Estudo da qualidade da água do Rio Ave: relevância da relação entre indicadores microbiológicos, macroinvertebrados e parâmetros físico-químicos

Ana Sofia Barbosa de Vasconcelos

Mestrado em Biologia e Gestão da Qualidade de Água

Biologia

2015

Orientador

Doutora Lucinda Janete Bessa, Investigadora Pós-Doc, ICBAS

Coorientador

Professora Doutora Maria da Natividade Ribeiro Vieira, Professora Associada, FCUP

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO

U.PORTO

FACULDADE DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE DO PORTO

Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, _____/_____/_____

Agradecimentos

Muitos foram os intervenientes que, de alguma maneira, direta ou indiretamente, contribuíram para a elaboração desta dissertação. A todos eles expresso desde já o meu muito obrigado. Entre muitos gostaria de expressar os meus agradecimentos:

À minha orientadora, Doutora Lucinda Bessa, e coorientadora, Professora Doutora Natividade Vieira, pela sua disponibilidade, apoio, orientação e ajuda. Às duas muito obrigada. O vosso apoio e orientação foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Paulo Martins da Costa, pela sua disponibilidade, boa disposição, amizade, apoio e incentivo. Obrigado pela oportunidade de desenvolver competências académicas e profissionais, disponibilizando o seu laboratório para a realização de parte deste trabalho.

Às técnicas Elizabete Lopes e Sónia Azevedo, pela amizade, boa disposição, disponibilidade e simpatia.

Ao Ângelo Mendes, pela confiança, amizade, disponibilidade, boa disposição e apoio. Foi muito importante a amizade e apoio para a realização deste trabalho, incluindo a ajuda dispensada.

Ao Doutor Ezequiel, responsável pela microbiologia clínica no serviço anatomia patológica no Hospital de Vila Nova de Famalicão. Obrigada pela disponibilidade, prontidão e simpatia.

Às estagiárias que passaram pelos laboratórios onde realizei este trabalho, Joana Silva, Flávia Martins, Sofia Lobo, entre outros. Entre outros estagiários que estiveram nos laboratórios, gostava de agradecer ao Carlos Pinheiro pela ajuda na identificação de macroinvertebrados, pela disponibilidade e amizade.

A gradeço à Ana Gavina e à Carolina Rodrigues e aos estagiários do laboratório 1.39 da Faculdade de Ciências.

A todos os meus amigos, entre os quais à Sandra Gomes, Cristina Aguiar e Ana Maria Pereira pela amizade, espirito crítico, paciência e apoio nos momentos bons e maus.

À minha família, toda ela. Aos meus pais, que são o meu exemplo e inspiração para seguir em frente independentemente das dificuldades, para além de ser graças a eles que foi possível atingir este objetivo. Obrigada pela paciência e dedicação. Aos meus irmãos. Obrigada pela paciência ajuda e descontração. À minha avó e tios, e a minha prima Gabriela Martins, por me ajudar a manter o ânimo e a motivação.

A todos estes e outros que não foram mencionados, o meu muito obrigado de coração.

Resumo

A água é um dos recursos naturais que maior degradação tem sofrido ao longo dos anos. O aumento da densidade populacional, da indústria e das explorações agropecuárias são alguns dos fatores que contribuíram para a perda de qualidade das massas de água ao longo do tempo, como é o caso dos rios.

Com a elaboração de uma Diretiva Quadro da Água (DQA) pela Comissão Europeia, os estados membros comprometeram-se a restaurar o bom estado ecológico, olhando para o rio não com um recurso a ser explorado, mas um ecossistema integrado a ser preservado. Segundo esta diretiva, para avaliação da qualidade da água, deveriam ser analisados simultaneamente parâmetros físico-químicos, biológicos e microbiológicos, de forma a ter um retrato o mais fiel possível da qualidade dessa água.

Tendo em conta todos esses parâmetros necessários ao estudo da qualidade da água, foi estudado a qualidade da água num troço do rio Ave, desde a nascente até ao concelho de Vila Nova de Famalicão, em Lousado, distribuído por 6 pontos de amostragem. Este rio tem um historial de degradação das margens e da qualidade da água que coincidiu com o início da industrialização do Vale do Ave, sendo o rio utilizado como recurso para as fábricas têxteis na obtenção de energia e como local de descarga de resíduos excedentes da produção. Esta prática já não é comum, mas ainda se verifica em alguns locais do rio.

Através do estudo de parâmetros físico-químicos, biológicos e microbiológicos tentou-se caracterizar o rio em termos de qualidade da água em diferentes pontos do seu curso. Os parâmetros biológicos utilizados foram o estudo das comunidades de macroinvertebrados enquanto que nos parâmetros microbiológicos foram os estudados os microrganismos totais e de indicadores de contaminação fecal, essencialmente *Enterococcus* spp. e *Escherichia coli*. Para o estudo dos macroinvertebrados foram utilizados diversos índices de diversidade e abundância e distribuição de grupos funcionais, enquanto que para os parâmetros microbiológicos foram estudados a dinâmica das comunidades do biofilme do rio através de PCR-DGGE, a contaminação fecal nos diferentes pontos, quer pelo método tradicional em meio de cultura, quer pela técnica molecular de FISH e a incidência de isolados MDR (*multidrug resistant* - multirresistentes) ao longo dos 6 pontos. Os isolados MDR foram caracterizados geneticamente, *E. coli* para determinação do filogrupo e *Enterococcus* spp. para identificação da espécie.

Foi possível caracterizar a água do rio como sendo razoável, segundo os parâmetros físico-químicos e biológicos, mas com uma contaminação fecal relevante e

crescente desde o ponto C ao ponto F. O ponto F foi caracterizado como o ponto com o maior nível de contaminação e a maior incidência de isolados MDR, como *E. coli* produtoras de ESBL e *Enterococcus* spp., nomeadamente *E. faecalis* e *E. faecium,* resistentes à vancomicina. No entanto, o ponto considerado mais preocupante em termos da incidência de isolados com resistências a antibióticos exclusivos de uso humano e de último recurso foi o ponto D, onde se identificaram *E. coli* resistentes ao imipnem (IMP).

Através do estudo dos grupos funcionais nas comunidades de macroinvertebrados e do nível de contaminação fecal, estudou-se a possibilidade de haver uma relação direta entre a contaminação fecal e a distribuição dos grupos funcionais alimentares. O que se verificou foi que de facto, com o aumento da contaminação ao longo do tempo num mesmo ponto, o grupo funcional dos coletores filtradores tinha tendência a aumentar ou diminuir conforme a dinâmica da contaminação, sendo que, por sua vez, os raspadores orgânicos tinham tendência para diminuir com o aumento da contaminação, estes sim, ao longo do curso do rio. No caso dos coletores filtradores ao longo do curso do rio, o que se verificou foi que a progressão encontrada não tinha diretamente a ver com o aumento da contaminação mas sim com as características do habitat de cada ponto, como os regimes de corrente e tipo de sedimento.

Feita uma caracterização geral verificou-se que a qualidade do rio diminui conforme se afasta da nascente e aumenta a densidade populacional e de explorações industriais, pecuárias e agrícolas.

Sugerem-se fazer estudos mais específicos em pontos críticos para melhor compreender a dinâmica das comunidades e da água do rio, assim como estudos da relação entre contaminação fecal e grupos funcionais alimentares sobre ambiente controlado.

Palavras-Chave: Rio Ave; Macroinvertebrados; *Enterococcus* spp.; *E. coli*; Grupos Funcionais Alimentares; parâmetros físico-químicos; parâmetros biológicos; parâmetros microbiológicos; contaminação; qualidade da água.

