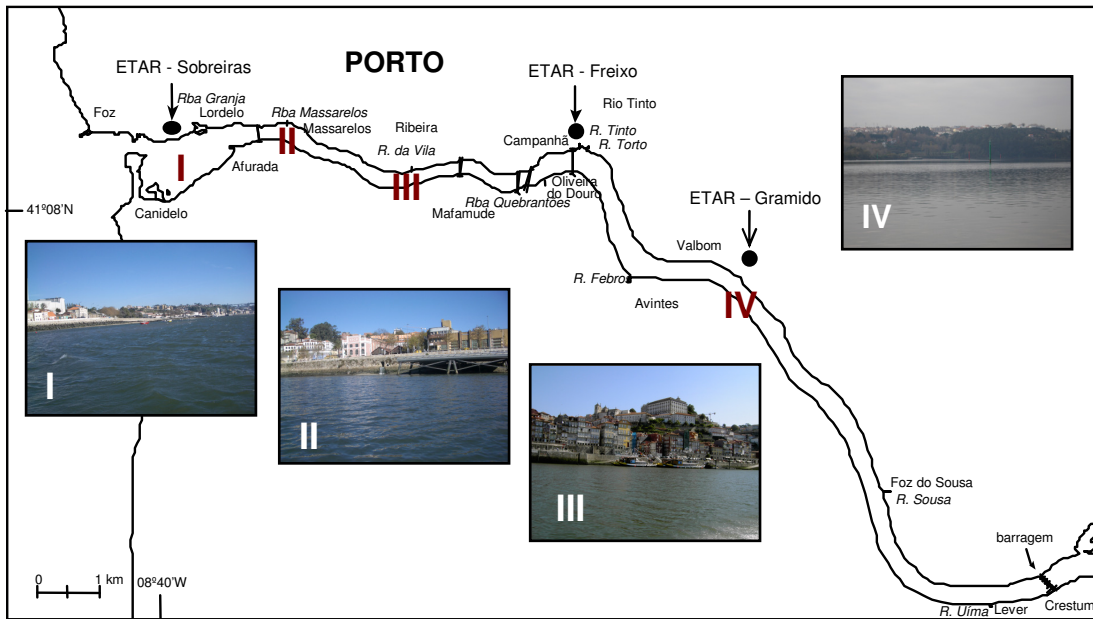


Figura 2.1 Mapa do estuário do rio Douro com a localização das estações de amostragem (I-Cantareira, II-Massarelos, III-Ribeira, IV-Gramido).

Os sedimentos subtidais foram colhidos recorrendo a uma draga Petit Ponar. Esta draga é de operação manual, abrangendo uma área de 15 cm x 15 cm com um volume total de amostra de cerca de 1000 cm³ (Mudroch & Azcue, 1995). As vantagens da utilização de uma draga pequena são: a operacionalidade no espaço limitado do barco e ausência de necessidade de equipamento suplementar. No entanto, este tipo de draga torna-se difícil de manobrar em condições fortes de corrente.

A quantidade de sedimento recolhido em cada local foi variável dependendo das suas características granulométricas, das condições de corrente e ondulação (mais acentuada na barra) e da profundidade. Em cada local foram realizadas várias dragagens até obtenção de quantidade suficiente de matéria para análise.

O total de amostra recolhida foi homogeneizado e, para as experiências de desnitrificação, pequenos *cores* de sedimento foram retirados para um saco estéril, recorrendo a uma seringa de 50 ml cortada. O restante sedimento foi transferido para

um saco que foi fechado e colocado numa mala térmica refrigerada. Este procedimento foi repetido para cada local.

Paralelamente, foram recolhidas amostras de água de fundo para análise laboratorial de nutrientes (amónia, nitrito, nitrato e fosfato). Estas amostras foram colhidas com recurso a uma garrafa de Van-Dorn de 2 litros. As amostras de água foram também utilizadas para a realização das experiências de desnitrificação. As garrafas de água foram colocadas e transportadas em mala térmica refrigerada.

No laboratório, as amostras de sedimento foram armazenadas a 4 °C até serem processadas, o que aconteceu a partir das 24h seguintes à colheita.

2.2 CARACTERIZAÇÃO DO SEDIMENTO

2.2.1 MATÉRIA ORGÂNICA

As amostras foram secas até peso constante a 65°C. O conteúdo em matéria orgânica (MO) foi determinado através de ignição a 500°C durante 4 h, calculado como a diferença entre o peso do sedimento seco e o peso das cinzas (APHA, 1992). Devido ao método de amostragem, no qual o sedimento é dragado juntamente com alguma água, não foi possível avaliar a percentagem de humidade nos sedimentos.

2.2.2 GRANULOMETRIA

A análise granulométrica do sedimento foi realizada por via seca numa coluna de crivos usando um agitador de peneiros automático (CISA RP.08). Cerca de cem gramas de sedimento seco, previamente tratado com peróxido de hidrogénio, foram colocados no topo da coluna de crivos e agitados mecanicamente. O tempo e intensidade de vibração foram adaptados ao tipo de amostra.

Os sedimentos foram divididos em 7 fracções: limo e argila ($< 0,063$ mm, $> 4 \phi$), areia muito fina (0,063 a 0,125 mm, 4 a 3 ϕ), areia fina (0,125 a 0,250 mm, 3 a 2 ϕ), areia média (0,25 a 0,50 mm, 2 a 1 ϕ), areia grossa (0,50 a 1,00 mm, 1 a 0 ϕ), areia muito grossa (1 a 2 mm, 0 a -1 ϕ) e areão (> 2 mm, $< -1 \phi$), de acordo com Mudroch e Azcue (1995). Cada fracção foi pesada e expressa como percentagem de peso total.

2.2.3 POTENCIAL DE OXIDAÇÃO-REDUÇÃO E DENSIDADE

O potencial de oxidação-redução (ORP) das amostras de sedimento foi avaliado usando um aparelho Hanna (mod. HI 9023) equipado com um eléctrodo ORP de platina (HI 3131).

A densidade consiste na massa de um material dividido pelo seu volume. Esta propriedade foi estimada através do método gravimétrico, medindo a variação de volume produzida pela adição de uma quantidade conhecida de sedimento seco a um volume constante de água.

2.2.4 NÚMERO TOTAL DE BACTÉRIAS

A contagem do número total de bactérias no sedimento (NTBs) foi efectuada recorrendo à epifluorescência usando DAPI (*4',6-diamidino-2-phenylindone*) como fluorocromo (Porter & Feig, 1980). O DAPI liga-se ao DNA formando um complexo fluorescente azul permitindo quantificar as células microbianas. Um grama de sedimento húmido foi fixado numa solução salina a 9 ‰ com um surfactante (Tween 80) e formaldeído, filtrados por 0,2 μ m. Após sonicação, a amostra foi deixada repousar durante a noite. Sub-amostras de sobrenadante foram marcadas com DAPI e filtradas por uma membrana preta de polycarbonato, montada entre lâmina e lamela. As células foram contadas num microscópio Nikon Labophot de epifluorescência equipado com uma lâmpada de mercúrio. Em cada lâmina foram contados 10 campos de visão, acumulando pelo menos 300 células.

2.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E QUÍMICA DA ÁGUA

2.3.1 MEDIÇÕES *in situ*

Nas quatro estações de amostragem e em todas as campanhas, foram avaliadas, no local, a temperatura, salinidade, condutividade, pH, concentração e percentagem de saturação de oxigénio dissolvido e turbidez. Estas variáveis foram medidas com o aparelho YSI série 6000. A calibração das sondas foi efectuada de acordo com as especificações do fabricante.

2.3.2 NUTRIENTES

As concentrações de nutrientes (NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- e PO_4^{3-}) nas amostras de água foram determinadas por métodos de espectrometria de absorção molecular.

Cada amostra foi analisada em triplicado. A concentração de nutrientes nas amostras foi determinada através de rectas padrão obtidas por leitura de quatro padrões de concentrações progressivas, preparados no próprio dia. Na Tabela 2.1 estão patentes os limites de detecção (valor médio do branco mais duas vezes o desvio padrão) e a precisão (valores do coeficiente de variação entre as réplicas) dos métodos analíticos usados para a determinação da concentração dos nutrientes.

Amónia - Para a quantificação da concentração de amónia (NH_4^+) nas amostras de água foi usado o método fenol-hipoclorito de Koroleff (*in* Grasshoff *et al.*, 1983). A amónia numa solução alcalina de citrato com hipoclorito de sódio e fenol, e na presença de um catalisador (nitroprussiato), forma um complexo azul de indofenol. A absorvância foi lida por espectrofotometria (Spectronic 601) no comprimento de onda de 630 nm.

Tabela 2.1 Número de réplicas, precisão e limites de detecção dos métodos de análise de nutrientes usados no presente trabalho.

	<i>Precisão</i>	<i>Limite de Detecção</i>	<i>Réplicas</i>
<i>Fosfato</i>	0,3-5%	0,03 μM	3
<i>Amónia</i>	0,2-8%	0,1 μM	3
<i>Nitrito</i>	0,1-7%	0,02 μM	3
<i>Nitrato</i>	0,3-6%	0,3 μM	3

Nitrito - O método colorimétrico usado para a determinação dos nitritos encontra-se descrito em Grasshoff *et al.* (1983). O nitrato é determinado através da formação de um composto rosa juntando sulfanilamida diazotada com uma segunda amina aromática (N-(1-naftil)-etilenodiamina). Após o processamento das amostras, a sua densidade óptica foi medida por espectrofotometria (Spectronic 601) no comprimento de onda de 540 nm.

Nitrato - A concentração de nitratos nas amostras foi determinada a partir do método de redução com cádmio esponjoso, descrito por Jones (1984) e adaptado por Joye & Chambers (1993). Este baseia-se na redução de nitratos a nitritos e subsequente determinação dos nitritos formados, sem recurso a uma coluna de cádmio. Após a redução de nitratos a nitritos, seguiu-se a metodologia usada para a determinação dos nitritos.

Fosfato - Na determinação de ortofosfatos (PO_4^{3-}) foi usado o método do ácido ascórbico, referido por Koroleff (*in* Grasshoff *et al.*, 1983). O molibdato de amónia e o tartrato de antimónio e potássio reagem em meio ácido com o ortofosfato dando origem ao composto ácido fosfomolibdico que é reduzido pelo ácido ascórbico, formando-se um complexo de molibdato, de intensa cor azul. A densidade óptica foi medida por espectrofotometria (Spectronic 601) a 880 nm.

2.3.3 NÚMERO TOTAL DE BACTÉRIAS

Para contagem do número total de bactérias na água (NTBa), as amostras foram fixadas em formaldeído 4 % (v/v), filtrado por 0,2 µm e armazenadas a 4 °C até processamento. Sub-amostras de 1 ml foram marcadas com DAPI e incubadas durante 5 minutos (Porter & Feig, 1980). As amostras foram depois filtradas por membranas pretas de policarbonato e montadas entre lâmina e lamela. As células foram contadas num microscópio Nikon Labophot de epifluorescência equipado com uma lâmpada de mercúrio. Em cada lâmina foram contados 10 campos de visão, acumulando pelo menos 300 células. Os resultados foram expressos em logaritmo decimal do número de células por mililitro.

2.3.4 COLIFORMES FECAIS

A contaminação fecal da água foi avaliada através da contagem do número de colónias de coliformes fecais (CF), cultivadas em meio selectivo mFC, após incubação a 44,5 °C durante 18-24 horas (Bordalo, 1994). Foram contadas as colónias típicas e os resultados expressos como unidades formadoras de colónias (ufc) por 100 mililitros de amostra.

2.3.5 CARÊNCIA BIOQUÍMICA DO OXIGÉNIO (CBO₅)

Este teste é uma medida do oxigénio necessário para a degradação bioquímica da matéria orgânica contida numa amostra de água, durante um período de incubação de 5 dias. O oxigénio dissolvido antes e depois da incubação foi determinado pelo método de Winkler modificado (Carritt & Carpenter, 1966). Este método baseia-se numa série de reacções químicas que convertem o oxigénio dissolvido na amostra numa quantidade química equivalente de iodeto. As amostras foram fixadas após a sua colheita (oxigénio inicial) em frascos de CBO de 100 ml. De cada frasco, previamente acidificado, foram retiradas duas subamostras de 25 ml que foram

imediatamente tituladas com uma solução padrão de tiosulfato de sódio 0,01 N, usando amido como indicador. Ao fim de 5 dias, o processo foi repetido com os frascos incubados no escuro a 20 ± 1 °C (oxigénio final). O valor da CBO_5 foi obtido pela diferença entre os valores inicial e final de oxigénio e expresso em miligramas de oxigénio por litro.

2.4 AVALIAÇÃO DAS TAXAS DE DESNITRIFICAÇÃO

As taxas de desnitrificação foram avaliadas em *slurries*, usando a técnica de inibição com acetileno (Sørensen, 1978), em condições enriquecidas em nitrato e carbono e reduzidas em O_2 .

O método de inibição com acetileno avalia o potencial enzimático de desnitrificação num volume conhecido de sedimento e não representa uma medição *in situ* da desnitrificação. É reconhecido que adicionando nitrato à amostra, induzindo condições anaeróbias e agitando a amostra, o método naturalmente produz uma taxa de desnitrificação mais elevada do que a que seria de esperar pela actividade *in situ* da amostra. Estas modificações introduzidas no método foram desenvolvidas para promover um nível máximo de actividade desnitrificante das bactérias. Assim, as taxas determinadas por este procedimento são referidas como medições dos potenciais de desnitrificação.

Para cada estação, a água de incubação consistiu em água estuarina filtrada por 0,2 μm , à qual se adicionou nitrato (KNO_3 , concentração final 0,3 mM) e carbono (glucose, concentração final 2 mM).

Os *slurries* foram preparados adicionando 10 ml de água de incubação a garrafas de 50 ml de soro contendo cerca de 5 g de sedimento húmido homogeneizado. As garrafas foram fechadas hermeticamente com rolhas de butilo e aros de alumínio. A

condição anóxica foi induzida purgando cada microcosmo com hélio durante 15 minutos.

O acetileno (C_2H_2) foi produzido no laboratório através da dissolução de carboneto de cálcio (CaC_2) em água e recolhido em seringas.

As incubações foram realizadas em triplicado, com adição de 5 ml de acetileno e sem adição de inibidor. Todas as amostras foram incubadas durante 4 horas no escuro a temperatura idêntica à *in situ* e agitação (100 rpm) constante. Após a incubação, cada frasco foi fortemente agitado e foram adicionados 10 ml de solução de cloreto de sódio 3 M à água de incubação a fim de facilitar a libertação do N_2O da fase líquida e contrariar o efeito da pressão negativa. Simultaneamente, cerca de 10 ml de amostra gasosa foram recolhidos para uma seringa. Esta amostra foi imediatamente injectada no cromatógrafo.

A quantificação do óxido nitroso foi determinada por cromatografia gasosa (GC Varian 3800) equipada com um detector de captura de electrões ^{63}Ni e um sistema de válvula de *bypass* que é accionado depois da eluição do N_2O para prevenir a contaminação do detector. As temperaturas da coluna e detector foram 80 °C e 250 °C, respectivamente. O gás de arraste utilizado foi o P5 árgon / metano com um fluxo constante de 35 ml min⁻¹.