Abstract

Water is a natural resource that has been suffering continuous degradation throughout the years. The increase in population density, industrialization and agriculture are some of the factors that contributed for the long term lose of quality in water masses, such as rivers.

With the elaboration of a Water Framework Directive (WFD) by the European Commission, the Member States compromised to restore the good ecological state, seeing the river not as a resource to be explored, but as an integrated ecosystem to be preserved. According to this directive, the evaluation of the water quality, should be simultaneously analyzed both physicochemical, biological and microbiological parameters, in order to achieve a more reliable portrait of the water quality.

Taking into account all of these necessary parameters for the study of water quality, the water of the river Ave was studied and analyzed from near its spring up to the county of Vila Nova de Famalição, in Lousado, in a total of 6 sampling points. This river has a history of riverbanks and water quality degradation that was initiated with the start of industrialization in Vale do Ave, having the river being used as resource for textile factories obtaining energy and as discharge location for surplus production residues. This practice is no longer common but it is still verified in some areas of the river.

By studying physicochemical, biological and microbiological parameters, it was aimed to characterize the river in terms of water quality in different spots of its course. The biological parameters used were the study of communities of macroinvertebrates and the microbiological parameters were the study of total microorganisms and indicators of fecal contamination, essentially *Enterococus* spp. and *Escherichia coli*. For the study of macroinvertebrates several diversity and abundance and distribution rates of functional groups were used. The microbiological parameters studied throughout all 6 spots were the following: the dynamics of the biofilm microbial communities of the river through PCR-DGGE; the quantification of the fecal contamination in different spots, by both the culture traditional method and the molecular technique of FISH; the assessment of the antimicrobial susceptibility of most isolates recovered. The isolates found to be multidrug-resistant (MDR) were genetically characterized, *E. coli* for filogroups determination and *Enterococcus* spp. for species identification.

It was possible to characterize the river water as reasonable, according to physicochemical and biological parameters, but it showed increasing fecal contamination especially from spot C to spot F. Spot F was characterized as the spot

with highest contamination level and incidence of MDR isolates, such as ESBL-producing *E. coli* and resistant *Enterococcus* spp., namely vancomycin resistant *E. faecalis* and *E. faecium.* Yet, spot D was considered the most worrisome in terms of isolates showing resistance to last-line class of antibiotics of human exclusive use, such as imipnem (IMP); in this spot IMP-resistant *E. coli* were detected.

Based on the functional groups in macroinvertebrate communities and on the fecal contamination level, it was studied the possibility of a direct relation between fecal contamination and functional feeding groups distribution. It was verified that in fact, with the contamination increase throughout time in the same spot, the filtering collectors functional groups had the tendency to increase or decrease according to the dynamics of contamination, however the organic scrapers had the tendency to decrease with the contamination along the course of the river. In the case of the filtering collectors through the river course, it was verified that the progression had no direct connection with the increase in contamination, but instead had a relation to the characteristics of each spot habitat, such as current regimes and sediment types.

After a general characterization, it was verified that the river quality diminishes as it runs further from the spring and with the increase in population density and industrial, livestock and agricultural explorations.

More specific studies in critical spots still have to be performed to better understand the microbial communities and the river water dynamics, as well as studies of the relation between fecal contamination and functional feeding groups over controlled environment.

Key-words: Ave River; Macroinvertebrates; *Enterococccus* spp.; E. coli; Functional Feeding Groups; physicochemical parameters; biological parameters; microbiological parameters; contamination; water quality.

Índice

Agradecimentos I
Resumo III
Abstract V
Capítulo I/Introdução 1
1 - Parâmetros físicos e químicos 2
2 - Parâmetros biológicos 5
3 - Parâmetros microbiológicos 8
4 - Rio Ave 10
5 - Objetivos 12
Capítulo II/Material e Métodos 13
1- Local de estudo 14
2- Locais de recolha 15
3- Recolhas de campo 22
3.1- Recolha de água e biofilme 22
3.2- Recolha de macroinvertebrados 23
3.3- Habitat 24
4- Análise de parâmetros físico-químicos em laboratório 24
5- Triagem e identificação de macroinvertebrados 25
6- Tratamento das amostras para análises microbiológicas 26
6.1- Tratamento das amostras para contagens através do método de cultura 26
6.2- FISH (fluorescence in situ hybridization) 29
7 - PCR-DGGE do biofilme do rio 31
8 - Teste de suscetibilidade antimicrobiana 33
9 - Estudo genético 33
9.1 - Extração de *E. coli* 34
9.2 - Extração de *Enterococcus* spp. 34
Capitulo III/Resultados 40
1 - Parâmetros físico-químico 41
1.1 - pH 41
1.2 - Temperatura 42
1.3 - Oxigénio 43
1.4 - Condutividade 44
1.5 - Carência Bioquímica de Oxigénio (CBO_5) 45

1.6 - Nutrientes 46
2- Macroinvertebrados 50
2.1- Percentagem de Ephemeropteras Trircopteras e Plecopteras 53
2.2- Proporção de EPT e *Chironomidae* (EPT/C) 54
2.3- Percentagem de Ephemeroptera Tricoptera e Odonata (ETO) 55
2.4- Percentagem da contribuição da família dominante ou percentagem de dominância (DF%) 56
2.5- Índice de Diversidade de Shannon-Wiener 57
2.6- Índice Uniformidade de Pielou 58
2.7- Índices IBMWP (Iberia Biological Monitoring Working Party) ASPT (Average Score Per Taxon) e IBB (Belgian Biotic Index) 59
2.8- Índice Português de invertebrados no Norte 62
2.10- Grupos funcionais alimentares. 62
3- Índice de Qualidade do Bosque da Ribeira 68
4- Parâmetros microbiológicos 69
4.1- Contagens de microrganismos totais 69
4.2- Contagens de indicadores de contaminação fecal 71
4.3- Contagens de células por FISH 90
4.4- Análise e estudo das resistências aos antimicrobianos 97
4.4.2 - Análise do perfil de resistência e identificação de *Enterococcus* spp. 113
5 - Análise da variação das comunidades bacterianas no biofilme 121
Capitulo IV/Discussão 125
4.1 – Qualidade do rio em termos físico-químicos 126
4.2 – Análise das comunidades de macroinvertebrados 127
4.3 – Qualidade do rio em termos microbiológicos 130
4.3.1 – Variação dos microrganismos totais na coluna de água e no biofilme do rio Ave 131
4.3.2 – CFUs por meio de cultura e células por FISH de indicadores de contaminação fecal 132
4.3.3 – Perfil de resistências a antibióticos e caracterização genética do filogrupo de *E.coli* e identificação das espécies de *Enterococcus* 135
4.5 – Relação das populações de macroinvertebrados e microbiológicas 139
4.6 – Qualidade da água do rio ave, de acordo com diferentes parâmetros 142
Capítulo V/Conclusão 144
Capítulo VI/Perspetivas 148
Bibliografia 151

ANEXOS I

Anexo I – Gráficos de análise de microrganismos e macroinvertebrados II

Anexo II – Tabelas dos valores máximos recomendados para os diversos parâmetros físicos, químicos e microbiológicos V

Anexo III – Equações dos índices VII

Anexo V – Water Quality Index (WQI) XXI

Anexo VI – Grupos Funcionais Alimentares XXII

Índice de Tabelas

Tabela 1: Sondas utilizadas para a técnica de FISH. 29
Tabela 2: Composição da reação para realização do PCR para o DGGE. 31
Tabela 3: Protocolo para o PCR. O touchdown corresponde a uma diminuição de 1°C por cada ciclo até chegar aos 55°C. 32
Tabela 4: Reagentes necessários para fazer o gel para a eletroforese do DGGE 32
Tabela 5:Reagentes utilizados na extração físico-química do DNA de *Enterococcus* spp..... 35
Tabela 6: Volumes utilizados para a realização das diferentes reações de PCR propostas..... 36
Tabela 7: Primers utilizados para identificação de Filogrupos. 36
Tabela 8: Protocolo para a reação de PCR para o Quadruplex e filogrupo C. Para o caso da reação do filogrupo E, só muda a temperatura de amplificação, que neste caso é de 57°C. 37
Tabela 9: Volumes utilizados nas mix de PCR dos grupos 1 e 2 38
Tabela 10: Primers utilizados para os 7 grupos para o PCR (Jackson, 2004)..... 38
Tabela 11: Concentrações de Fósforo recolhidas por ponto e por recolha e a média anual..... 49
Tabela 12: Número de indivíduos nos diferentes pontos ao longo das 3 recolhas 50
Tabela 13: Progressão dos 3 índices bióticos nas 3 recolhas nos 6 pontos. 60
Tabela 14: Progressão espácio-temporal do índice Português de invertebrados do Norte..... 62
Tabela 15: Resultados do cálculo do índice de Qualidade do Bosque da Ribeira em três recolhas. 69
Tabela 16: Tabela da pregressão espaciotemporal das contagens no biofilme em meiode cultura e em FISH para *E. coli*..... 93
Tabela 17: Testes bioquímicos realizados para identificação de *E. coli*..... 102
Tabela 18 : Perfis de resistência mais relevantes das 149 estirpes de *E.coli* que foram utilizadas para o estudo genético. *MDR: Multidrug resistant; **XDR: Extensively drug-resistant..... 104
Tabela 19: Perfis de resistência mais relevantes das 59 estirpes de *Enterococcus* sp. que foram carcaterizdas genéticamente. *MDR: multidrug-resistant; Pl: Planctónico; Bi: Biofilme..... 116
Tabela 20: Classificação RDP das bandas excisadas do gel DGGE. 122
Tabela 21: Índices de diversidade, uniformidade e abundância param o *fingerprinting* obtido por PCR-DGGE..... 123

Tabela 22: Valores máximos recomendáveis e máximos admissíveis para águas doces superficiais destinadas à produção de água de consumo humano. V
Tabela 23: Valores máximos recomendados e admissíveis águas destinadas à rega de campos agriculas.....VI
Tabela 24: Valor de referência das métricas para os diferentes tipos de rios de Portugal Continental (INAG 2009).....VII
Tabela 25: Tabela da distribuição da qualidade da água segundo o IPtIN (INAG 2009) VIII
Tabela 26: Índice de avaliação visual do habitat em rios de elevado gradiente (EPA, 1999) para avaliação da qualidade do habitat.....IX
Tabela 27: Índice de qualidade do bosque de ribeira (QBR) (munné *et al*., 1998) para avaliação do habitat. XIII
Tabela 28: Classes de qualidade da água de acordo com o QBR (MUNNÉ *et al.,* 1998) XVI
Tabela 29: Standard usada para o cálculo do índice biótico belga (IBB) (De PAUW & VANHOOREN, 1983)..... XVI
Tabela 30: Classes de qualidade da água definidas de acordo com o índice biótico belga (De PAUW & VANHOOREN, 1983) XVI
Tabela 31: Limites práticos para identificação dos indivíduos para o cálculo do IBB (De PAUW & VANHOOREN, 1983)..... XVII
Tabela 32: Cálculo do índice de qualidade biológica da água BMWP' (ALBA-TERCEDOR & SÁNCHEZ-ORTEGA, 1988) XVIII
Tabela 33: Classes de qualidade da água definidas para os rios mediterrânicos de acordo com o BMWP' (ALBA-TERCEDOR & SÁNCHEZ-ORTEGA, 1998)..... XIX
Tabela 34: Cálculo do índice de qualidade biológica da água BMWP'(Alba-Tercedor & Sánchez-Ortega, 1988)..... XX
Tabela 35: Índice de qualidade da água nos 6 pontos ao longo das 5 recolhas. XXI
Tabela 36: Classes de qualidade da água segundo os valores do WQI (Rocha *et al.,* 2015) XXI

Índice de Figuras

Figura 1: Macroinvertebrados de água doce. 5
Figura 2: Mapa do curso do rio Ave com a distribuição da população, industria, ETARs, hospitais e a rede de estradas até um rio de 100 km a partir do curso do rio (A. Martins & Mendes, 2015). 14
Figura 3:Ponto A, ponte da Parada na freguesia de Anjos, em Vieira do Minho. Como é visível pela imagem, as águas são cristalinas e o ambiente envolvente é de montanha, com rápidos baixos e pouco profundos e zonas mais calmas. 16
Figura 4: Ponto B, praia fluvial da Rola. Apesar de a água se apresentar também límpida, situa-se numa zona com alguma população e infraestruturas para servir a população. Possui vegetação aquática e diferentes tipos de sedimento. 17
Figura 5: Ponto C, Calçada de Barco, Caldas das Taipas, Guimarães. As margens foram alteradas sendo que a margem direita têm um parque de merendas com uma praia fluvial e a margem esquerda encontra-se contida por um pequeno muro de cimento. 18
Figura 6: Ponto D, Azenha Velha em Riba D'Ave. As margens não têm infraestruturas relevantes e não apresentam grandes modificações. Zona com uma população mais numerosa e com indústria envolvente. A água apresentava sempre uma cor mais acastanhada e um odor característico. 19
Figura 7: Ponto E, ponte pedonal à entrada do parque Urbano da Rabada. O sedimento é muito fino e as margens são pouco estáveis, tendo alguns blocos, a maioria deles de cimento, sem grade estabilidade. A água apresenta apenas um regime de lento profundo e apresentava-se com uma cor acastanhada. 20
Figura 8: Ponto F, ponte romana da Lagoncinha, na freguesia de Lousado, concelho de Vila Nova de Famalicão. Possui margens estáveis mas de difícil acesso, nomeadamente na margem esquerda devido à vegetação herbácea densa e alta. Na margem direita, em alturas de caudal mais baixo, apresenta apenas pequenas poças sem ligação ao caudal principal, e alguns fios de água com ligação estreita ao caudal principal. Apresenta uma cor acastanhada. 22
Figura 9: Recolha de macroinvertebrados no ponto D na primavera. Foram usadas redes de mão e caixas de plástico para guardar os sedimentos. 24
Figura 10: Imagens, a título de exemplo, tiradas nas contagens por FISH. A- *Escherichia coli* B- *Enterococcus faecalis* C- *Enterococcus faecium*..... 30
Figura 11: Variação do pH ao longo das cinco recolhas efetuadas. 41
Figura 12: Variação da temperatura ao longo do tempo..... 42
Figura 13: Progressão espácio-temporal a taxa de saturação de O_2..... 43