2.6 TRATAMENTO DOS DADOS

Os dados respeitantes à composição granulométrica do sedimento foram processados graficamente, quer em termos de valores percentuais de cada classe granulométrica, quer em termos de curvas cumulativas de distribuição de frequências. As frequências cumulativas foram utilizadas na análise estatística para o cálculo de uma medida de tendência central, neste caso a mediana - $Md(\emptyset) = \emptyset_{50}$ - que divide a distribuição em duas metades com pesos iguais, uma constituída por partículas mais grosseiras (com

diâmetros maiores), e outra por partículas mais finas (com diâmetros menores) e a que corresponde o valor do diâmetro mediano da amostra.

Para cada data e estação de amostragem, foi testada a normalidade dos dados (teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov) e verificada a homogeneidade das variâncias (teste de Barlett) (Zar, 1999). A comparação da actividade desnitrificante entre estações de amostragem e ao longo do ano, foi realizada através da análise de variâncias (*1-way ANOVA*). O teste de comparação *post-hoc* das médias usado foi o de Tukey (*honestly significant different test*) (Zar, 1999). O coeficiente de correlação de Pearson foi usado com o objectivo de quantificar, separadamente, as relações simples entre um par de variáveis. Também foram realizadas análises de regressão múltipla passo a passo (*stepwise multiple regression analysis*) (Draper & Smith, 1981), para avaliar quais as variáveis independentes (caudal, temperatura, oxigénio dissolvido, salinidade, pH, nutrientes dissolvidos, NTB, MO, ø50) que melhor explicavam a variação observada nas variáveis dependentes (desnitrificação, razão N₂O:N₂). Todas as análises estatísticas foram realizadas ao nível de 95 % de confiança ($p < 0,05$). O programa *Statistica* (versão 6.0) foi a ferramenta usada para a realização dos testes estatísticos anteriormente citados.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1 CARACTERIZAÇÃO AMBIENTAL DOS LOCAIS DE AMOSTRAGEM

3.1.1 CAUDAL

O caudal do Rio Douro é controlado quase totalmente pelo regime de funcionamento da barragem hidroelétrica de Crestuma-Lever. O caudal médio durante o período de amostragem, correspondente ao ano hidrológico 2004/2005, foi de $211 \pm 8 \text{ m}^3\text{s}^{-1}$, variando entre mínimos diários de $0 \text{ m}^3\text{s}^{-1}$ (no Verão) e um máximo de $890 \text{ m}^3\text{s}^{-1}$ em Outubro (Tabela 3.1). Tendo em conta que o caudal médio anual para as duas últimas décadas foi de $505 \text{ m}^3\text{s}^{-1}$, comprova-se ter sido o ano em estudo extremamente seco. Como esperado, o caudal foi fortemente condicionado pela precipitação na bacia hidrográfica ($r^2 = 0,583$, $p < 0,005$).

Os valores da média de caudais observados nos 3 dias anteriores à amostragem apresentaram grande variabilidade, sendo mais elevados em Novembro e Abril (387 e $338 \text{ m}^3\text{s}^{-1}$, respectivamente) e inferiores nos últimos meses do ano hidrológico (mínimo de $41 \text{ m}^3\text{s}^{-1}$ em Setembro) (Tabela 3.2). Estes valores foram representativos dos valores médios mensais ($r^2 = 0,796$, $p < 0,001$) e foram os valores usados em análises posteriores.

Tabela 3.1 Média (MD), mínimo (m), máximo (M) e erro padrão (EP) do caudal diário do Rio Douro e precipitação total (T), precipitação mensal mínima (m) e máxima (M) na bacia hidrográfica em território português.

Caudal (m^3s^{-1}) ^a				Precipitação (mm) ^b		
MD	m	M	EP	T	m	M
211	0	890	8	934	9	250

a) dados em EDP

b) dados obtidos em <http://snirh.inag.pt/>

Tabela 3.2 Caudal 3 dias (Q_3) e caudal médio mensal (Q_M) (média \pm erro padrão) registados no Rio Douro durante os meses de amostragem.

	Q_3 (m^3s^{-1})	Q_M (m^3s^{-1})
18 Out-04	240 \pm 23	385 \pm 42
16 Nov-04	387 \pm 24	453 \pm 19
16 Dez-04	270 \pm 4	310 \pm 22
13 Jan-05	213 \pm 16	187 \pm 14
10 Fev-05	291 \pm 10	224 \pm 16
1 Mar-05	246 \pm 26	208 \pm 16
8 Abr-05	338 \pm 23	305 \pm 15
10 Mai-05	177 \pm 20	176 \pm 16
8 Jun-05	108 \pm 10	109 \pm 13
7 Jul-05	75 \pm 7	61 \pm 7
9 Ago-05	106 \pm 13	47 \pm 8
21 Set-05	41 \pm 1	72 \pm 9

3.1.2 SEDIMENTO

Os sedimentos amostrados apresentaram características diversas para os 4 locais de estudo. Os locais III e IV foram os mais estáveis morfologicamente ao longo do ano, embora com características opostas: o primeiro consistiu em sedimento fino e escuro,

apenas com uma fina camada eventualmente aeróbia à superfície, e o segundo composto por areia apresentando quase sempre uma cor esverdeada.

Os dados relativos à caracterização granulométrica dos sedimentos encontram-se representados graficamente em termos de distribuição de frequências, usando o valor da mediana (Figura 3.1). O sedimento da estação III (Ribeira) caracterizou-se pela predominância de limo e argila (< 0,063 mm) acompanhado de areia muito fina (0,063 – 0,125 mm). Em contraste, nos locais I e IV dominaram a areia grossa (1,00 – 2,00 mm) e o areão (> 2,00 mm). O local II (Massarelos) foi o que se apresentou mais inconstante em termos temporais, variando entre uma percentagem elevada de finos em Janeiro ($\phi_{50} = 3,04$) e partículas grosseiras ($\phi_{50} < -2$) em Abril e Maio.

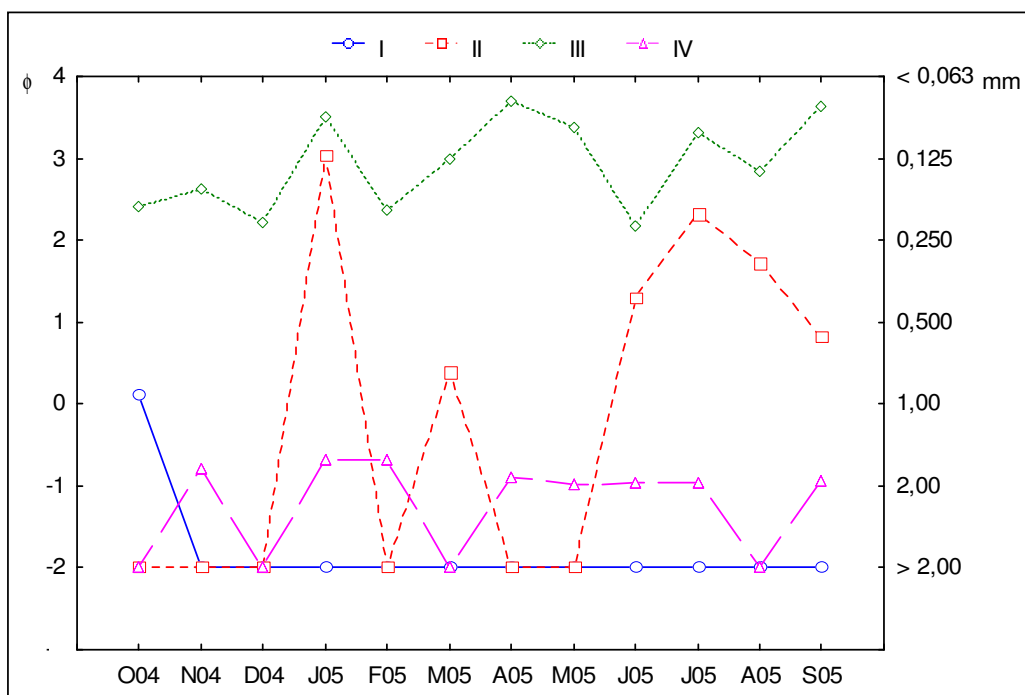


Figura 3.1 Variação anual dos valores de ϕ_{50} (diâmetro mediano) para os 4 locais de amostragem (areão > 2 mm, areia muito grossa 1-2 mm, areia grossa 0,5-1 mm, areia média 0,25-0,5 mm, areia fina 0,125-0,25 mm, areia muito fina 0,063-0,125 mm, limo e argila < 0,063 mm).

A Figura 3.2 mostra a percentagem de matéria orgânica (MO) presente nos sedimentos estuarinos nos vários locais. Na estação I, o conteúdo em MO, com uma média anual de $1,2 \pm 0,2$ %, não apresentou nenhuma tendência sazonal clara. Na estação II, notou-se um valor máximo de $9,5 \pm 0,11$ % em Janeiro desenquadrado dos obtidos no resto do ano. À parte deste valor, pareceu haver um ligeiro aumento da matéria orgânica nos meses de Verão. A média anual neste local atingiu $3,1 \pm 0,8$ %. O local III, com uma média anual de $10,8 \pm 0,8$ %, foi o que apresentou conteúdos mais elevados de MO, em conformidade com a sua composição granulométrica de sedimentos mais finos. Existiu uma clara variação sazonal com um decréscimo da percentagem de matéria orgânica no Verão. No local IV não houve praticamente variação ao longo do ano rondando os valores a média de $0,4 \pm 0,02$ %, estando de acordo com o facto de, como referido anteriormente, estes sedimentos serem constituídos maioritariamente por areia grossa e areão.

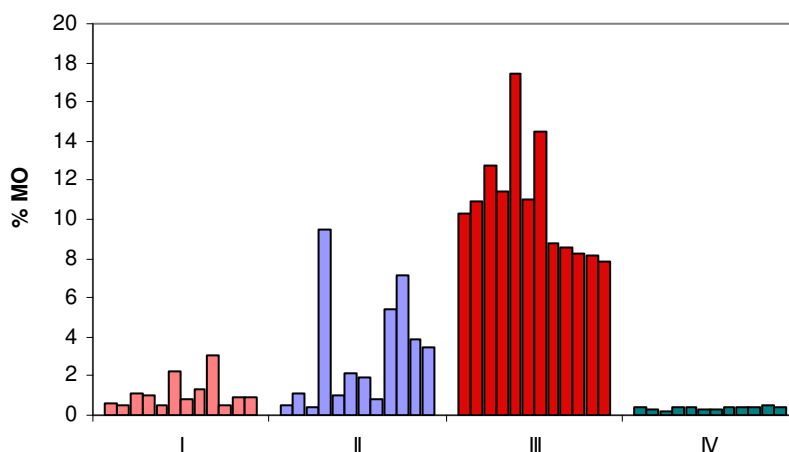


Figura 3.2 Variação anual da percentagem de matéria orgânica nos sedimentos. (Para cada série, a primeira coluna corresponde ao mês de Outubro de 2004 e a última a Setembro de 2005.)

Foi encontrada uma relação linear entre o conteúdo em matéria orgânica e os valores de ϕ_{50} dos sedimentos (Figura 3.3), mostrando que a percentagem de matéria orgânica no sedimento é tanto maior quanto mais finas as partículas de sedimento.

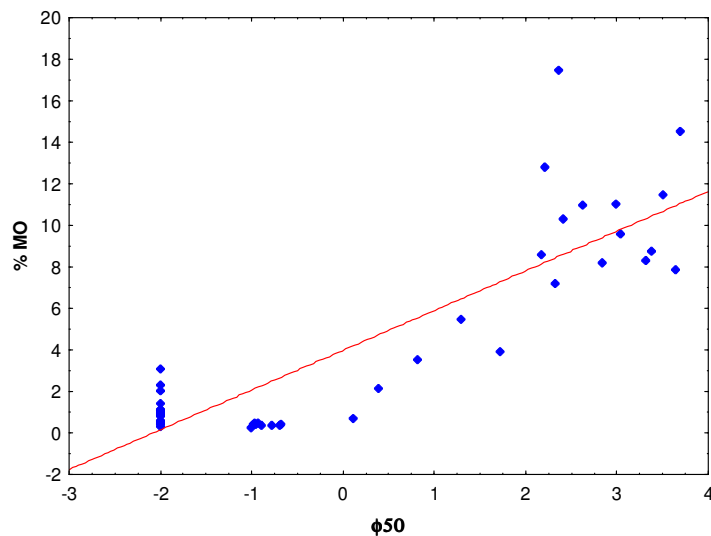


Figura 3.3 Diagrama de dispersão da percentagem de matéria orgânica (% MO) e o diâmetro mediano ($\phi 50$) do sedimento ($r^2 = 0,773$, $p < 0,0001$, $n = 48$).

Os sedimentos analisados apresentaram na sua maioria potenciais negativos de oxidação-redução, indicando a dominância da anoxia. Apenas na estação IV, entre Novembro e Maio, se detectaram valores positivos, havendo uma tendência generalizada para a redução do potencial nos meses de Verão. Os valores de densidade medidos no sedimento destinaram-se apenas ao cálculo do número total de bactérias por volume de sedimento. É de referir, no entanto, que como seria de esperar, valores de densidade mais baixos, foram encontrados nos sedimentos da estação III.

3.1.3 NÚMERO TOTAL DE BACTÉRIAS

A contagem de células microbianas foi efectuada com recurso à microscopia de fluorescência. Na Figura 3.4 podem-se visualizar imagens obtidas com esta técnica aplicada aos sedimentos das quatro estações de amostragem.

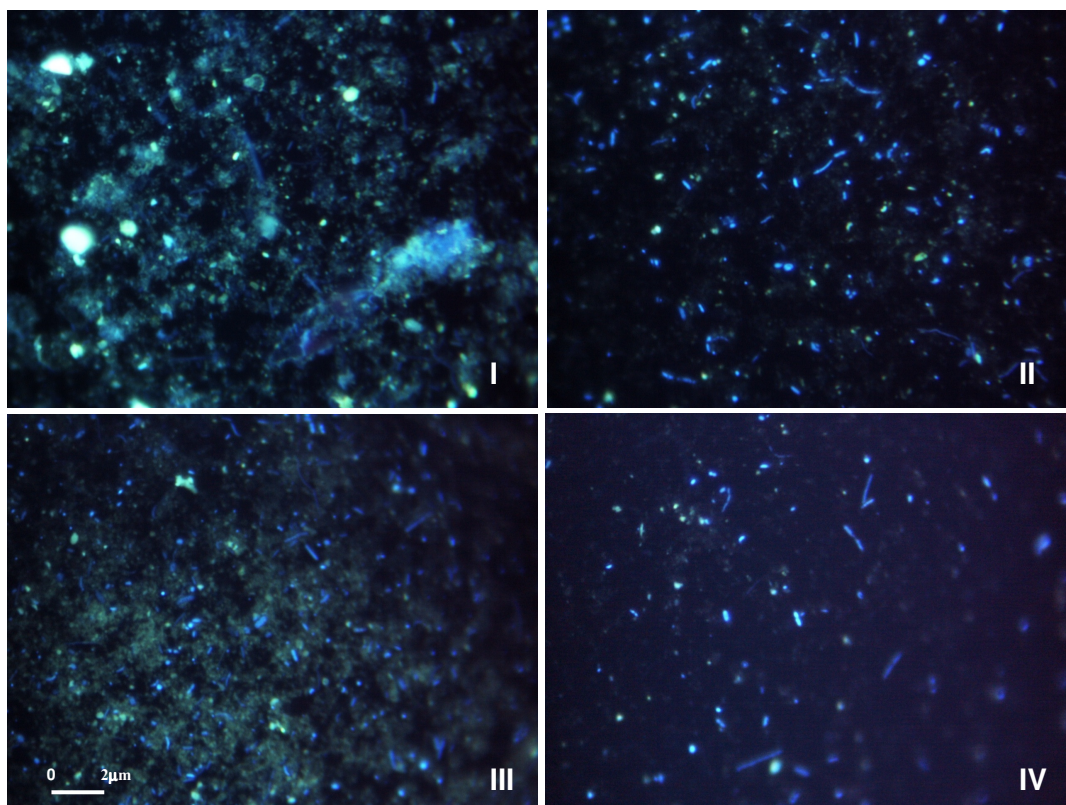


Figura 3.4 Exemplos de imagens de epifluorescência de preparações de sedimento dos 4 locais de amostragem (I a IV).