Figura 14: Progressão espácio-temporal do O_2 dissolvido. 44
Figura 15: Progressão espácio-temporal da condutividade. 45
Figura 16: Progressão espácio-temporal do CBO_5. 46
Figura 17: Progressão espácio-temporal da concentração de Amónia. 47
Figura 18: Progressão espácio-temporal da concentração de nitratos. 47
Figura 19: Progressão espácio-temporal da concentração de Nitritos. 48
Figura 20: Progressão espácio-temporal da concentração de Fosfatos. 49
Figura 21: Progressão espácio-temporal dos principais grupos taxonómicos identificados nas amostras 51
Figura 22: Progressão espácio-temporal da percentagem de EPT 53
Figura 23: Progressão espácio-temporal a razão EPT/C 54
Figura 24: Progressão espácio-temporal da percentagem de ETO 55
Figura 25: Progressão espácio-temporal da percentagem da família dominante 56
Figura 26: Progressão espácio-temporal do índice de Shannon-Wiener 57
Figura 27: Progressão espácio-temporal do índice de Pielou 58
Figura 28: Apresentação dos 3 gráficos circulares do ponto A e B. As iniciais que indicam os diferentes grupos funcionais representam: SH- retalhadores herbívoros, SD- retalhadores detritívoros, CF- coletores filtradores, CS- coletores detritívoros, RM- raspadores minerais, RO- raspadores orgânicos, PM- predadores mastigadores, PS- predadores sugadores, L-limívoros. 63
Figura 29: Apresentação dos 3 gráficos circulares correspondentes às 3 recolhas, nos pontos C e D. As iniciais que indicam os diferentes grupos funcionais representam: SH- retalhadores herbívoros, SD- retalhadores detritívoros, CF- coletores filtradores, CS- coletores detritívoros, RM- raspadores minerais, RO- raspadores orgânicos, PM- predadores mastigadores, PS- predadores sugadores, L-limnívoros. 64
Figura 30: Apresentação dos 3 gráficos circulares correspondentes às 3 recolhas, nos pontos E e F. As iniciais que indicam os diferentes grupos funcionais representam: SH- retalhadores herbívoros, SD- retalhadores detritívoros, CF- coletores filtradores, CS- coletores detritívoros, RM- raspadores minerais, RO- raspadores orgânicos, PM- predadores mastigadores, PS- predadores sugadores, L-limnívoros. 65
Figura 31: Progressão espácio-temporal das contagens totais de microrganismos na coluna de água. 70
Figura 32: Progressão espácio-temporal das contagens de microrganismos totais no biofilme. 71
Figura 33: Variação das contagens de *E. coli* na coluna de água no ponto A ao longo das 5 recolhas. O valor P representa a pluviosidade. 72

Figura 34: Variação da distribuição das contagens de *E. coli* no ponto B ao longo das 5 recolhas. O gráfico A corresponde à coluna de água e o B corresponde ao biofilme. 73
Figura 35: Variação da distribuição das contagens de *E. coli* no ponto C ao longo das 5 recolhas. O gráfico A corresponde à coluna de água e o B ao biofilme..... 74
Figura 36: Variação da distribuição das contagens de *E. coli* no ponto D ao longo das 5 recolhas. O gráfico A corresponde à coluna de água e o B ao biofilme..... 75
Figura 37: Variação da distribuição das contagens de *E. coli* no ponto E ao longo das 5 recolhas. O gráfico A corresponde à coluna de água e o B ao biofilme..... 77
Figura 38: Variação da distribuição das contagens de *E. coli* no ponto F ao longo das 5 recolhas. O gráfico A corresponde à coluna de água e o B ao biofilme..... 78
Figura 39: Variação da distribuição das contagens de *E. coli* em meio de TBX nos 6 pontos ao longo das 5 recolhas. O gráfico A corresponde à coluna de água e o B ao biofilme. 79
Figura 40: Variação da distribuição das contagens de *Enterococcus* spp. no ponto A ao longo das 5 recolhas. O gráfico A corresponde à coluna de água e o B ao biofilme 81
Figura 41: Variação da distribuição das contagens de *Enterococcus* spp. no ponto B ao longo das 5 recolhas. O gráfico A corresponde à coluna de água e o B ao biofilme 82
Figura 42: Variação da distribuição das contagens de *Enterococcus* spp. no ponto C ao longo das 5 recolhas. O gráfico A corresponde à coluna de água e o B ao biofilme 83
Figura 43: Variação da distribuição das contagens de *Enterococcus* spp. no ponto D ao longo das 5 recolhas. O gráfico A corresponde à coluna de água e o B ao biofilme 84
Figura 44: Variação da distribuição das contagens de *Enterococcus* spp. no ponto E ao longo das 5 recolhas. O gráfico A corresponde à coluna de água e o B ao biofilme 86
Figura 45: Variação da distribuição das contagens de *Enterococcus* spp. no ponto F ao longo das 5 recolhas. O gráfico A corresponde à coluna de água e o B ao biofilme 87
Figura 46: Variação da distribuição das contagens de *Enterococcus* spp. nos 6 pontos ao longo das 5 recolhas. O gráfico A corresponde à coluna de água e o B ao biofilme 89

Figura 47: Variação da distribuição das contagens de *E. coli*. por FISH (células/mL) no biofilme. No gráfico A estão presentes os resultados dos 6 pontos e no B estão presentes os dos pontos A, B, C, D e E. 91
Figura 48: Progressão espácio-temporal das contagens de células na coluna de água nos 6 pontos por FISH 92
Figura 49: Progressão espácio-temporal das contagens células de *E. faecium* no biofilme nos 6 pontos 94
Figura 50: Progressão espácio-temporal das contagens células de *E. faecalis* no biofilme nos 6 pontos 95
Figura 51: Progressão espácio-temporal de contagens células/mL na coluna de água para *E. faecium* e *E. faecalis*. 97
Figura 52: Perfil de resistência mais comum entre os antibiogramas analisados. Na figura A encontram-se 2 antibiogramas com resistência a AMP TE SXT e C e na B apenas ao AMP TE e SXT. Em alguns casos encontram-se resistências a outros antibióticos, mas este perfil base é muito comum. 98
Figura 53: Tipos de sinergia e antagonismo encontrados várias vezes nos antibiogramas analisados. 99
Figura 54: Perfil característico de uma ESBL (*extend spectrum β-lactamase*). 100
Figura 55: Distribuição da totalidade das *E. coli* MDR (multidrug resistant) obtidas nas 4 recolhas efetuadas nos 6 pontos estudados. 100
Figura 56: Distribuição dos isolados de *E. coli* MDR por fonte de origem e em cada ponto nas diferentes recolhas. 101
Figura 57: Antibiogramas dos isolados de XDR (A- 4/4/61) e PDR (B- 4/4/203)..... 102
Figura 58: Distribuição das resistências à CIP e ao CTX, dos 115 isolados analisados na tabela, por pontos nas diferentes recolhas efetuadas de Junho de 2014 a Fevereiro de 2015..... 109
Figura 59: Distribuição das E. coli produtoras de ESBL pelos 6 pontos nas 4 recolhas 110
Figura 60: Distribuição dos filogrupos de *E. coli* dos 149 isolados nos 6 pontos estudados durante as 4 recolhas. 112
Figura 61: Distribuição dos Enterococcus spp. MDR pelos 6 pontos analisados, nas 4 recolhas efetuadas. 114
Figura 62: Distribuição dos Enterococcus spp. MDR isolados da coluna de água e do biofilme, em cada ponto por recolha. 115
Figura 63: Distribuição dos 86 isolados com resistências à CIP e à VAN pelos diferentes pontos estudados nas diferentes recolhas efetuadas. 119

Figura 64: Distribuição por espécie dos 86 isolados de *Enterococcus* spp. longo dos 6 pontos e nas 4 recolhas efetuadas. 120
Figura 65: DGGE *fingerprinting* das amostras de biofilme dos seis pontos em três recolhas. Os números indicam as bandas excisadas e sequenciadas. 121
Figura 66: Dendograma obtido após PCR-DGGE das amostras de biofilme dos seis pontos em três recolhas por aplicação do índice de Jaccard. 122
Figura 67: Progreção espácio-temporal de contagens no biofilme e em meio de cultura de *Enterocccus* spp. no biofilme. II
Figura 68: Progreção espácio-temporal das contagens de microrganismos totals na coluna de água e no biofilme. II
Figura 69: Progressão espácio-temporal das contagens de *E. coli* por meio de cultura e por FISH, na coluna de água e no biofilme. III
Figura 70: Progressão espácio-temporal de contagens de *Enterococccus* spp. em meio de cultura e FISH, na coluna de água e no biofilme III
Figura 71: Progressão da distribuição dos grupos funcionais alimentares de macroinvertebrados nas três recolhas por cada ponto. IV