O número total de bactérias no sedimento (NTBs) e na água (NTBa) apresentou uma clara tendência sazonal (Figura 3.5), havendo um aumento do seu valor nos meses da Primavera e do Verão.

Nas contagens de bactérias nos sedimentos foram encontradas diferenças significativas entre locais (ANOVA, $p < 0,001$) e ao longo do ano (ANOVA, $p < 0,001$). Em termos espaciais, o local III foi o que apresentou valores mais elevados com uma média anual de $9,10 \log \text{ bact ml}^{-1}$ (Tabela 3.3) e onde o sedimento era mais fino. O local IV, com o sedimento constituído essencialmente por areia, apresentou uma média inferior, $8,16 \log \text{ bact ml}^{-1}$. Na estação II, o número total de bactérias no sedimento esteve inversamente relacionado com o diâmetro mediano das partículas ($r^2 = 0,388$, $p < 0,05$, $n = 12$).

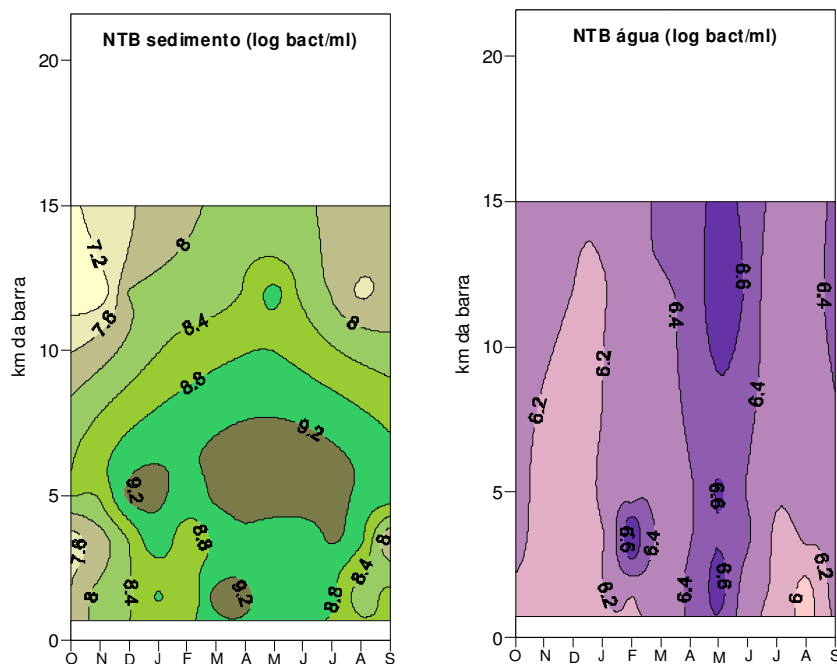


Figura 3.5 Variação temporal e espacial do número total de bactérias no sedimento e na água de fundo do estuário do Rio Douro entre Outubro de 2004 e Setembro de 2005.

Tabela 3.3 Média anual (MD), mínimo (m), máximo (M) e erro padrão (EP) das contagens de bactérias nas amostras de sedimento e água, nos locais de amostragem.

local	log bact ml ⁻¹ sed				log bact ml ⁻¹ água			
	MD	m	M	EP	MD	m	M	EP
I	8,68	7,60	9,44	0,16	6,22	5,88	6,68	0,06
II	8,48	7,41	9,29	0,19	6,32	6,08	6,90	0,07
III	9,10	8,41	9,56	0,12	6,29	6,05	6,63	0,04
IV	8,16	6,87	9,46	0,22	6,37	6,17	6,77	0,05

Nas amostras de água de fundo foram, igualmente, encontradas diferenças significativas entre locais (ANOVA, $p < 0,05$) e ao longo do ano (ANOVA, $p < 0,001$). No entanto, e ao contrário do sedimento, os valores mais elevados foram

encontrados no local IV, com uma média de 6,37 log bact ml⁻¹ (Tabela 3.3), localizado no estuário superior. A média anual mais baixa foi encontrada na estação I, com 6,22 log bact ml⁻¹.

Apenas para o local I foi encontrada relação entre o NTB na água do fundo e na superfície do sedimento ($r^2 = 0,369$, $p < 0,05$). Todavia, deve ser notado que a densidade microbiana nos sedimentos foi duas ordens de grandeza superior à da água de fundo.

Na Figura 3.6, pode-se verificar a relação entre o número total de bactérias e o potencial de oxidação-redução do sedimento, diminuindo aquele à medida que o valor do potencial aumentou. Portanto, quanto mais anaeróbico foi o sedimento, maior foi o número de células procariotas ($p < 0,001$).

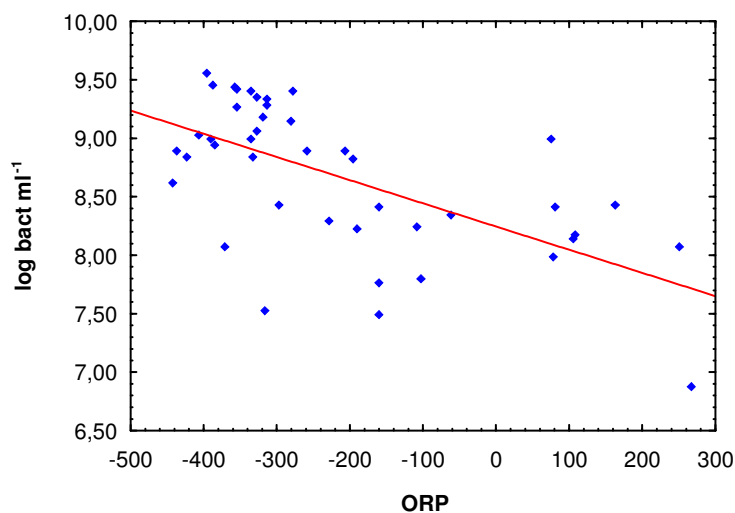


Figura 3.6 Diagrama de dispersão do número total de bactérias (log bact ml⁻¹) no sedimento e o potencial de oxidação redução (ORP) ($r^2 = 0,381$, $p < 0,001$, $n = 48$).

3.1.4 ÁGUA DE FUNDO

As amostras de água foram recolhidas junto ao sedimento nos diferentes locais de amostragem.

A variação mensal de temperatura nos 4 locais está apresentada na Figura 3.7. A similaridade entre os diferentes padrões temporais foi clara, com uma sazonalidade forte. As temperaturas mais altas foram registadas, como esperado, no Verão. No que toca às médias anuais, estas foram muito próximas em todos os locais de amostragem: $13,8 \pm 0,7$ °C no local I, $14,0 \pm 1,0$ °C no local II, $13,8 \pm 0,9$ °C e $14,6 \pm 1,4$ °C no local IV.

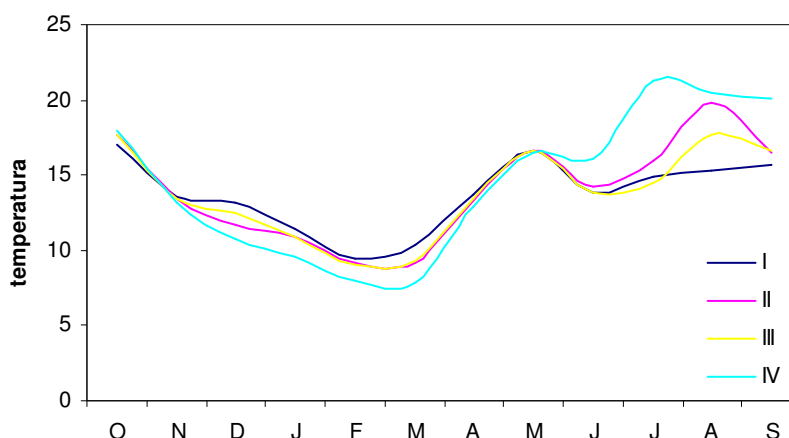


Figura 3.7 Variação mensal da temperatura (°C) na água de fundo nas 4 estações entre Outubro de 2004 e Setembro de 2005.

A variação mensal do oxigénio dissolvido para os 4 locais está apresentada na Figura 3.8. Os valores mais elevados foram, curiosamente, registados no Verão. Relativamente às médias anuais, estas atingiram 107 ± 19 °C no local I, 106 ± 19 °C no local II, 101 ± 16 °C e 104 ± 18 °C no local IV.

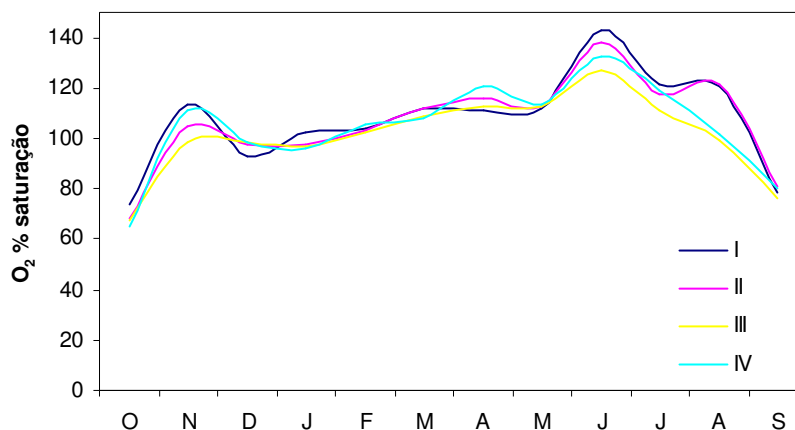


Figura 3.8 Variação mensal do oxigénio dissolvido (% saturação) na água de fundo nas 4 estações entre Outubro de 2004 e Setembro de 2005.

A salinidade não mostrou um padrão sazonal claro, aumentando no Verão e no Inverno e diminuindo na Primavera (Figura 3.9) tendo sido, no entanto, inversamente proporcional ao caudal ($r^2 = 0,474$, $p < 0,0001$, $n = 48$). A salinidade média para o local I foi $25,7 \pm 2,3$ psu, variando desde 13,2 psu em Abril a 33,9psu em Agosto. No local II, a média de salinidade foi $18,5 \pm 2,6$ psu, com um mínimo de 6,0 psu em Abril e um máximo de 32,2 psu em Julho. O local III, embora situado a montante relativamente ao anterior, teve uma média anual superior ($22,7 \pm 2,3$ psu), o que se deve ao facto de amostras serem colhidas a uma maior profundidade e por isso sofrerem uma maior influência da cunha salina. No local IV, a média anual foi de $10,6 \pm 2,5$ psu.

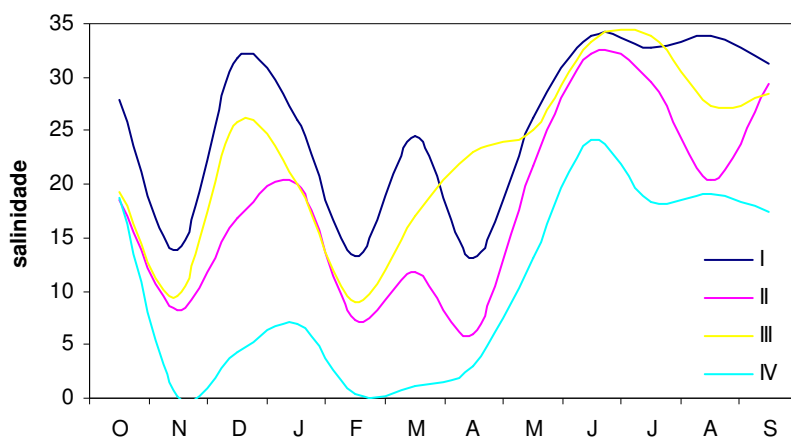


Figura 3.9 Variação mensal da salinidade na água de fundo nas 4 estações entre Outubro de 2004 e Setembro de 2005.

A Figura 3.10 mostra a variação de pH na água do fundo durante o período de amostragem. Os valores mais elevados de pH ocorreram durante o Inverno e a Primavera. Durante o Verão, especialmente em Julho e Setembro, houve uma queda brusca dos valores mensais. O pH médio para os 4 locais foi de $7,8 \pm 0,1$, para os locais I, II e III, e de $7,7 \pm 0,1$, para o local IV. Os valores mínimos de pH foram registados no mês de Setembro.

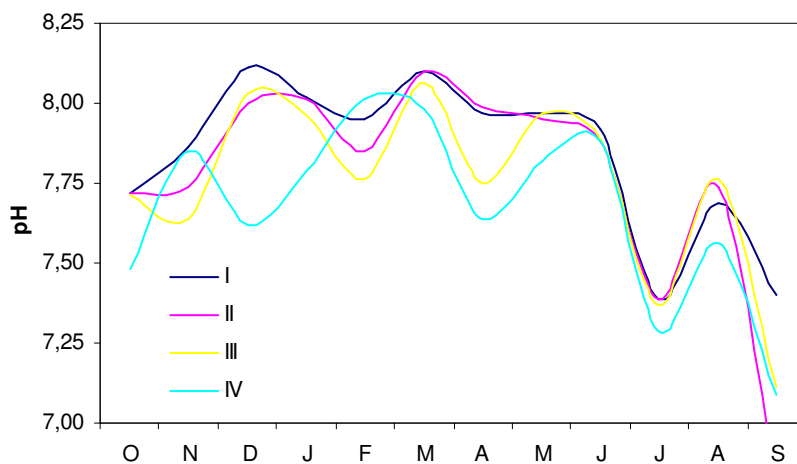


Figura 3.10 Variação mensal do pH na água de fundo nas 4 estações entre Outubro de 2004 e Setembro de 2005.

A Figura 3.11 mostra a concentração de nutrientes dissolvidos presente nas amostras de água. A variação sazonal foi evidente, com os nutrientes, em geral, a diminuírem no Verão, de acordo com o aumento da salinidade, e a aumentarem no período de Inverno, demonstrando a sua origem continental.

As concentrações de nitratos e nitritos demonstraram variabilidade significativa ao longo do ano (ANOVA, $p < 0,001$ e $p < 0,01$, respectivamente). Quando analisada a variabilidade entre locais, as diferenças são também significativas (ANOVA, $p < 0,001$ e $p < 0,05$, respectivamente). Os valores de nitratos foram mais elevados a montante no estuário (estação IV), relacionando-se negativamente com a salinidade ($r^2 = 0,649$, $p < 0,0001$, $n = 48$) e positivamente com o caudal ($r^2 = 0,352$, $p < 0,0001$, $n = 48$). A média anual na estação IV atingiu os $73,78 \pm 9,86 \mu\text{M}$, com um valor máximo de $149,91 \mu\text{M}$ em Abril (Tabela 3.4) seguido de Novembro com $101,68 \mu\text{M}$, correspondendo aos meses de maior caudal (ver 3.1.1). Por outro lado, os valores menores foram registados no local I, com $29,37 \pm 5,86 \mu\text{M}$, variando entre $9,91 \mu\text{M}$ em Junho e $77,39 \mu\text{M}$ em Abril.