Índice de Abreviaturas

DQA – Diretiva Quadro da Água

CBO5 – Carência Bioquímica de Oxigénio

MDR – Multidrug resistant

XDR – Extremely-drug resistant

PDR – Pan-drug resistant

CFU – Colony forming unit

mL – mililitros

mm – milímetros

m – metros

Km - quilómetros

ETAR – Estação de Tratamento de Águas Residuais

IQBR – Índice de qualidade do bosque da ribeira

WQI – Índice de qualidade da água

IBB – Índice biológico Belga

BMWP- Biological monitoring working party

EPT – Ephemeroptera Plecoptera Tricoptera

ETO – Ephemeroptera Tricoptera Odonata

FISH – Fluorescent in situ Hybridization

DGGE – Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

PFGE – Pulsed-Field Gel Electrophoresis

PCR – Polymerase Chain Reaction

AMP - Ampicilina

FOX - Cefoxitina

IMP - Imipnem

CIP - Ciprofloxacina

CN - Gentamicina

F - Nitroforantoina

TE - Tetraciclina

CTX - Cefotaxime

ATM - Aztreonam

CAZ - Cefazidime

AMC – Amoxicilina/ácido clavulânico

KF - Cefalotina

AK - Amicacina

S - Estreptomicina

NA – Ácido Nalidixico

C - Cloranfenicol

TOB - Tobromicina

SXT – Sulfametoxazol/trimetoprim

K - Canamicina

QD – Quinupristina-dalfopristina

RD - Rifampicina

DO - Doxicilina

LZD - Linezolida

TEC - Teicoplanina

VA - Vancomicina

AZM - Azitromicina

E - Eritromicina

SH – Retalhadores Herbívoros

SD – Retalhadores Detritívoros

CF – Coletores Filtradores

CS – Coletores Detritívoros

RM – Raspadores Minerais

RO – Raspadores Orgânicos

PM – Predadores Mastigadores

PS – Predadores Sugadores

L – Limnívoros

Capítulo I
Introdução

Introdução

A água é um dos recursos naturais mais importantes para a sobrevivência dos seres vivos, quer de forma direta, em termos fisiológicos, quer indireta, pois é utilizada pelo homem como recurso para a obtenção de energia, indispensável para a indústria e agricultura. Este recurso tem sido explorado em grande escala ao longo dos anos, devido ao desenvolvimento da indústria e existência de grandes focos populacionais, o que culminou na perda da sua qualidade, nomeadamente dos cursos de "água doce" (Sánchez *et al*., 2007).

Face a esta realidade, a União Europeia criou uma série de diretivas sobre os limites aceitáveis de nutrientes, coliformes fecais e compostos considerados perigosos (Aubin *et al.*, 2002). No ano 2000 entrou em vigor a Diretiva Quadro da Água 2000/60/EC (DQA), com o objetivo de uniformizar o programa de monitorização dos cursos de água nos estados membros (European Commission Environment, 2000). O objetivo principal desta diretiva é consciencializar para necessidade de monitorização e conservação dos cursos de água, que devem ser vistos não como um recurso mas como um ecossistema a ser preservado. Em Portugal, o INAG (Instituto Nacional da Água), atual APA (Agência Portuguesa do Ambiente), adaptou as diretivas de monitorização de parâmetros físicos, químicos e biológicos para a realidade dos cursos de água Portugueses em 2009 (INAG, 2009), de modo a adaptar os parâmetros estipulados à realidade nacional.

Uma vez que a integridade de um ecossistema ecológico se prende com a integridade física, química e biológica deste, para analisar a qualidade de um ecossistema de qualquer massa de água seria desejável fazer um estudo simultâneo de todos estes três parâmetros essenciais (Oliveira *et al.*, 2006). Parâmetros como os físicos e químicos são de extrema importância, mas dão apenas uma noção da qualidade da água pontual, sendo que apenas apresentam um panorama do estado atual da água. Por essa razão, o estudo de parâmetros biológicos é de extrema importância para ter uma noção da evolução da qualidade do rio ao longo do tempo (Yoder *et al*., 1998).

1 - Parâmetros físicos e químicos

Valores máximos para alguns parâmetros físico-químicos já tinham sido recomendados (Goodchild, 1998) antes da elaboração da DQA pela União Europeia, tendo sido revistos nesta mesma diretiva.

Efetivamente, parâmetros físicos, como o cheiro, a cor, a turvação e os sólidos suspensos são aqueles que facilmente dão indícios sobre o estado da qualidade da água, uma vez que são aqueles que sensorialmente e empiricamente permitem fazer essa avaliação. Estes parâmetros têm efetivamente um impacto no funcionamento do ecossistema aquático. O aumento da turvação leva a uma menor penetração da luz na água, influenciando a localização e mesmo a abundância dos seres fotossintéticos, o que consequentemente condiciona a concentração de oxigénio, havendo um impacto nas comunidades constituintes do ecossistema (Bilotta, *et al*. 2008). A cor e o cheiro são parâmetros físicos que podem ser reveladores de alterações químicas na água e, portanto, sugerem a necessidade de uma análise mais pormenorizada.

São exemplos de parâmetros químicos a determinação do Oxigénio Dissolvido, Nitritos, Nitratos, Fosfatos, Amónia e a Carência Bioquímica de Oxigénio (CBO_5), uma vez que avaliam a presença de nutrientes limitantes que condicionam a diversidade de um ecossistema aquático (Harding, *et al*. 1995). O nitrato e o fosfato são dois nutrientes considerados limitantes por serem essenciais ao metabolismo dos seres vivos, mas que devem ser encontrados em concentrações baixas na água, sendo que quando são encontrados em concentrações elevadas, significa que tiveram uma origem externa ao funcionamento normal do ecossistema, o que revela perturbação na massa de água (European Environment Agency, 2012).

O oxigénio (O_2) é um dos elementos mais importantes para a existência de seres que exercem a respiração, logo é de extrema importância para comunidades de invertebrados, macrofilas, fitoplâncton, microrganismos, vertebrados e todo o ecossistema aquático. De facto, pode ser um elemento limitante podendo condicionar o desenvolvimento ou mesmo sobrevivência de qualquer elemento na fauna e flora de um local (Europian Environmente Agency, 2012). Daí que a monitorização das taxas de saturação de O_2 e da concentração de O_2 dissolvido sejam tão importantes.

O ião amónio (NH^{4+}) é libertado aquando da mineralização da matéria orgânica, dando origem por processos de oxidação, através do ciclo de azoto, a nitritos, que por sua vez vão dar origem a nitratos. O ião nitrito é um ião instável e é originado pela oxidação incompleta da amónia ou da desnitrificação incompleta do nitrato. Estes três iões, em águas pouco poluídas têm concentrações baixas, sendo que o nitrito deve estar ausente ou em quantidades residuais. A amónia pode ter concentrações baixas, mas se houver nitritos na água, a qualidade da água desce (Nisbet, *et al.* 1970). Ao contrário dos nitritos, os nitratos devem estar presentes, pois juntamente com os ortofosfatos têm um papel muito importante no desenvolvimento de macrófitas e microalgas nos ecossistemas aquáticos. É considerado muitas vezes como um nutriente limitante, uma vez que, naturalmente, a sua concentração na água é baixa.