As concentrações de amónia e fosfatos não apresentaram diferenças significativas entre locais e ao longo do ano (ANOVA, $p > 0,05$). Para estes nutrientes, notou-se, no entanto, uma redução dos valores no Verão. As médias mensais variaram entre $5,74 \mu\text{M}$ (local IV) e $8,02 \mu\text{M}$ (local II) para a amónia, e entre $0,91 \mu\text{M}$ (local I) e $1,27 \mu\text{M}$ (local IV) para os fosfatos.

Na amostragem de Fevereiro, no local II (Massarelos) foi detectada uma descarga pontual de esgoto, reflectindo-se este acontecimento nas concentrações de amónia ($167,60 \mu\text{M}$) e fosfatos ($8,87 \mu\text{M}$), e nos valores de coliformes fecais e carência bioquímica de oxigénio (ver adiante). Assim, os resultados obtidos neste mês para as amostras de água foram considerados *outliers* e omitidos de cálculos posteriores.

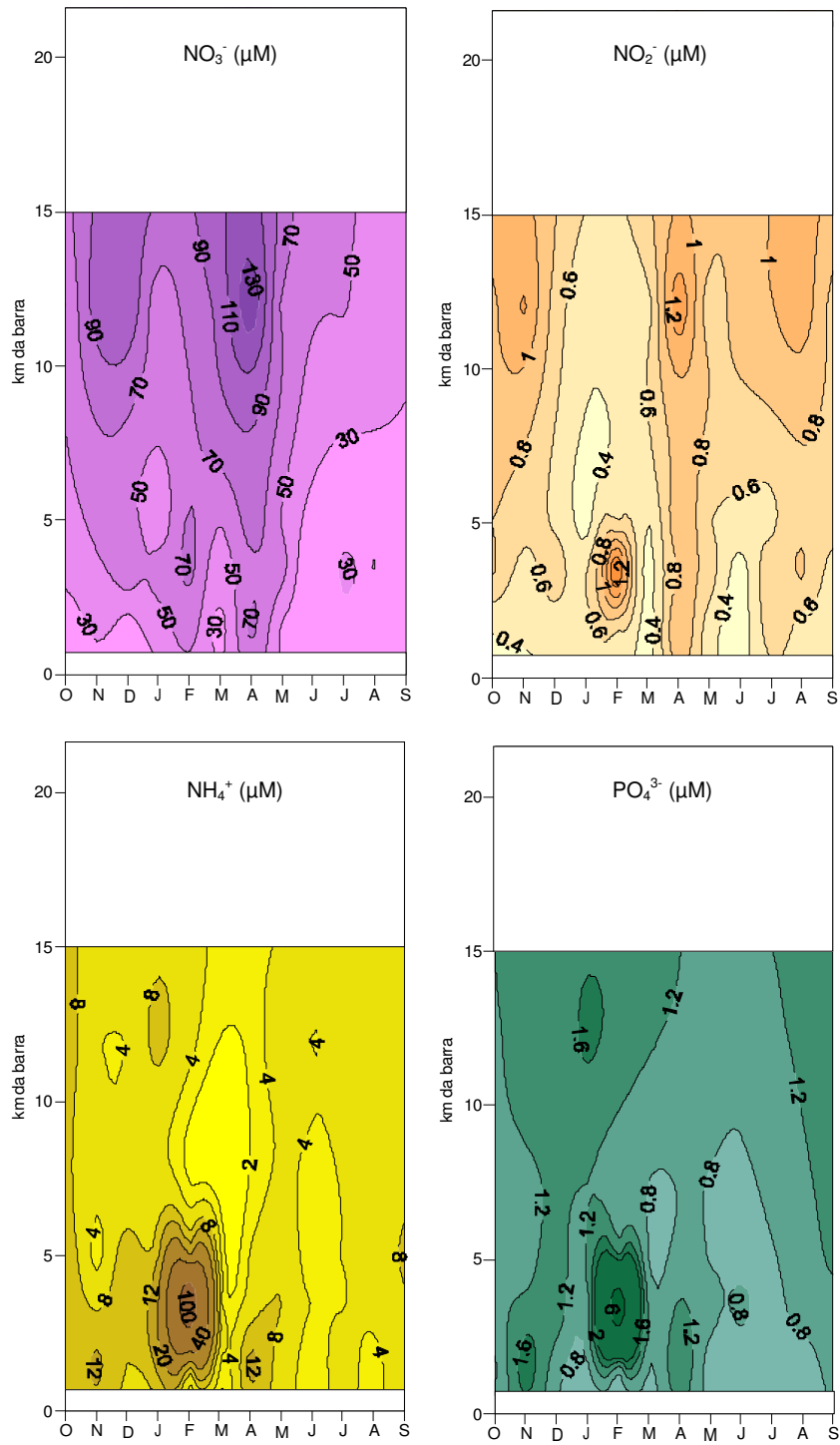


Figura 3.11 Variação mensal dos nutrientes dissolvidos nas amostras de água de fundo: nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-), amónia (NH_4^+) e fosfato (PO_4^{3-}).

Tabela 3.4 Média (MD), mínimo (m), máximo (M) e erro padrão (EP) das concentrações de nutrientes dissolvidos e razão N:P, nos locais de amostragem. Nota: no local II os valores médios foram calculados sem os resultados do mês de Fevereiro.

Local		NO_3^- (μM)	NO_2^- (μM)	NH_4^+ (μM)	PO_4^{3-} (μM)	N:P
I	MD	29,37	0,51	7,79	0,91	42,6
	m	9,91	0,27	2,11	0,57	21,4
	M	77,39	1,06	14,55	1,91	87,0
	EP	5,86	0,06	1,23	0,12	6,2
II	MD	43,21	0,64	8,02	1,06	49,2
	m	11,50	0,29	3,72	0,72	17,4
	M	77,28	1,79	167,60	8,87	90,6
	EP	5,71	0,05	1,23	0,07	5,9
III	MD	42,96	0,61	6,90	1,00	51,5
	m	18,04	0,28	2,15	0,67	25,5
	M	79,54	0,98	14,07	1,43	91,1
	EP	5,85	0,06	1,11	0,08	6,2
IV	MD	73,78	0,85	5,34	1,27	64,7
	m	36,03	0,43	1,95	0,84	28,0
	M	149,91	1,41	10,61	1,70	133,9
	EP	9,86	0,09	0,76	0,07	8,1

A razão de Redfield (N:P), que relaciona o azoto e fósforo inorgânicos (Redfield, 1958), variou entre 42,6 (local I) e 64,7 (local IV), diminuindo de montante para jusante, demonstrando um excesso de azoto no sistema. Assim, o fosfato foi claramente o nutriente limitante no estuário do Rio Douro.

Na Figura 3.12 encontram-se representados os valores de coliformes fecais (CF), obtidos para os 12 meses de amostragens, e o valor máximo admissível (VMA) para águas balneares, aqui utilizado como critério para avaliação da contaminação fecal. Como se pode verificar, nas três estações de jusante, a quase totalidade dos valores encontram-se acima do VMA ($2000 \text{ ufc } 100 \text{ ml}^{-1}$) e todos eles foram superiores ao valor máximo recomendável ($100 \text{ ufc } 100 \text{ ml}^{-1}$). Estatisticamente, a estação IV apresentou valores significativamente menores que os restantes locais (ANOVA, $p < 0,001$). Fruto da descarga de esgoto referida anteriormente, em Fevereiro, foram encontradas na estação II $65\,400 \text{ ufc } 100 \text{ ml}^{-1}$.

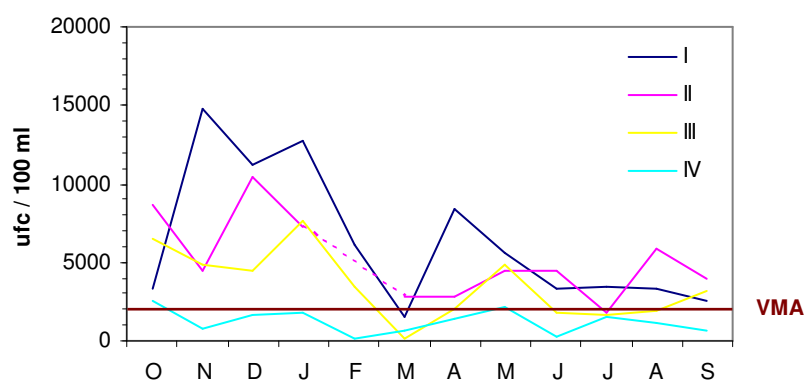


Figura 3.12 Variação mensal dos valores de coliformes fecais nas amostras de águas de fundo entre Outubro de 2004 e Setembro de 2005. Nota: para o local II, foi omitido o valor do mês de Fevereiro. (VMA – valor máximo admissível para águas balneares).

Em termos de carência bioquímica de oxigénio (CBO_5), os valores não variaram significativamente entre locais (ANOVA, $p > 0,05$). As médias anuais foram de $0,81 \pm 0,12 \text{ mg l}^{-1}$ no local I, $0,86 \pm 0,18 \text{ mg l}^{-1}$ ($n = 11$) no local II, $0,68 \pm 0,05 \text{ mg l}^{-1}$ no local III e $1,07 \pm 0,11 \text{ mg l}^{-1}$ no local IV (Figura 3.13). De assinalar o sinal do esgoto no local II, com valores de CBO_5 de $9,03 \text{ mg l}^{-1}$ em Fevereiro.

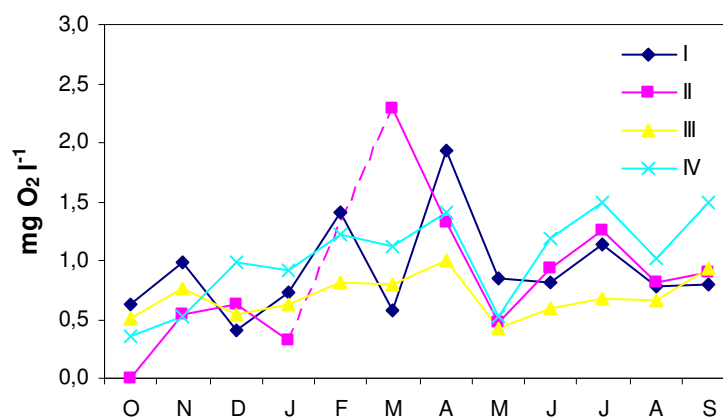


Figura 3.13 Variação mensal da CBO₅ nas amostras de água de fundo entre Outubro de 2004 e Setembro de 2005. Nota: para o local II, foi omitido o valor do mês de Fevereiro.

3.2 TAXAS DE DESNITRIFICAÇÃO

No presente trabalho, foram determinadas duas medidas ligadas ao processo de desnitrificação: as taxas potenciais de desnitrificação ($\text{nmol N g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) e a razão $\text{N}_2\text{O}:\text{N}_2$ (em %). As taxas potenciais de desnitrificação foram avaliadas pela produção de N_2O na presença de um inibidor do último passo da desnitrificação. A razão $\text{N}_2\text{O}:\text{N}_2$ avaliou a eficiência da desnitrificação e a magnitude da acumulação de N_2O .

3.2.1 VARIAÇÃO SAZONAL E ESPACIAL

Na Figura 3.14 encontram-se os resultados obtidos para os potenciais de desnitrificação e razões $\text{N}_2\text{O}:\text{N}_2$, ao longo do ano e nos 4 locais de amostragem.

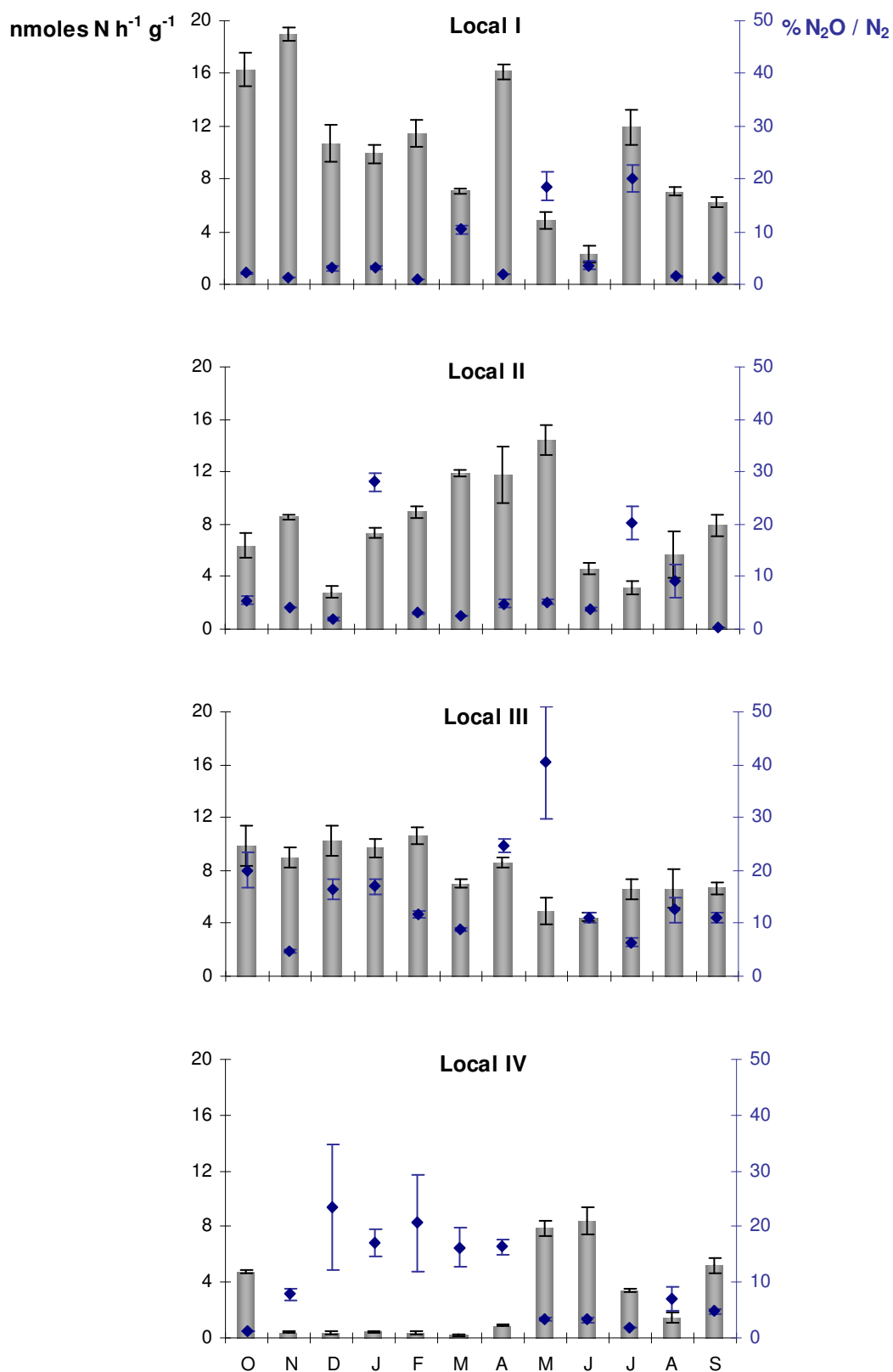


Figura 3.14 Variação mensal dos potenciais de desnitrificação (colunas) e da razão $\text{N}_2\text{O}:\text{N}_2$ (♦). As barras indicam o erro padrão das médias (n=3).