Em águas não poluídas, os valores de nitratos podem variar entre 1 e 15 mg/L, dependendo da sazonalidade e da origem das águas, sendo que valores entre os 2 e 3 mg/L podem ser considerados normais (Nisbet *et al.*, 1970).

Tal como os nitratos, o fósforo é um nutriente que naturalmente não ocorre em grandes quantidades nos ecossistemas aquáticos, em comparação com outros macronutrientes, sendo normalmente dos primeiros nutrientes limitantes que condicionam o aumento da produtividade primária (Wetzel *et al*., 1995). As concentrações de fosfato dão também indicação do grau da poluição urbana associada a essa massa de água, assim como sobre a trofia dessa mesma massa de água, uma vez que a concentração deste fosfato provem não só da matéria orgânica como da entrada de poluentes químicos num curso de água, como adubos, descargas não tratadas de efluentes industriais e domésticos (Smil, 2000).

No caso do CBO_5 (carência bioquímica de oxigénio), calcula-se medindo a diferença entre os valores medidos *in situ*, no local de amostragem, e após incubação de 5 dias a 20°C. Esse valor vai representar o oxigénio gasto pelos microrganismos presentes na água para degradação da matéria orgânica. Quanto mais elevado for o valor de CBO_5, maior a quantidade de matéria orgânica decomposta, uma vez que foi maior o gasto de oxigénio dissolvido pelos microrganismos depuradores (European Environment Agency, 2012). Outros parâmetros importantes são o pH, temperatura e a condutividade.

O pH pode ser condicionante para a viabilidade dos seres vivos num determinado local (Van Damme *et al,.* 2008). No caso das águas superficiais, os limites estabelecidos para permitir a existência de fauna e flora num ecossistema aquático são entre pH 5.0 e 9.0. Para o caso das águas para consumo humano, o pH deve encontrar-se entre os valores de 6.5 e 8.5, mais perto do pH básico, limites estes descritos no Decreto-lei 239/1998. A monitorização do pH é importante pois pode ser um indicador de contaminações pontuais de químicos ou matéria orgânica, sendo um condicionante para a abundância de comunidades biológicas ou microbiológicas, uma vez que os níveis de tolerância dos seres vivos são muito variáveis, havendo os que se adaptam a valores de pH mais ácido/básico e outros que são pouco tolerantes a grandes oscilações de pH.

A temperatura é outro dos fatores importantes para a manutenção e distribuição das comunidades de diversas comunidades num ecossistema aquático, como macroinvertebrados e microrganismos. Esta vai influenciar os ciclos de vida (no caso dos invertebrados bentónicos, por exemplo) e a progressão e desenvolvimento dos indivíduos. Algumas famílias de macroinvertebrados iniciam a sua reprodução com a alteração da temperatura, quer aumento quer diminuição. A dinâmica térmica

da água vai ter um papel extremamente importante na abundância e distribuição das diferentes famílias de macroinvertebrados (Fontoura, 1989). Em relação às comunidades microbianas, na generalidade as bactérias têm uma temperatura ótima de crescimento de 37°C. Assim sendo, o meio aquático não apresenta normalmente a temperatura ideal para esses microrganismos, que no entanto se conseguem adaptar perfeitamente, aí sobrevivendo e proliferando.

A condutividade é um parâmetro que está relacionado diretamente com a contaminação de um curso de água. Quanto maior a condutividade, maior o nível de contaminação. Os níveis de condutividade base/referência para sistemas pristinos não são todos iguais devido às diferentes características geológicas do sedimento originário do leito do rio e outros fatores que terão de ser tidos em conta (INAG, 2009).

2 - Parâmetros biológicos

Um dos parâmetros biológicos mais usados para a análise da qualidade da água é o estudo das comunidades de macroinvertebrados (Sharma *et al.*, 2009). Este estudo é feito com recurso à recolha de invertebrados bentónicos e à sua identificação em grupos taxonómicos (INAG, 2008). A sua identificação permite calcular índices de diversidade, uniformidade e abundância de uma comunidade de macroinvertebrados, como por exemplo o de Shannon-Weaver, Simpson ou Pielou (Beisel *et al*., 2003). Permitem também o cálculo de outros índices bióticos atribuindo um valor de tolerância à poluição a diferentes famílias de macroinvertebrados.

Figura 1: Macroinvertebrados de água doce.

Segundo Azrina *et al*. (2006), quanto maior é a diversidade de uma comunidade e a uniformidade das diferentes famílias que constituem essa mesma comunidade de

macroinvertebrados, maior é a qualidade da água, uma vez que uma comunidade que não esteja sujeita a variações externas, teoricamente terá uma grande variedade de grupos taxonómicos e terá uma distribuição uniforme de indivíduos pelos diferentes grupos taxonómicos. Apesar desta consideração, alguns grupos taxonómicos são mais comuns em locais degradados e outros mais comuns em locais com melhores condições. Os Oligochaetas e muitas famílias de Dípteros, por exemplo, são resistentes à poluição, enquanto que os Ephemeroptera, são indicadores de boa qualidade da água, assim como os Tricoptera e os Plecoptera. Para estes três grupos mais sensíveis foram elaborados índices que estudam a abundância destas ordens taxonómicas dentro de uma comunidade, assumindo que quanto maior a taxa de Ephemeroptera, Tricoptera e Plecoptera maior a qualidade da água (Nedeau *et al.*, 2003). De facto, algumas famílias de Ephemeroptera são mais resistentes á poluição que outras, como é o caso das *Baetidae* e *Caenidae*, que são frequentemente encontradas em zonas com uma baixa qualidade da água (Mandaville, 1993). Por esta razão, é importante analisar e identificar os indivíduos até pelo menos à família. Alba-Tercedor e Sánchez-Ortega (1986) sugeriram a adaptação do índice BMWP (Biological Monitoring Working Party), proposto por Hellawell em 1978, às massas de água e às famílias de invertebrados bentónicos identificados na Península Ibérica, partindo do pressuposto que uma massa de água com boa qualidade teria uma maior diversidade de famílias. Este índice atribui uma pontuação de 1 a 10 valores às diferentes famílias de macroinvertebrados, consoante a sua resistência à poluição. O problema deste índice é o facto de poder sofrer um enviesamento no caso de recolhas com um número muito baixo ou muito elevado de indivíduos identificados. Para prevenir este enviesamento, associado a este índice calcula-se o ASPT (Average Score Per Taxon), que vai ser a média dos BMWP segundo o número de taxa identificado (Zamora-Muñoz, 1995).

Apesar da importância dos parâmetros físico-químicos, o fator habitat pode ser determinante para a presença/ausência ou abundância de diferentes ordens ou famílias de macroinvertebrados (Marques *et al*., 1999). Por esta razão foi sugerido a elaboração de um índice de qualidade da zona ripária, Índice de Qualidade do Bosque da Ribeira (QBR) (Munné *et al*., 2003). Este índice analisa a qualidade do corredor ripário, das alterações das margens, dos sedimentos e a existência de espécies invasoras de flora.

O substrato pode também ser determinante para a distribuição dos macroinvertebrados, uma vez que um substrato com abundância de matéria orgânica e com sedimento mais arenoso e com calhaus, que permitem a existência de abrigos para os invertebrados, terão uma maior abundância e diversidade de indivíduos

(Carvalho *et al.*, 2004). De facto, quanto mais lamacento e fino for o sedimento, menos diversidade haverá dentro das comunidades, sendo que ordens como os Oligochaetas e famílias de Dípteros, como os *Chironomidae,* considerados oportunistas por se adaptarem a sedimentos mais arenosos e lamacentos, serão encontrados em maior abundância. O substrato é importante também para o estudo dos grupos funcionais alimentares.