A análise ANOVA confirmou diferenças significativas entre locais para as taxas potenciais de desnitrificação ($p < 0,0001$) e para as razões $N_2O:N_2$ ($p < 0,001$).

Para todas as estações de amostragem existiram também diferenças significativas ao longo do ano ($p < 0,001$) para as taxas de desnitrificação. No local I, os valores de Novembro e Dezembro foram significativamente mais elevados que os restantes com taxas de $16,35 \pm 1,29$ e $18,96 \pm 0,54$ nmoles $N\ g^{-1}\ h^{-1}$, respectivamente. O valor mais baixo foi medido em Junho ($2,26 \pm 0,64$ nmoles $N\ g^{-1}\ h^{-1}$). No local II, os valores variaram entre $2,83 \pm 0,48$ nmoles $N\ g^{-1}\ h^{-1}$ em Dezembro e $14,44 \pm 1,19$ nmoles $N\ g^{-1}\ h^{-1}$ em Maio. O local III apresentou uma menor amplitude de valores ao longo do ano (entre $4,46 \pm 0,33$ e $10,61 \pm 0,62$ nmoles $N\ g^{-1}\ h^{-1}$). Nos meses de Inverno foram obtidos os valores mais altos e nos meses de Maio e de Junho, os mais baixos. No local IV, distinguiram-se 3 grupos sazonais, de Novembro a Abril, quando se encontram os valores mais baixos, em Maio e Junho com os valores mais altos e nos restantes meses foram obtidos valores intermédios.

A razão $N_2O:N_2$ variou significativamente ao longo do ano para os 4 locais de amostragem ($p < 0,01$). No local I, durante a maior parte do ano os valores mantiveram-se abaixo dos 5 %, ocorrendo valores significativamente mais elevados nos meses de Março, Maio e Julho ($10,4 \pm 0,7$, $18,6 \pm 2,6$ e $20,2 \pm 2,5$ %, respectivamente). No local II, os valores foram também semelhantes ao longo da maioria dos meses, com excepção de Janeiro e Julho com valores mais altos ($28,0 \pm 1,8$ e $20,3 \pm 3,2$ %, respectivamente). No local III, em termos mensais, destacou-se o mês de Maio no qual a razão $N_2O:N_2$ atingiu os 40 %. No local IV, os valores mais baixos foram medidos em Outubro e Julho ($1,2 \pm 0,04$ e $1,9 \pm 0,09$ %), e os mais altos em Dezembro e Fevereiro ($23,5 \pm 11,3$ e $20,7 \pm 8,7$ %). Os valores mais elevados para este local coincidiram com os valores mais baixos dos potenciais de desnitrificação, resultando do cálculo da razão entre quantidades muito pequenas de N_2O .

A análise comparativa das médias *a posteriori* da desnitrificação resultou numa ordenação das estações de amostragem coincidente com a divisão do estuário (Figura

3.15). Esta análise agrupou os locais de amostragem com base na semelhança entre taxas de desnitrificação. Assim, os valores mais elevados foram encontrados no estuário inferior (local I) (grupo a), correspondendo à menor concentração de nitrato na água estuarina, os valores intermédios no estuário médio (locais II e III) (grupo b), e os valores inferiores no estuário superior (local IV) (grupo c), onde se registou a maior carga de nitrato.

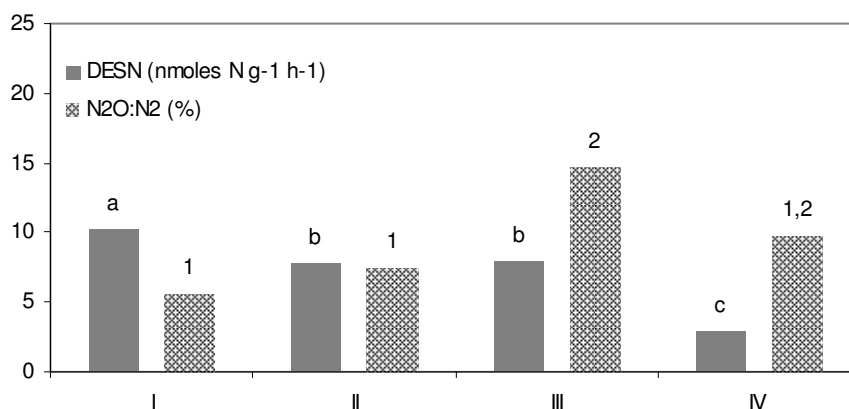


Figura 3.15 Divisão em grupos homogéneos (*Tukey multi-comparion test*, $p \leq 0,05$) dos locais de amostragem para as taxas de desnitrificação e percentagens de N₂O:N₂.

Para os valores da razão N₂O:N₂, a análise comparativa das médias *a posteriori* originou dois grupos distintos: (1) locais I e II, com valores inferiores e (2) local III, com valores superiores. A média de valores do local IV não foi considerada significativamente diferente de nenhum destes grupos.

3.2.2 ANÁLISE DE CORRELAÇÃO

Relativamente à relação entre as taxas potenciais de desnitrificação e a razão N₂O:N₂, apenas na estação IV, a mais de montante e com taxas menores, foi encontrada relação significativa ($r^2 = 0,53$, $p < 0,01$, $n = 12$).

Na Tabela 3.5, encontram-se resumidas todas as correlações significativas encontradas entre os processos biológicos analisados e as variáveis ambientais (as restantes variáveis medidas foram omitidas). Para os 4 locais foram encontradas relações diversas entre a desnitrificação e as mesmas variáveis, por exemplo, a salinidade esteve correlacionada negativamente com a desnitrificação na estação I e III, e positivamente na estação IV. Relativamente ao caudal e concentração de nutrientes aconteceu o inverso. De salientar a ausência de relação directa significativa entre os valores de potenciais de desnitrificação medidos e a concentração de nitrato, resultante certamente das condições experimentais em que este nutriente foi adicionado em excesso. Em termos de características do sedimento, apenas a matéria orgânica apresentou relação com a desnitrificação, embora em sentidos opostos, relação negativa no local I e positiva no local III.

Tabela 3.5 Coeficientes de correlação de Pearson entre processos e variáveis ambientais. Os traços indicam a ausência de correlação significativa ($p < 0,05$).

(T – temperatura, Sal – salinidade, NO_3^- - concentração de nitrato, NO_2^- - concentração de nitrito, PO_4^{3-} - concentração de fosfato, Q_3 – caudal, NTBa – número total de bactérias na água, MO – matéria orgânica, $\phi 50$ – diâmetro mediano das partículas).

		T	Sal	NO_3^-	NH_4^+	PO_4^{3-}	Q_3	NTBa	MO	$\phi 50$
I	DESN	-	-0,62	-	0,77	0,74	0,70	-	-0,70	-
	$\text{N}_2\text{O}:\text{N}_2$	-	-	-	-	-	-	-	-	-
II	DESN	-	-	-	-	-	-	0,61	-	-
	$\text{N}_2\text{O}:\text{N}_2$	-	-	-	-	-	-	-	0,83	0,65
III	DESN	-	-0,65	-	0,68	0,72	0,66	-0,61	0,74	-
	$\text{N}_2\text{O}:\text{N}_2$	-	-	-	-	-	-	0,75	-	-
IV	DESN	0,59	0,77	-	-	-0,69	-0,59	0,73	-	-
	$\text{N}_2\text{O}:\text{N}_2$	-0,83	-0,77	0,66	-	-	-	-	-0,71	-

Quanto à razão $N_2O:N_2$ não foi encontrada qualquer relação significativa com as variáveis analisadas na estação I. Na estação II, encontraram-se relações directas positivas com o conteúdo em matéria orgânica (MO) e o diâmetro mediano do sedimento ($\phi 50$). A razão $N_2O:N_2$ esteve correlacionada positivamente com o número total de bactérias na água (NTBa), no local III e a concentração de nitrato, no local IV. Relações inversas foram encontradas com a temperatura e salinidade, também no local IV.

3.2.3 ANÁLISE DE REGRESSÃO MÚLTIPLA

A realização da análise de regressão múltipla (*stepwise backward*), usando a totalidade das variáveis ambientais, deu origem à seguinte equação:

$$\text{DESN} = -16,918 + 0,454 T + 0,591 \text{ Sal} - 0,38 \text{ NO}_2^- + 0,419 \text{ NH}_4^+ + 0,449 \text{ CBO}_5 + 0,847 \text{ Q}_3,$$
$$R^2 = 0,62, p < 0,0001$$

que explica 62 % da variância total das taxas de desnitrificação (DESN). De acordo com os dados obtidos seis parâmetros foram incluídos na equação, sendo de destacar o efeito positivo da temperatura (T), salinidade (Sal), amónia (NH_4^+), matéria orgânica facilmente assimilável (CBO_5) e caudal (Q_3) e o efeito negativo do nitrito (NO_2^-).

O mesmo tipo de análise foi realizado para cada uma das estações de amostragem e verificou-se que, na estação I, as variáveis caudal e percentagem de matéria orgânica (MO) explicaram 79 % da variância observada na desnitrificação:

$$\text{DESN} = 9,006 + 0,567 \text{ Q}_3 - 0,56 \text{ MO}, R^2 = 0,79, p < 0,0001$$

Para a estação II, com a mesma análise, nenhuma variável conseguiu explicar a variabilidade encontrada.

Na estação III, as variáveis que melhor explicam a variação das taxas de desnitrificação foram a concentração de amônia, o número total de bactérias na água de fundo (NTBa) e uma vez mais o caudal:

$$\text{DESN} = 38,634 + 0,597 \text{NH}_4^+ - 0,40 \text{NTBa} + 0,439 \text{Q}_3, R^2 = 0,94, p < 0,0001$$

Na estação IV, a variabilidade nas taxas de desnitrificação foi explicada em 90 % pela salinidade e pelo o número total de bactérias na água:

$$\text{DESN} = -63,845 + 0,622 \text{Sal} - 0,569 \text{NTBa}, R^2 = 0,90, p < 0,0001$$

Em relação à variabilidade da razão $\text{N}_2\text{O}:\text{N}_2$, tendo em conta todas as variáveis, verificou-se que os parâmetros concentração de nitratos (NO_3^-) e diâmetro mediano do sedimento ($\phi 50$) explicaram 31 % da variância total, segundo a seguinte equação:

$$\text{N}_2\text{O}:\text{N}_2 = 4,498 + 0,348 \text{NO}_3^- + 0,486 \phi 50, R^2 = 0,31, p < 0,0001$$

Para estação I, não foi encontrado um modelo explicativo da variância observada. Na estação II verificou-se que a variação da matéria orgânica explicou 70 % da variância da razão $\text{N}_2\text{O}:\text{N}_2$, segundo a equação:

$$\text{N}_2\text{O}:\text{N}_2 = -0,160 - 0,834 \text{MO}, R^2 = 0,70, p < 0,0001$$

Na estação III, o número total de bactérias na água de fundo e o caudal foram os parâmetros que melhor explicaram a variância:

$$\text{N}_2\text{O}:\text{N}_2 = -417,85 - 0,907 \text{NTBa} + 0,411 \text{Q}_3, R^2 = 0,70, p < 0,0001$$

Na estação IV, a variabilidade na razão $\text{N}_2\text{O}:\text{N}_2$ foi explicada em 70 % pela temperatura:

$$\text{N}_2\text{O}:\text{N}_2 = 30,608 - 0,83 \text{T}, R^2 = 0,68, p < 0,0001$$

Outros parâmetros como o oxigênio dissolvido na água, o pH, número total de bactérias no sedimento, não apresentaram qualquer tipo de relação com a taxa de desnitrificação ou a produção de N_2O destas comunidades.

CAPÍTULO 4

DISCUSSÃO

Os estuários foram sempre importantes para a Humanidade, quer como meios de navegação, quer como local de implantação de cidades. Hoje em dia eles estão sob pressão, como espaços de desenvolvimento urbano e industrial e locais de drenagem para os seus efluentes. Muitos problemas encontrados nos estuários são resultado directo das populações e infra-estruturas que eles suportam.

Um dos aspectos preocupantes da acção negativa do Homem sobre os sistemas estuarinos reside no aumento progressivo da carga de azoto e redução da descarga de água doce, o que levou a problemas generalizados de eutrofização (Jickels, 1998; de Jonge *et al.*, 2002; Montagna *et al.*, 2002). A Directiva de Nitratos da União Europeia (Comunidade Europeia, 1991) requer que, para qualquer massa de água classificada como poluída, se estabeleçam controlos apropriados dos aportes de NO_3^- provenientes principalmente da actividade agrícola. Esta definição de poluição refere-se precisamente à eutrofização originada por uma elevada carga de nutrientes, principalmente N e P.

No estuário do Rio Douro, a concentração de nitratos no fluxo de água doce para o estuário aumentou dramaticamente durante os anos 90 e não são esperadas alterações num futuro próximo (Magalhães *et al.*, 2005a). Além disso, o desvio de água para a agricultura ao longo da bacia hidrográfica e as mudanças climáticas levaram a uma diminuição progressiva da descarga de água doce no estuário, alterando o regime de salinidade (Vieira & Bordalo, 2000).

4.1 CARACTERIZAÇÃO AMBIENTAL DOS LOCAIS DE AMOSTRAGEM

O período de amostragem durou 12 meses, abrangendo um ano hidrológico (2004/2005), tendo as amostras mensais sido recolhidas à superfície do sedimento e na coluna de água perto do fundo, de modo a avaliar a dinâmica dos potenciais de desnitrificação em sedimentos subtidais ao longo do gradiente do estuário do Rio Douro.

Os sedimentos das várias zonas apresentaram diferentes características granulométricas, evidenciando áreas com diferentes hidrodinamismos que condicionaram a deposição de partículas finas. Também em termos de percentagem de matéria orgânica se podem observar diferenças entre estações. A predominância de finos nos sedimentos esteve ligada a teores superiores em matéria orgânica. Os valores do potencial de oxidação-redução (ORP) foram quase sempre negativos, com exceção da estação IV, indicando a presença de sedimentos anaeróbios nas estações do estuário médio e inferior.

A variabilidade sazonal dos valores do número total de bactérias nas amostras de água e sedimento foram os esperados para o estuário do Douro (Bordalo, 1991), com aumento da abundância no Verão e decréscimo acentuado no Inverno. Todavia não foi encontrada qualquer relação estatística entre o número de bactérias e o caudal de descarga. Os valores no sedimento foram, em geral, 2 ordens de magnitude superiores comparativamente com os da água, o que atesta o papel dos sedimentos como sumidouro de microrganismos. Comparando as contagens de bactérias com os valores do ORP no sedimento verificou-se que, em geral, quanto mais negativo foi o potencial maior o número total de bactérias.

O período de amostragem decorreu durante um ano hidrológico particularmente seco. Neste período, o caudal médio anual atingiu apenas 40 % da média plurianual. O caudal reduzido levou a que, mesmo sendo as amostragens realizadas em maré vazante, se encontrassem valores de salinidade elevados ao longo do estuário. Face à

redução do caudal durante a vazante nunca foi encontrada água doce, perto do fundo, nas estações a jusante da IV. A estratificação vertical da coluna de água, especialmente com baixos fluxos de água doce, é característica do estuário do Rio Douro (Bordalo & Vieira, 2005). Por outro lado, a diminuição do caudal faz aumentar o tempo de residência dificultando a renovação de água no estuário (Bordalo & Vieira, 2000), facto que reforça a importância dos processos naturais de remoção de azoto (Seitzinger, 2000). Curiosamente, e na água de fundo, os valores de oxigénio dissolvido estiveram próximos da saturação durante a maior parte do ano.

Sendo o grosso do caudal afluente ao estuário do Douro com origem na albufeira de Crestuma-Lever, não é de estranhar que a estação mais a montante, a IV, tenha apresentado valores mais elevados de nitratos. Concomitantemente, foi encontrada uma relação inversa significativa entre a concentração de nitratos e a salinidade, o que confirma a origem continental dos nitratos. No entanto, o mesmo não aconteceu com os restantes nutrientes nomeadamente amónia e nitrito, mostrando a vulnerabilidade do estuário à descarga dessas formas de azoto resultantes da drenagem urbana. Os valores de nutrientes dissolvidos encontrados foram semelhantes aos descritos previamente para o estuário por Magalhães *et al.* (2002). A razão molar entre as 3 formas de azoto inorgânico (nitrato, nitrito e amónia) e o fosfato, também conhecido como o quociente de Redfield (Redfield, 1958), para o fitoplâncton, é 16:1. No período de amostragem, o quociente médio variou entre 42,6 (local I) e 64,7 (local IV), comprovando um claro excesso de azoto ao longo do gradiente estuarino. A limitação pelo fósforo derivada do aumento de azoto antropogénico tem sido referenciada em vários estuários e zonas costeiras adjacentes a grandes rios, como Chesapeake Bay (Fisher *et al.*, 1999), o Golfo do México (Lohrenz *et al.*, 1999) e o estuário do Rio Pearl (Yin *et al.*, 2004).

Os níveis de contaminação fecal na água foram, no estuário médio e inferior, bastante superiores ao admissível para águas balneares, piorando em direcção a jusante. De salientar o facto de se ter notado a descarga de esgoto na estação II (Massarelos) durante o mês de Fevereiro, confirmando que um dos principais

problemas de poluição do estuário continua a estar ligado às descargas oriundas de linhas de água que substituem o saneamento básico e o tratamento adequado dos esgotos urbanos.

4.2 DESNITRIFICAÇÃO

Face às pressões antropogénicas os ecossistemas tiveram, inevitavelmente, que se adaptar ao excesso de nutrientes. Neste processo de mudança, os microrganismos bentónicos têm um papel importante nas transformações do azoto estuarino. Em zonas anóxicas, as bactérias desnitrificantes convertem NO_3^- ou NO_2^- em formas gasosas, N_2 ou N_2O , podendo este processo reduzir a carga de azoto de origem terrestre para águas costeiras (Jensen *et al.*, 1996; Seitzinger, 2000). Em sistemas costeiros hiper-nutricados, a desnitrificação aumenta e conseqüentemente a quantidade de N_2O produzido por este processo também aumenta (Seitzinger *et al.*, 1983; Robinson *et al.*, 1998; Corredor *et al.*, 1999).

O N_2O é um gás associado ao efeito de estufa, mais potente que o dióxido de carbono ou o metano e crê-se que contabilize uma fracção significativa do aquecimento global. Por outro lado, a sua degradação na atmosfera contribui para a depleção da camada de ozono (Dickinson & Cicerone, 1986). As concentrações atmosféricas de N_2O têm vindo a aumentar cerca de 0,25 % por ano, durante o último século (Rasmussen & Khalil, 1986). Os sedimentos estuarinos podem ser uma fonte de N_2O para a coluna de água e atmosfera, podendo resultar na sobressaturação da água (Smith *et al.*, 1983; Law *et al.*, 1992). Estima-se que os estuários contribuam em 60 % da produção oceânica global de N_2O (Bange *et al.*, 1996). A libertação de N_2O a partir dos sedimentos é o resultado da sua produção durante os processos de nitrificação e desnitrificação (Knowles, 1982), sendo a desnitrificação reconhecida como a fonte principal (Kerner, 1996; Codispoti *et al.*, 2001).

Uma vez que a desnitrificação bêntica influencia o balanço de azoto inorgânico nos estuários, é importante perceber como este processo é controlado por factores ambientais, e de que modo é que varia em termos espaciais e temporais.

4.2.1 METODOLOGIA

A monitorização da dinâmica da actividade desnitrificante em sedimentos subtidais pode ser efectuada recorrendo a incubações de sedimento na presença de um inibidor do processo. O método de inibição por acetileno tem sido criticado por subestimar a desnitrificação devido a dois factores principais (Seitzinger *et al.*, 1993): (1) ser difícil assegurar completa difusão do acetileno quando adicionado à incubação de um *core* intacto, podendo a redução do N₂O não ser completamente inibida; (2), o acetileno inibir também a nitrificação, podendo o nitrato tornar-se limitante se a desnitrificação estiver dependente da nitrificação para produção de substrato. A primeira limitação não se colocou neste trabalho uma vez que foram usadas pequenas quantidades de sedimento e as incubações foram efectuadas com agitação constante. A segunda foi ultrapassada pela adição de NO₃⁻ à incubação (Joye *et al.*, 1996). A simplicidade e versatilidade do método usado têm permitido o seu uso em estudos de desnitrificação em sedimentos aquáticos e terrestres (Bernot *et al.*, 2003). Por outro lado, a utilização deste método não permite a quantificação de taxas actuais mas taxas potenciais no sentido em que avalia a máxima capacidade nas condições óptimas. Uma vez que o N₂O é facilmente analisado por cromatografia gasosa utilizando um detector de captura de electrões (GC-ECD) e a sua concentração na atmosfera é reduzida, este método evita as dificuldades de medições directas de N₂.

4.2.2 POTENCIAIS DE DESNITRIFICAÇÃO

Ao longo do gradiente estuarino estudado, a actividade desnitrificante foi detectada em todos os locais e ao longo de todo o ano, revelando a presença generalizada de bactérias desnitrificantes.

Os valores mais elevados foram encontrados no estuário inferior (estação I), um local com maior aporte de poluição orgânica e deposição de detritos. Os valores mais baixos foram encontrados no estuário superior (estação IV), um local exposto a concentrações superiores de nitratos dissolvidos, mas caracterizado por sedimento mais grosseiro e com menor quantidade de matéria orgânica total.

Os valores da desnitrificação medidos neste trabalho ($0,22 - 19 \text{ nmoles N g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) são da mesma ordem de grandeza aos previamente obtidos no estuário inferior do Rio Douro (Magalhães *et al.*, 2005a e 2005b). Na zona intertidal do estuário, observaram-se potenciais de desnitrificação de $10 \text{ nmoles N g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ em sedimentos arenosos e $50 \text{ nmoles N g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ em biofilme rochoso (Magalhães *et al.*, 2005a). Estão também dentro dos limites encontrados para outros ecossistemas terrestres e aquáticos: em solos arenosos, cerca de $20 \text{ nmol N g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Drury *et al.*, 1992), em ribeiras, $8-125 \text{ nmol N g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Aelion *et al.*, 1997) e em sedimentos fluviais: $< 0,005-260 \text{ nmol N g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Bradley *et al.*, 1995; García-Ruiz *et al.*, 1998).

O modelo de regressão múltipla obtido para a totalidade dos valores incluiu as variáveis: temperatura, concentração de nitritos e amónia, carência bioquímica de oxigénio e caudal. No entanto, não é certo que todas estas variáveis estejam efectivamente relacionadas com a desnitrificação e a utilização de um grande número de variáveis pode tornar difícil a interpretação dos modelos obtidos. Uma influência positiva da temperatura foi também descrita por Pfenning & McMahon (1996), van Luijn *et al.* (1999) e Livingstone *et al.* (2000). Tal como encontrado anteriormente no estuário do Rio Douro, a salinidade não parece regular este processo (Magalhães *et al.*, 2005a). Curiosamente, e ao contrário do referido na generalidade da literatura (García-Ruiz *et al.*, 1998; Cornwell *et al.*, 1999; Dong *et al.*, 2002; Magalhães *et al.*, 2005a), não foi encontrada qualquer relação simples ou múltipla entre a desnitrificação e a concentração de nitratos na água de fundo. Uma explicação plausível pode residir no facto de ter sido adicionado nitrato em excesso à água de incubação para que não houvesse limitação de substrato, contornando a variabilidade espacial e temporal encontrada na coluna de água. Assim, será necessário futuro trabalho no sentido de avaliar a influência dos nitratos nas taxas de desnitrificação

nos quatro locais de amostragem. Tratando-se de sedimentos estuarinos, normalmente sujeitos a variações extremas de parâmetros físicos e químicos, é natural que as comunidades microbianas presentes tenham uma grande capacidade de adaptação à variabilidade das diversas variáveis ambientais incluídas neste trabalho.

Variáveis não medidas, como a actividade de microrganismos e macrofauna, podem também exercer influência no processo de desnitrificação (Seitzinger, 1990; Cornwell, 1999; Herbert, 1999). Por exemplo, a influência da macrofauna na desnitrificação foi mostrada por Barnes & Owen (1998), embora tenha havido dificuldade em estabelecer uma relação directa. O conteúdo e disponibilidade do carbono orgânico do sedimento podem ser, potencialmente, os principais factores controladores da desnitrificação, sendo a concentração de nitratos na água um factor secundário (Pfenning & McMahon, 1996; Barnes & Owen, 1998).

A medição do N_2O produzido nas experiências sem adição do inibidor reflecte a produção natural deste gás durante o processo de desnitrificação. Este valor atingiu um máximo de 40,4 % do valor total de N_2O durante as incubações com acetileno (local III, Maio). As médias obtidas variaram entre 2,6 % (estação I) e 12,1 % (estação III). Os valores encontrados contrastam com valores reportados na literatura que referem razões $N_2O:N_2$ abaixo de 5 % (Seitzinger *et al.*, 1984; Seitzinger, 1998), embora valores mais elevados tenham sido encontrados por Garcia-Ruiz *et al.* (1998) e Cartaxana & Lloyd (1999) em sedimentos fluviais e zonas de sapal, respectivamente. Percentagens altas parecem indicar uma inibição incompleta da enzima N_2O reductase pelo acetileno e/ou inibição desta enzima por outros factores, como sulfuretos (Sørensen *et al.*, 1980) ou outros compostos presentes no ambiente. Ainda que a adição de nitratos à água de incubação possa ter potenciado um aumento da produção de N_2O (Magalhães *et al.*, 2005a), como esta concentração foi constante em todas as incubações realizadas, este facto dificilmente poderia explicar a variabilidade sazonal nem identificar os mecanismos que se traduzem neste aumento.

Não é claro porque razão amostras com características similares libertaram proporções diferentes de N_2O . Por outro lado, a concentração de nitratos dissolvidos

e o diâmetro mediano do sedimento explicaram apenas 31 % desta variação e, para cada estação, os parâmetros seleccionados pela regressão variaram. Outros factores podem ter influência neste processo, há referências de que a produção de N_2O pode ser potenciada em condições de baixa concentração de oxigénio (Yoshinari *et al.*, 1997; de Bie *et al.*, 2002). Estudos mais detalhados seriam necessários para avaliar a influência de variáveis individuais neste processo. Por exemplo, é necessário clarificar quais as relações entre características físicas e químicas do ambiente e a desnitrificação casuais e quais são devidas simplesmente a inter-relações.

O ser humano já duplicou o fluxo de azoto nos continentes e algumas projecções sugerem a possibilidade de esse número aumentar mais dois terços até 2050 (MA, 2005). Fluxos excessivos de azoto contribuem para a eutrofização de ecossistemas marinhos e de água doce (com implicações na biodiversidade). De certa forma, o azoto (na forma N_2O) é também responsável pela destruição do ozono na estratosfera (provocando a diminuição da camada de ozono e intensificando a irradiação UV) e o aquecimento global. A estimativa do valor económico das funções e serviços derivados de ecossistemas naturais faz sobressair a importância fundamental dos estuários atribuindo-lhe o valor mais elevado por unidade de área comparativamente a outros sistemas (Constanza *et al.*, 1997). Estes serviços têm vindo degradados e utilizados de forma não sustentável, fazendo cada vez mais aumentar o seu valor. A gestão integrada dos ecossistemas, conservação, uso sustentável da biodiversidade, e mudanças climáticas é uma ferramenta essencial para garantia de um futuro sustentável.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram tecer as seguintes considerações:

- O período de estudo caracterizou-se por um baixo caudal fluvial e, concomitantemente, a cunha salina, dependendo do regime de caudal, chegou a atingir o estuário superior.
- O teor em nutrientes na água do estuário do Rio Douro apresentou valores elevados, principalmente no que concerne aos compostos azotados. Apesar disso, a coluna de água esteve razoavelmente oxigenada. Os níveis de contaminação fecal foram, em média, bastante superiores ao admissível para águas balneares. Os sedimentos subtidais apresentaram características distintas ao longo do gradiente estuarino, quer em termos granulométricos quer em termos de conteúdo em matéria orgânica.
- A técnica de inibição com acetileno mostrou-se útil na avaliação dos potenciais de desnitrificação. Os potenciais de desnitrificação medidos nos sedimentos variaram entre 0,2 - 19 $\text{nmol N g}^{-1} \text{h}^{-1}$, diminuindo progressivamente para montante. De um modo geral, as taxas determinadas nas quatro áreas de estudo estão dentro dos intervalos de valores obtidos por outros autores, pelo que o processo afigura-se importante para remoção de nitrato deste sistema.

- A produção de N_2O relativamente à produção de N_2 , na estação III (Ribeira), foi elevada comparativamente a valores reportados em outros ambientes naturais, chegando a atingir os 40 %, sugerindo que o processo de desnitrificação não é completo. Neste caso, e embora continue a haver remoção de compostos azotados do sistema, um dos produtos finais do processo será N_2O , um gás potenciador do efeito de estufa. Nos restantes locais, os valores da razão $N_2O:N_2$ foram em média inferiores a 5 %, dentro do descrito na bibliografia.
- O processo de desnitrificação foi detectado em todas as amostras recolhidas, confirmando a presença ubíqua das bactérias desnitrificantes no estuário. A desnitrificação é um dos processos para a remoção de azoto dos sistemas aquáticos, mas a sua magnitude global no estuário do Rio Douro, por limitações técnicas, não pode ser avaliada. O mesmo se passa com a libertação de N_2O durante este processo.
- As variações globais dos potenciais de desnitrificação e produção de N_2O não apresentaram influência directa de nenhum dos parâmetros ambientais analisados, sugerindo que outros parâmetros e/ou uma conjugação mais complexa de factores intervenham na regulação destes processos. Registaram-se, no entanto, algumas correlações significativas independentes para cada estação, nomeadamente com as concentrações de amónia e fosfato na coluna de água, o caudal, salinidade, número total de bactérias na água e conteúdo em matéria orgânica do sedimento.

O conjunto de resultados obtidos contribuiu de alguma forma para o início do conhecimento do papel dos sedimentos subtidais do estuário do rio Douro, em termos de dinâmica de azoto inorgânico, especialmente nos sectores médio e superior negligenciados em estudos anteriores.