Como grupos funcionais alimentares entende-se a tipologia alimentar dos diferentes grupos de macroinvertebrados. Estudos feitos revelam que a distribuição dos grupos funcionais alimentares está intimamente ligado com as condições do habitat, os regimes hidromorfológicos e a disponibilidade de alimento (Gamito *et al.*, 2009). Usseglio-Polatera *et al.* (2000) defende a existência de 7 grupos funcionais alimentares: predadores, filtradores, raspadores, detritívoros, trituradores, parasitas, e furadores, enquanto que Jesus (2001) apresenta uma distribuição em 9 grupos funcionais alimentares: retalhadores herbívoros, retalhadores detritívoros, coletores filtradores, coletores detritívoros, raspadores minerais, raspadores orgânicos, predadores mastigadores, predadores sugadores e limnívoros.

Relacionando com o habitat, a densidade da canópia e do tipo de árvores que rodeiam o leito do rio, assim como a composição das suas margens e a alteração do estado natural dessas mesmas margens, são fatores que vão afetar grandemente a capacidade de fixação de alguns grupos funcionais em determinados locais. O tipo de sedimento vai ser determinante, uma vez que os retalhadores, quer herbívoros quer detritívoros, se alimentam de partículas com uma dimensão superior a 10^3 μm, designado por CPOM (matéria orgânica particulada grosseira) enquanto os coletores e raspadores se alimentam de partículas com dimensões inferiores a 10^3 μm, designada por FPOM (matéria orgânica particulada fina). Os retalhadores vão ser mais abundantes em zonas de cabeceira do leito do curso de água e em locais com corredor ripário e floresta envolvente de folha caduca e uma canópia densa, enquanto que os coletores e raspadores são mais comuns em locais com uma canópia mais aberta. O regime hídrico a que se adaptam também vai ser diferente, visto que os coletores filtradores, por exemplo, são comummente encontrados em zonas de rápidos, onde têm maior disponibilidade de alimento, beneficiando também da velocidade da corrente, enquanto os coletores detritívoros e os raspadores são mais frequentemente encontrados em zonas de lentos pouco profundos, como poças (Chung *et al*., 2012).

A distribuição destes grupos funcionais alimentares, e mesmo de toda a estrutura das comunidades pode ser alterada com a alteração quer natural, quer

antrópica do leito de um curso de água. Ogbeibu & Oribhabor (2002) estudaram o impacto de um emparedamento de um troço de um rio na Nigéria e verificaram que, de facto, em poucos metros de distância entre um local antes e outro no emparedamento, havia uma alteração drástica nas comunidades, não só pelo facto de as margens terem sido alteradas quanto ao seu sedimento, mas devido à diminuição da velocidade da corrente e aumento do caudal.

As comunidades de macroinvertebrados, sendo o elo central da cadeia trófica de um ecossistema aquático, são um importante indicador de contaminações por matéria orgânica e um importante limitador para o desenvolvimento da ictiofauna.

3 - Parâmetros microbiológicos

O levantamento da dinâmica microbiana de um determinado curso de água é também muito importante. Os microrganismos presentes num curso de água são os responsáveis por processos de decomposição, intervindo nos ciclos biogeoquímicos de extrema importância para a manutenção de um ecossistema aquático, tendo um papel importante na cadeia trófica destes ecossistemas (Beier et al., 2008).

Alguns problemas têm sido detetados com alguns géneros de bactérias em cursos de água, tanto para a saúde pública como para a própria manutenção dos ecossistemas, como os *blooms* de cianobactérias (Saker et al., 2003). Outro caso preocupante para a saúde pública é a crescente identificação e quantificação de coliformes nos cursos de água. Esta crescente contaminação deve-se fundamentalmente à descarga de efluentes urbanos, agrícolas e industriais para os cursos de água (Canosa *et al.*, 1999).

Os indicadores de contaminação mais utilizados na avaliação da qualidade da água, por serem os principais indicadores de contaminação fecal, são os *Enterococcus* spp. e *Escherichia coli*. Ambos são bactérias comensais da flora gastrointestinal quer humana quer animal. Atualmente, um problema acrescido e relacionado com estes dois géneros é a sua capacidade de adquirir facilmente resistências a antibióticos (da Costa *et al*., 2007).

Sendo bactérias comensais da flora gastrointestinal humana e animal, o meio aquático não é de todo o meio mais propício para estas se manterem e desenvolverem, sendo que a sua presença neste ambiente, portanto, é um indicativo de que há fontes de contaminação que as introduzem continuamente no meio aquático. Estas bactérias têm também a capacidade de se integrar nos biofilmes aquáticos, sendo a sua dinâmica no biofilme ligeiramente diferente. No biofilme se encontram diferentes tipos de bactérias que interagem, criando simbioses que

possibilitam a sobrevivência e proliferação de algumas que de outro modo estariam mais desprotegidas e portanto menos adaptadas, como o caso destas bactérias comensais (Kjelleberg *et al.*, 2002). Para a quantificação destes dois géneros de coliformes, quer na coluna de água quer no biofilme pode usar-se a técnica tradicional por meio de cultura ou técnicas baseadas em métodos moleculares, como a técnica de FISH (Flourescence *In Situ* Hibridization).

As contagens em meio de cultura dão os números de CFUs (*colony forming unit*) das bactérias que são cultiváveis (crescem *in vitro* nos meios de cultura). No entanto, grandes partes das bactérias encontradas no ambiente, como por exemplo, em meio aquático, não são cultiváveis (Pernthaler *et al*., 2001). No caso destes dois géneros, *E. coli* e *Enterococcus* spp., estas bactérias estão descritas como sendo facilmente cultiváveis. Contudo, a proliferação de uma bactéria no meio de cultura pressupõe que esta se encontre em ótimas condições de viabilidade e que não esteja a ser afetada pela presença de outras bactérias ou fatores de inibição, sendo que, estão sujeitas a estas condições, se encontram num estado viável mas não cultivável (VBNC) (Oliver, 2005) . A técnica de FISH tem como vantagem o facto de permitir identificar mesmo as bactérias menos adaptadas, as sujeitas a fatores de stress, num menor espaço de tempo. Esta técnica usa sondas oligonucleotidicas específicas para um segmento de rRNA específico da espécie em questão, e marcadas com fluorocromos (Ainsworth *et al.*, 2006).

O problema das resistências a antibióticos tem vindo a crescer ao longo dos anos, devido a uma utilização abundante e desregrada de antibióticos na medicina humana e veterinária (Jindal *et al.*, 2006). Esta incidência deve-se também fortemente fomentado devido ao uso dos mesmos para favorecer o crescimento e desenvolvimento dos animais, como bovinos, suínos, caprinos, galinhas, entre outros (Kümmerer, 2009). Apesar de atualmente ser proibida a utilização de antibióticos como promotores de crescimento, a sua disseminação por diferentes habitats tomou proporções muito relevantes e mesmo graves para a saúde pública (da Costa *et al.*, 2013). Devido a estes factos, e à grande capacidade mutagénica e de transferência horizontal de genes que as bactérias possuem, têm sido relatados cada vez mais casos de bactérias multirresistentes com capacidade de persistir à ação de diversas classes de antibióticos (Schjørring *et al.*, 2008).

A principal fonte de antibióticos em meio aquático são os efluentes tratados das ETARs, que recebem os efluentes hospitalares juntamente com efluentes urbanos. A junção destes efluentes facilita que as bactérias existentes nos tanques de tratamento adquiram resistências aos antibióticos que entram nestes tanques (Amador *et al.*,

2011). Há evidências de que as ETARs não estão preparadas para tratar e eliminar compostos como os antibióticos (Le-Minh *et al.*, 2010), pelo que, apesar dos crescentes esforços, a capacidade de remoção dos antibióticos dos efluentes continua muito baixa. Acresce que muitos dos antibióticos que são libertados para o meio aquático têm ações tóxicas e genotóxicas (Isidori *et al*., 2005) para vários grupos tróficos no ecossistema aquático, como algas, dáfnias e peixes (Santos *et al.*, 2013).