Nos sedimentos coexiste uma multiplicidade de processos físicos, químicos e biológicos. Este trabalho forneceu algumas pistas sobre a actividade desnitrificante e recirculação do azoto no estuário. No entanto, a confirmação da importância deste

processo na dinâmica do azoto entre o sedimento e a coluna de água só será possível se a investigação prosseguir no sentido de os identificar e quantificar directamente. O estudo de outros processos, descobertos recentemente, nomeadamente a oxidação anaeróbia da amónia, será um complemento importante na compreensão da biogeoquímica deste ecossistema.

REFERÊNCIAS

Abreu, C; Jurgens, G; De Marco, P; Saano, A & Bordalo, AA. 2001. Crenarchaeota and Euryarchaeota in temperate estuarine sediments. *Journal of Applied Microbiology*, vol. 90, p. 713-718.

Abreu, C. 2005. Application of molecular techniques to the study of Bacteria and Archaea populations in the river Douro estuary. Tese de Doutoramento, Universidade do Porto.

Aelion, CM; Shaw, JN & Wahl, M. 1997. Impact of suburbanization on ground water quality and denitrification in coastal aquifer sediments. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* vol. 213, p. 31-51.

An, S & Joye, SB. 2001. Enhancement of coupled nitrification-denitrification by benthic photosynthesis in shallow estuarine sediments. *Limnology and Oceanography* vol. 46 (1), p. 62-74.

APHA. 1992. *Standard methods for the examination of water and waste water*, 18th edition American Public Health Association, New York.

Bange, HW; Rapsomanikis, S & Andreae, MO. 1996. Nitrous oxide in coastal waters. *Global Biogeochemical Cycles* vol. 10 (1), p. 197-207.

Barnes, J & Owens, JP. 1998. Denitrification and nitrous oxide concentrations in the Humber estuary, UK, and adjacent coastal zones. *Marine Pollution Bulletin* vol. 37 (3-7), p. 247-260.

Bernot, MJ; Dodds, WK; Gardner, WS; McCarthy, MJ; Sobolev, D & Tank, JL. 2003. Comparing denitrification estimates for a Texas estuary by using acetylene inhibition and membrane inlet spectrometry. *Applied and Environmental Microbiology* vol. 69 (10), p. 5950-5956.

Bonin, P; Omnes, P & Chalamet, A. 1998. Simultaneous occurrence of denitrification and nitrate ammonification in sediments of the French Mediterranean Coast. *Hydrobiologia* vol. 389, p. 169-182.

Bordalo, AA. 1991. Ecologia do estuário do Rio Douro. Abordagem da evolução espaço-temporal e inter-relações na componente planctónica do compartimento microbiológico. Tese de Doutoramento, Universidade do Porto.

Bordalo, AA. 1993. Effects of salinity on bacterioplankton: field and microcosm experiments. *Journal of Applied Bacteriology* vol. 75, p. 393-398.

Bordalo, AA. 1994. Faecal coliform recovery in two standard media along an estuarine gradient. *Water Research* vol. 28, p. 2331-2334.

Bordalo, AA & Lobo-da-Cunha, A. 1994. Vírus num ambiente estuarino. Actas da 4^a Conferência Nacional sobre a Qualidade do Ambiente vol. 1, p. 175-182.

Bordalo, AA. 1997. Contribuição para a gestão da água no estuário do Rio Douro. Relatório Final (JNICT/PEAMB 231/93).

Bordalo, AA & Vieira, MEC. 2005. Spatial variability of phytoplankton, bacteria and viruses in the mesotidal salt wedge Douro estuary (Portugal). *Estuarine, Coastal and Shelf Science* vol. 63, p. 143-154.

Bradley, PM; McMahon, PB & Chapelle, FH. 1995. Effects of carbon and nitrate on denitrification in bottom sediments of an effluent-dominated river. *Water Resources Research* vol. 31, p. 1063-1068.

Carritt, DE & Carpenter, JH. 1966. Comparison and evaluation of currently employed modifications of the Winkler method for determining dissolved oxygen in seawater; a NASCO report. *Journal of Marine Research* vol. 24, p. 286-318.

Cartaxana, P & Lloyd, D. 1999. N₂, N₂O and O₂ profiles in a Tagus estuary salt marsh. *Estuarine, Coastal & Shelf Science* vol. 48, p. 751-756.

Christensen, PB; Nielsen, LP; Revsbech, NP & Sørensen, J. 1989. Microzonation of denitrification activity in stream sediments as studied with a combined oxygen and nitrous oxide microsensor. *Applied and Environmental Microbiology* vol. 55 (5), p. 12234-1241.

Codispoti, LA; Brandes, JA; Christensen, JP; Devol, AH; Naqvi, SWA; Pearl, HW & Yoshinari, T. 2001. The oceanic fixed nitrogen and nitrous oxide budgets: moving targets as we enter the anthropocene? *Scientia Marina* vol. 65 (S2), p. 85-105.

Constanza, R; d'Arge, R; de Groot, R; Farber, S; Grasso, M; Hannon, B; Limburg, K; Naeem, S; O'Neill, RV; Paruelo, J; Raskin, RG; Sutton, P & van den Belt, M. 1997. The value of the world's ecosystems services and natural capital. *Nature* vol. 387, p. 253-260.

Comunidade Europeia. 1991. Council directive concerning the protection of waters against pollution caused by nitrates from agricultural sources. EC 91/676. *Official Journal of the European Community* L35, p. 1-8.

Cook, PLM; Eyre, BD; Leeming, R & Butler, ECV. 2004. Benthic fluxes of nitrogen in the tidal reaches of a turbid, high-nitrate sub-tropical river. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* vol. 59, p. 675-685.

Cornwell, JF; Kemp, WM & Kana TM. 1999. Denitrification in coastal ecosystems: methods, and ecosystem level controls, a review. *Aquatic Ecology* vol. 33, p. 41-54.

Corredor, JE; Morell, JM & Bauza, J. 1999. Atmospheric nitrous oxide fluxes from mangrove sediments. *Marine Pollution Bulletin* vol. 38, p. 473-478.

Dalsgaard, T & Thamdrup, B. 2002. Factors controlling anaerobic ammonium oxidation with nitrite in marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology* vol. 68 (8), p. 3802-3808.

Day Jr, JW, Hall, CAS, Kemp, WM & Yáñez-Arancibia, A. 1989. *Estuarine Ecology*, Wiley-Interscience Pub, Canada.

de Bie, MJM; Middelburg, JJ; Starink, M & Laanbroek, HJ. 2002. Factors controlling nitrous oxide at the microbial community and estuarine scale. *Marine Ecology Progress Series* vol. 240, p. 1-9.

de Jonge, VN; Elliot, M & Orive, E. 2002. Causes, historical development, effects and future challenges of a common environmental problem: eutrophication. *Hydrobiologia* vol. 475/476, p. 1-19.

Delwiche, CC. 1970. The nitrogen cycle. *Scientific American* vol. 19, p. 331-369.

Dickinson, RE & Cicerone, RJ. 1986. Future global warming from atmospheric trace gases. *Nature* vol. 319, p. 109-115.

Dong, LF; Nedwell, DB; Underwood, GJC; Thornton, DCO & Rusmana, I. 2002. Nitrous oxide formation in the Colne estuary, England: the central role of nitrite. *Applied and Environmental Microbiology* vol. 68 (3), p. 1240-1249.

Draper, NR & Smith, H. 1981. *Applied Regression Analysis*, 2nd edition, Wiley, New York.

Drury, CF; McKenney, DJ & Findlay, WI. 1992. Nitric oxide and nitrous oxide production from soil: water and oxygen effects. *Soil Science Society of America Journal* vol. 57, p. 82-87.

Dyer, KR. 1997. *Estuaries – A Physical Introduction*. 2nd edition, John Wiley, Chichester.

Einsle, O & Kroneck, PMH. 2004. Structural basis of denitrification. *Biological Chemistry* vol. 385, p. 875-883.

Elliot, M & McLusky, DS. 2002. The need for definitions in understanding estuaries. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* vol. 55, 815-827.

Fairbridge, RW. 1980. The estuary: its definition and geodynamic cycle. In: *Chemistry and biochemistry of estuaries* (Olausson, E & Cato, I Eds.). John Wiley & Son, New York, p. 1-35.

Ferreira, M; Antunes, P; Gil, O; Vale, C & Reis-Henriques MA. 2004. Organochlorine contaminants in flounder (*Platichthys flesus*) and mullet (*Mugil cephalus*) from Douro estuary, and their use as sentinel species for environmental monitoring. *Aquatic Toxicology* vol. 69 (4), p. 347-357.

Ferreira, M; Moradas-Ferreira, P & Reis-Henriques, MA. 2005. Oxidative stress biomarkers in two resident species, mullet (*Mugil cephalus*) and flounder (*Platichthys flesus*), from a polluted site in River Douro Estuary, Portugal. *Aquatic Toxicology* vol. 71 (1), p. 39-48.

Fisher, TR; Gustafson, AB; Sellner, K; Lacouture, R; Haas, LW; Wetzel, RL; Magnien, R; Everitt, D; Michaels, B & Karrh, R. 1999. Spatial and temporal variation of resource limitation in Chesapeake Bay. *Marine Biology* vol. 133, p. 763-778.

García-Ruiz, R; Pattinson, SN & Whitton, BA. 1998. Denitrification in river sediments: relationship between process rate and properties of water and sediment. *Freshwater Biology* vol. 39, p. 467-476.

Grasshoff, K; Ehrhardt, M & Kremling, K. 1983. *Methods of Seawater Analysis*, 2nd, revised and extended edition. Verlag Chemie, Weinheim.

Hensen, C & Zabel, M. 2000. Early diagenesis at the benthic boundary layer: oxygen and nitrate in marine sediments. In: *Marine Geochemistry* (Schulz, HD & Zabel, M Eds.), Springer-Verlag, Berlin, p. 209-231.

Herbert, RA. 1999. Nitrogen cycling in coastal marine ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews* vol. 23, p. 563-590.

Jensen, KM; Jensen, MH & Kristensen, E. 1996. Nitrification and denitrification in Wadden Sea sediments (konigshafen, Island of Sylt, Germany) as measured by nitrogen isotope pairing and isotope dilution. *Aquatic Microbial Ecology* vol. 11, p. 181-191.

Jickells, TD. 1998. Nutrient biogeochemistry of the coastal zone. *Science* vol. 281, p. 217-222.

Jones, MN. 1984. Nitrate reduction by shaking with cadmium: alternative to cadmium columns. *Water Research* vol. 18, p. 643-646.

Joye, SB & An S. 1999. *Denitrification in Galveston Bay* (Final Report). Texas Water Development Board.

Joye, SB & Chambers, RM. 1993. Nitrogen exchange between microvegetated intertidal sediments and the overlying water column. *Estuarine Research Federation Annual Meeting*. Hilton Head, Sc., Published Abstract. 58.

Joye, SB & Paerl, HW. 1993. Nitrogen fixation and denitrification in the intertidal and subtidal environments of Tomales Bay, California. In: *Biogeochemistry of global change: Radiative trace gases* (Oremland, RS Ed.). Blackwell Scientific, New York, p.635-653.

Joye, SB; Smith, SV; Hollibaugh, JT & Paerl, HW. 1996. Estimating denitrification rates in estuarine sediments: a comparison of stoichiometric and acetylene based methods. *Biogeochemistry* vol. 33, p. 197-215.

Kemp, MJ & Dodds, WK. 2002. The influence of ammonium, nitrate, and dissolved oxygen concentrations on uptake, nitrification, and denitrification rates associated with prairie stream substrata. *Limnology and Oceanography* vol. 47 (5), p. 1380-1393.

Kerner, M. 1996. Sink and source reactions of N₂O within the sediment-water interface formed by settling seston from the Elbe estuary. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* vol. 43, p. 419-432.

Ketchum, BH. 1969. Eutrophication in estuaries. In: *Eutrophication – causes, consequences, correctives* Proceedings of the Symposium of the National Academy of Sciences, p. 197-209.

Kim, D; Matsuda, O & Yamamoto, T. 1997. Nitrification, denitrification and nitrate reduction rates in the sediment of Hiroshima Bay, Japan. *Journal of Oceanography* vol. 53, p. 317-324.

Knowles, R. 1982. Denitrification. *Microbiological Reviews* vol. 46, p. 43-70.

Laffoley, D & Hiscock, K. 1993. The classification of benthic estuarine communities for nature conservation assessments in Great Britain. *Journal of Aquatic Ecology* vol. 27, p. 181-187.

Lasserre, P. 1979. Les lagunes côtières: écosistèmes refuges foyers de cultures et cibles d'expansion économiques. *Nature et ressources* vol. 4, p. 2-21.

Law, CS; Rees, AP & Owens, NJP. 1992. Nitrous oxide: estuarine sources and atmospheric flux. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* vol. 35, p. 301-314.

Lohrenz, SE; Fahnenstiel, GL; Redalje, DG; Lang, GA; Dagg, MJ; Whiteledge, TE & Dortch, Q. 1999. Nutrients, irradiance, and mixing as factors regulating primary production in coastal waters impacted by the Mississippi River plume. *Continental Shelf Research* vol. 19, p. 1113-1141.

Livingstone, MW; Smith, RV & Laughlin, RJ. 2000. A spatial study of denitrification potential of sediments in Belfast and Strangford Loughs and its significance. *The Science of the Total Environment* vol. 251/252, p. 369-380.

Luther, GW; Sundby, B; Lewis, BL; Brendel, PJ & Silverberg, N. 1997. Interactions of manganese with the nitrogen cycle: alternative pathways to dinitrogen. *Geochimica et Cosmochimica Acta* vol. 61 (19), p. 4043-4052.

MA. 2005. *Ecosystems and Human Well-being: General Synthesis*. Millenium Ecosystem Assessment. <http://www.millenniumassessment.org/en/products.aspx>.

Madigan, MT; Martinko, JM & Parker, J. 2003. *Brock biology of microorganisms*, 10th edition, Pearson Education Inc., NJ.

Magalhães, CM; Bordalo, AA & Wiebe, WJ. 2002. Temporal and spatial patterns of intertidal sediment-water nutrient and oxygen fluxes in the Douro River estuary, Portugal. *Marine Ecology Progress Series* vol. 233, p. 55-71.

Magalhães, CM; Joye, SB; Moreira, RM; Wiebe, WJ & Bordalo, AA. 2005a. Effect of salinity and inorganic nitrogen concentrations on nitrification and denitrification rates in intertidal sediments and rocky biofilms of the Douro River estuary, Portugal. *Water Research* vol. 39, p. 1783-1794.

Magalhães, CM; Wiebe, WJ; Joye, SB & Bordalo, AA. 2005b. Inorganic nitrogen dynamics in intertidal rocky biofilms and sediments of the Douro River estuary (Portugal). *Estuaries* vol. 28 (4), p. 592-607.

Master, Y; Shavit, U & Shaviv, A. 2005. Modified isotope pairing technique to study N transformations in polluted aquatic systems: theory. *Environmental Science & Technology* vol. 39 (6), p. 149-1756.

McLusky, DS & Elliot, M. 2004. *The Estuarine Ecosystem: ecology, threats and management*, 3rd edition, Oxford University Press, Oxford.

Montagna, PA; Alber, M; Doering, P & Connor, MS. 2002. Freshwater inflow: inhibitor of methanotrophy. *Estuaries* vol. 25, p. 1243-1245

Mucha, AP; Vasconcelos, MTSD & Bordalo, AA. 2003. Macrobenthic community in the Douro estuary: relationships with trace metals and natural sediment characteristics. *Environmental Pollution* vol. 121, p. 169-180.

Mucha, AP; Bordalo, AA & Vasconcelos, MTSD. 2004. Sediment quality in the Douro river estuary based on trace metal contents, macrobenthic community and elutriate sediment toxicity test (ESTT). *Journal of Environmental Monitoring* vol. 6, p. 585-592.

Mucha, AP; Vasconcelos, MTSD & Bordalo, AA. 2005. Spatial and seasonal variations of the macrobenthic community and metal contamination in the Douro estuary (Portugal). *Marine Environmental Research* vol. 60, p. 531-550.

Mudroch, A & Azcue, JM. 1995. *Manual of Aquatic Sediment Sampling*, CRC Press, Inc., Boca Raton.

Mulder, A; Van de Graaf, AA; Robertson LA & Kuenen, JG. 1995. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiology Ecology* vol. 16, p. 177-184.

Nishio, T; Koike, I & Hattori, A. 1983. Estimates of denitrification and nitrification in coastal and estuarine sediments. *Applied and Environmental Microbiology* vol. 45 (2), p. 444-450.

Nixon, SW. 1981. Remineralization and nutrient cycling in coastal marine ecosystems. In: *Estuaries and Nutrients* (Neilson, BJ & Cronin, LE Eds.). Clifton, NJ: Humana Press. p. 111-138.

Odum, EP. 1997. *Fundamentos de Ecologia*, 5ª edição, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.

Ogilvie, B; Nedwell, DB; Harrison, RM; Robinson, A & Sage, A. 1997. High nitrate, muddy estuaries as nitrogen sinks: the nitrogen budget of the River Colne estuary (United Kingdom). *Marine Ecology Progress Series* vol. 150, p. 217-228.

Pfenning, KS & McMahon, PB. 1996. Effect of nitrate, organic carbon, and temperature on potential denitrification rates in nitrate-rich riverbed sediments. *Journal of Hydrology* vol. 187, p. 283-295.

Porter, KG & Feig, YS. 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnology and Oceanography* vol. 25, p. 943-948.

Postgate, J. 1987. *Nitrogen Fixation*, New Studies in Biology, 2nd edition, Edward Arnold Ltd., London.

Pritchard, DW. 1967a. Observations of circulation in coastal plain estuaries In: *Estuaries*. (Lauf, GH, Ed.). American Association for the Advancement of Science, Publication no. 83. Washington, D.C., p. 37-44.

Pritchard, DW. 1967b. What is an estuary: physical viewpoint. In: *Estuaries*. (Lauf, GH, Ed.). American Association for the Advancement of Science, Publication no. 83. Washington, D.C., p. 329-335.

Punshon, S & Moore, RM. 2004. Nitrous oxide production and consumption in a eutrophic coastal embayment. *Marine Chemistry* vol. 91 (1-4), p. 37-51.

Ramos, S. 2001. Caracterização e dinâmica da ictiofauna do estuário do Rio Douro, nas suas fases larvar e juvenil. Tese de Mestrado, Universidade do Porto.

Rasmussen, RA & Khalil, MAK. 1986. Atmospheric trace gases: trends and distributions over the last decade. *Science* vol. 232, p. 1623-1624.

Redfield, AC. 1958. The biological control of chemical factors in the environment. *American Scientist* vol. 46, p. 205-221.

Rizzo, WM. 1990. Nutrient Exchanges Between the Water Column and Subtidal Benthic Microalgae Community. *Estuaries* vol. 13, p. 219-226.

Robinson, AD; Nedwell, DB; Harrison, RM & Ogilvie, BG. 1998. Hypernutrified estuaries as sources of N₂O emission to the atmosphere: the estuary of the River Colne, Essex, UK. *Marine Ecology Progress Series* vol. 164, p. 58-71.

Rysgaard, S; Risgaard-Petersen, N; Sloth, NP; Jensen, K & Nielsen, LP. 1994. Oxygen regulation of nitrification and denitrification in sediments. *Limnology and Oceanography* vol. 39 (7), p. 1643-1652.

Rysgaard, S; Christensen, PB & Nielsen, LP. 1995. Seasonal variation in nitrification and denitrification in estuarine sediment colonized by benthic microalgae and bioturbating infauna. *Marine Ecology Progress Series* vol. 126, p. 111-121.

Rysgaard, S; Risgaard-Petersen, N & Sloth, NP. 1996. Nitrification, denitrification and ammonification in sediments of two coastal lagoons in Southern France. *Hydrobiologia* vol. 39 (7), p. 1643-1652.

Schlesinger, WH. 1997. *Biogeochemistry: An Analysis of Global Change*, 2nd edition, Academic Press, San Diego.

Seitzinger, SP; Nixon, SW & Pilson, MEQ. 1984. Denitrification and nitrous oxide production in a coastal marine ecosystem. *Limnology and Oceanography* vol. 29 (1), p. 73-83.

Seitzinger, SP & Nixon, SW. 1985. Eutrophication and the rate of denitrification and N₂O production in coastal marine sediments. *Limnology and Oceanography* vol. 30 (6), p. 1332-1339.

Seitzinger, SP. 1988. Denitrification in freshwater and coastal marine ecosystems: ecological and geochemical significance. *Limnology and Oceanography* vol. 33 (4), p. 702-724.

Seitzinger, SP. 1990. Denitrification in aquatic sediment In: *Denitrification in Soil and Sediment* (Revsbech, NP and Sørensen, J Eds.). Plenum Press, New York, p. 301-322.

Seitzinger, SP. 2000. Scaling up: site-specific measurements to global-scale estimates of denitrification. In: *Estuarine Science: A Synthetic Approach to Research and Practice* (Hobbie, JE, Ed.). Island Press, Washington, D.C., p. 211-241

Shapleigh, JP. 2001. The Denitrifying Prokaryotes. In: *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community* (Dworkin, M et al., Eds.). 3rd ed., release 3.7, November 2, 2001. Springer-Verlag, New York. <http://link.springer-ny.com/link/service/books/10125/>.

Smith, CJ; DeLaune, RD & Patrick, WP Jr. 1983. Nitrous oxide emission from Gulf Coast Wetlands. *Geochimica et Cosmochimica Acta* vol. 47, p. 1805-1814.

Smith, SV; Wiebe, WJ; Hollibaugh, JT; Dollar, SJ; Hager, SW; Cole, BE; Tribble, GW & Wheeler, PA. 1987. Stoichiometry of C, N, P and Si fluxes in a temperate-climate embayment. *Journal of Marine Research* vol. 45, p. 427-460.

Sørensen, J. 1978. Denitrification rates in a marine sediment measured by the acetylene inhibition technique. *Applied and Environmental Microbiology* vol. 36 (1), p. 139-143.

Sørensen, J, Tiedje, JM & Firestone, RB. 1980. Inhibition by sulphide of nitric and nitrous oxide reduction by denitrifying *Pseudomonas fluorescens*. *Applied and Environmental Microbiology* vol. 39 (1), p. 105-108.

Sundbäck, K & Miles, A. 2002. Role of microphytobenthos and denitrification for nutrient turnover in embayments with floating macroalgal mats: a spring situation. *Aquatic Microbial Ecology* vol. 30, p. 91-101.

Usui, T; Koike, I & Ogura, N. 2001. N₂O production, nitrification and denitrification in a estuarine sediment. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* vol. 52, p. 769-781.

van de Graaf, AA; Mulder, A; de Bruijn, P; Jetten, MSM; Robertson LA & Kuenen, JG. 1995. Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process. *Applied and Environmental Microbiology* vol. 61 (4), p. 1246-1251.

van Luijn, F, Boers, PCM, Lijklema, L & Sweerts, JPRA. 1999. Nitrogen fluxes and processes in sandy and muddy sediments from shallow eutrophic lake. *Water Research* vol. 33, p. 33-42.

Vieira, MEC & Bordalo, AA. 2000. The Douro estuary (Portugal): a mesotidal salt wedge. *Oceanologica Acta* vol. 23, p. 585-594.

Wang, F; Juniper, SK; Pelegrí, SP & Macko, SA. 2003. Denitrification in sediments of the Laurentian Trough, St. Lawrence Estuary, Québec, Canada. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* vol. 57, p. 515-522.

Ward, BB. 1992. Nitrogen cycle of the sea. In: *Encyclopedia of Earth System Science*. Academic Press, Inc., vol. 3, p. 295-306.

Ye, RW; Averill, BA & Tiedje, JM. 1994 Denitrification: production and consumption of nitric oxide. *Applied and Environmental Microbiology* vol. 60 (4), p. 1053-1058.

Yin, K; Song, X; Sun, J & Wu, MCS. 2004. Potential P limitation leads to excess N in the Pearl River estuarine coastal plume. *Continental Shelf Research* vol. 24, p. 1895-1907.

Yoshinari, T; Altabet, MA; Naqvi, SWA; Codispoti, L; Jayakumar, A; Kuhland, M & Devol, A. 1997. Nitrogen and oxygen isotopic composition of N₂O from suboxic waters of the eastern tropical North Pacific and the Arabian Sea – measurement by continuous-flow isotope-ratio monitoring. *Marine Chemistry* vol. 56, p. 253-264.

Zar, JH. 1999. *Biostatistical Analysis*, 4th edition, Prentice-Hall International, Inc., USA.

Zehr, JP & Ward, BB. 2002. Nitrogen cycling in the ocean: new perspectives on processes and paradigms. *Applied and Environmental Microbiology* vol. 68 (3), p. 1015-1024.

Zumft, WG. 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* vol. 61 (4), p. 533-616.

ANEXO A

MEDIÇÕES *IN SITU*

Tabela A.1 - Valores obtidos para os parâmetros medidos *in situ* na estação I.

Data Hora	Profundidade	Temp	CondSp	Salinidade	OD %	OD Conc	pH	Turbidez
M/D/A	m	C	uS/cm	ppt	%	mg/L		NTU
10-18-04 11:05	3,46	17,02	43230	27,89	74,1	6,05	7,72	5,5
11-16-04 10:48	1,77	13,59	22912	13,87	113,5	10,83	7,86	9,0
12-16-04 10:36	4,02	13,20	48767	31,81	92,6	7,97	8,11	7,9
01-13-05 10:30	1,99	11,46	40703	25,98	102,0	9,45	8,02	15,6
02-10-05 10:04	3,79	9,47	22051	13,25	104,1	10,93	7,95	11,1
03-01-05 11:01	3,18	10,37	38761	24,57	111,6	10,68	8,1	4,6
04-08-05 8:53	3,56	13,74	21836	13,17	111,1	10,61	7,97	5,5
05-10-05 9:48	3,83	16,62	40733	26,11	111,9	9,31	7,97	4,7
06-08-05 9:16	5,29	13,77	51494	33,82	143,1	12,02	7,92	1,3
07-07-05 9:06	3,84	14,84	50112	32,84	121,4	10,04	7,39	3
08-09-05 9:37	4,21	15,35	51567	33,92	120,5	9,8	7,69	0,3
09-21-05 09:19	3,65	15,73	47940	31,27	78,3	6,42	7,4	-0,1

Tabela A.2 - Valores obtidos para os parâmetros medidos *in situ* na estação II.

Data Hora	Profundidade	Temp	CondSp	Salinidade	OD %	OD Conc	pH	Turbidez
M/D/A	m	C	uS/cm	ppt	%	mg/L		NTU
10-18-04 11:37	4,15	17,75	29950	18,61	67,9	5,78	7,72	4,1
11-16-04 11:18	5,09	13,45	14167	8,24	105,1	10,42	7,74	58,1
12-16-04 11:11	4,43	11,71	27526	16,92	97,5	9,51	8,00	5,5
01-13-05 10:57	4,85	10,86	32069	19,97	97,3	9,48	8,01	8,0
02-10-05 10:42	5,26	9,23	12842	7,38	103,4	11,34	7,85	20,2
03-01-05 11:29	5,13	9,11	19879	11,83	111,6	11,93	8,1	5,9
04-08-05 9:33	3,34	13,33	10592	6,02	115,8	11,67	7,99	6,3
05-10-05 10:24	5,04	16,58	34447	21,7	112,6	9,62	7,95	4,2
06-08-05 9:53	5,00	14,17	49250	32,19	138,1	11,62	7,88	3,1
07-07-05 9:37	4,07	15,94	45568	29,56	117,4	9,69	7,39	0,9
08-09-05 10:03	4,73	19,81	32605	20,42	121,5	9,83	7,74	0,7
09-21-05 09:40	4,76	16,45	45374	29,43	81,3	6,65	6,83	0

Tabela A.3 - Valores obtidos para os parâmetros medidos *in situ* na estação III.

Data Hora	Profundidade	Temp	CondSp	Salinidade	OD %	OD Conc	pH	Turbidez
M/D/Y	m	C	uS/cm	ppt	%	mg/L		NTU
10-18-04 11:50	7,55	17,67	30850	19,22	67,1	5,7	7,71	5,9
11-16-04 11:46	7,36	13,45	16233	9,55	98,4	9,68	7,64	384,3
12-16-04 11:20	7,79	12,55	40536	25,90	98,4	8,91	8,03	10,2
01-13-05 11:10	6,09	10,90	32061	19,97	96,5	9,40	7,96	11,0
02-10-05 10:53	7,12	9,09	15553	9,07	102,0	11,10	7,76	394,6
03-01-05 11:56	7,12	9,37	27682	16,96	108,7	11,16	8,06	6,4
04-08-05 9:50	7,03	13,42	36510	23,1	113	10,22	7,75	7,3
05-10-05 10:46	8,08	16,56	39229	25,04	112,6	9,44	7,97	15,2
06-08-05 10:13	8,14	13,85	50839	33,34	127,1	10,7	7,89	7,5
07-07-05 9:56	8,61	14,44	51600	33,92	111,2	9,21	7,37	1,2
08-09-05 10:28	7,34	17,64	42537	27,4	99,2	8,03	7,76	1,5
09-21-05 10:00	7,66	16,56	44141	28,54	75,8	6,22	7,11	0,8

Tabela A.4 - Valores obtidos para os parâmetros medidos *in situ* na estação IV.

Data Hora	Profundidade	Temp	CondSp	Salinidade	OD %	OD Conc	pH	Turbidez
M/D/Y	m	C	uS/cm	ppt	%	mg/L		NTU
10-18-04 12:26	6,78	17,93	30000	18,64	65,1	5,52	7,48	7,2
11-16-04 12:24	4,02	13,14	242	0,12	111,0	11,65	7,85	38,0
12-16-04 12:00	3,73	10,81	7900	4,39	98,2	10,57	7,62	5,5
01-13-05 11:36	3,68	9,60	12026	6,88	95,8	10,44	7,79	11,4
02-10-05 11:24	3,15	7,99	679,0	0,33	105,9	12,52	8,01	14,4
03-01-05 12:33	3,62	7,84	2318	1,19	108,1	12,76	7,98	6,5
04-08-05 10:29	3,43	12,95	5650	3,08	120,8	12,5	7,64	7,6
05-10-05 11:22	4,08	16,55	21592	13,02	113,1	10,2	7,82	4,3
06-08-05 10:44	4,15	16,12	38004	24,18	132,7	11,28	7,88	3,6
07-07-05 10:26	3,54	21,3	29596	18,35	118,7	9,45	7,29	1,8
08-09-05 10:55	3,85	20,44	30624	19,06	101,4	8,17	7,56	1,3
09-21-05 10:36	3,73	20,09	28201	17,41	80,3	6,58	7,09	7,3