No caso especifico das *E. coli* e dos *Enterococcus* spp., têm sido identificadas estirpes resistentes e multirresistentes a antibióticos de uma forma global no ambiente (Enayati *et al.*, 2015; Blaak *et al*., 2015). Sendo que os *Enterococcus* spp. são uma importante fonte de infeções nosocomiais em hospitais, o facto de se verificar uma crescente multirresistência a antibióticos por parte deste género de bactérias, compromete a capacidade de tratamento dessas infeções (Martins da Costa *et al.*, 2006). Para as *E. coli*, tal como para os *Enterococcus* spp., a prevalência de estirpes multirresistentes a nível global, é cada vez mais preocupante, sendo que no caso das *Enterobactereaceae*, se observa também a rápida transmissão de genes de resistência entre bactérias (*Klebsiella pneumoniae* e *E. coli*, por exemplo), nomeadamente genes que conferem resistência aos β-lactâmicos e às fluoroquinolonas, não só em meio aquático como em meio hospitalar (Mesa *et al.*, 2006).

4 - Rio Ave

Este trabalho centra-se num curso de água de médias dimensões no Norte de Portugal, Rio Ave, com uma bacia hidrográfica de 1 390 km^2 com uma área de drenagem de 145 Km^2, estando integrado nos rios do Norte de Média-Grande dimensão (APA, 2012a), com uma pluviosidade que varia entre 900 e 3.900 mm^3/ano. Esta bacia hidrográfica é constituída pelos concelhos de Barcelos, Braga, Cabeceiras de Basto, Celorico de Basto, Fafe, Felgueiras, Guimarães, Lousada, Maia, Montalegre, Paços de Ferreira, Póvoa do Lanhoso, Póvoa de Varzim, Santo Tirso, Trofa, Vieira do Minho, Vila do Conde, Vila Nova de Famalicão e Vizela. Os concelhos que têm uma interferência mais próxima e direta com o rio são Barcelos, Braga, Fafe, Lousada, Póvoa do Lanhoso, Santo Tirso, Trofa, Vieira do Minho, Vila Nova de Famalicão, Vizela e Vila do Conde (ARH-Norte, 2000)

Segundo dados do Instituto Nacional de Estatística (INE), os concelhos de Vieira do Minho, Povoa do Lanhoso, Fafe, Guimarães, Vizela e Vila Nova de Famalicão, albergavam em 2010 uma população de 414 818 habitantes, e no concelho de Santo Tirso de 68.745 habitantes. Os concelhos de Guimarães, Braga e Vila Nova de

Famalicão são os mais significativos em termos populacionais da bacia hidrográfica do Ave. Segundo o Plano de Gestão Hidrográfica do Cavado, Ave e Leça, feito em 2012 (APAb, 2012), são os 3 concelhos mais populosos tendo uma densidade populacional de 162 631 habitantes, 104 876 habitantes e 134 963 habitantes, respetivamente.

A margem do rio apresenta um solo solto, ou seja, formado a partir da erosão de substratos rochosos pelos agentes erosivos, o que favorece o arrasto de sedimentos e contaminantes agrícolas para o rio nos dias de chuva intensa. Ao longo do curso do rio, da nascente até perto de Guimarães, os terrenos das margens são essencialmente ocupados pela atividade agrícola. A partir deste concelho verifica-se uma alteração marcada para atividades industriais, havendo um claro predomínio de indústria têxtil. Existe também um elevado número de indústrias na área do papel, curtumes, madeiras, fundição mecânica e cutelaria, assim como várias explorações agrícolas e pecuárias (ARH Norte, 2000).

Ao longo do curso do rio estudado, desde a nascente até à freguesia de Lousado, concelho de Vila Nova de Famalicão, existem 3 ETARs principais em pleno funcionamento, duas das quais sofreram recentemente obras de amplificação para melhor responder às necessidades da população e da indústria, das quais recebem os efluentes urbanos e industriais. Estas mesmas ETARs também recebem efluentes hospitalares de concelhos como Guimarães, Riba D'Ave, Santo Tirso e Vila Nova de Famalicão. No concelho de Santo Tirso, mesmo nas margens do rio, situa-se uma escola profissional agrícola que tem um canal que atravessa os campos agrícolas até ao caudal principal do rio.

Existem, no curso do rio, efluentes que são encaminhados diretamente para o rio, sem passar por um tratamento, que são visíveis para quem observa as margens do rio, mas estas descargas não estão reportadas, no entanto, notam-se claramente pelas condições da água do rio onde foram efetuadas, não sendo possível saber nem a origem nem a composição exata (Costa, 2008). Estas descargas comprometem grandemente a qualidade da água do rio.

Este rio foi considerado um dos rios mais poluídos de Portugal e da Europa (Soares *et al.*, 1999). Esta condição do rio agravou-se na década de 80, levando à criação de um sistema integrado de despoluição do Vale do Ave (SIDVA) em finais de 1991 (ARH-Norte, 2000), com o objetivo de despoluir e levar a qualidade do rio ao estado ecológico de "bom", foi feita a monitorização dos efluentes descarregados para o rio e a criação de estações de tratamento de águas residuais (ETARs) de forma a tratar os efluentes antes de serem integrados no curso do rio. Apesar disso, foi-lhe atribuído em 2010 o estado ecológico da água como "medíocre" (APAc, 2012).

5 - Objetivos

O objetivo principal deste trabalho foi obter um panorama geral da qualidade da água do rio, analisando parâmetros físico-químicos, biológicos e microbiológicos, de modo a realçar a importância da abordagem multidisciplinar na análise da qualidade de um ecossistema aquático.

Outro dos objetivos foi perceber como variam as comunidades, quer de macroinvertebrados quer de microrganismos, espacialmente e temporalmente e ao longo do curso do rio.

Utilizando os principais géneros bacteriológicos indicadores de contaminação fecal, *Enterococcus* spp. e *E. coli*, pretendeu-se identificar os locais mais críticos a nível de contaminação e perceber qual a resposta das comunidades de macroinvertebrados às variações dessa mesma contaminação ao longo do tempo e do espaço (variação dos grupos funcionais ao longo do tempo e espaço).

Por fim, pretendeu-se analisar a existência/ausência e abundância de resistências a antibióticos por parte dos géneros bacterianos estudados, uma vez que a emergência e disseminação de resistências aos antibióticos é um problema que se tem intensificado a nível global e em todos os tipos de ambientes. Devido a isto também se considerou como objetivo identificar os pontos do rio com maiores níveis de contaminação e incidência de multirresistências.

Capítulo II
Material e Métodos

Material e Métodos

1- Local de estudo

O rio Ave, situado no Norte de Portugal, tem um curso com 85 km desde a nascente (a uma altitude de 1260 m) na Serra da Cabreira, até ao sul de Vila do Conde, onde desagua no Oceano Atlântico (Agência Portuguesa do Ambiente, 2015). O rio atravessa várias cidades, portanto uma região densamente povoada.

O rio Ave tem como principais efluentes o rio Vizela, no concelho de Vizela, que drena 342 Km^2 e o rio Este, no concelho de Vila Nova de Famalicão, que drena 247 Km^2.

Seis pontos ao longo de toda a extensão do rio (**fig. 2**) foram selecionados para este estudo, e serão descritos em seguida.

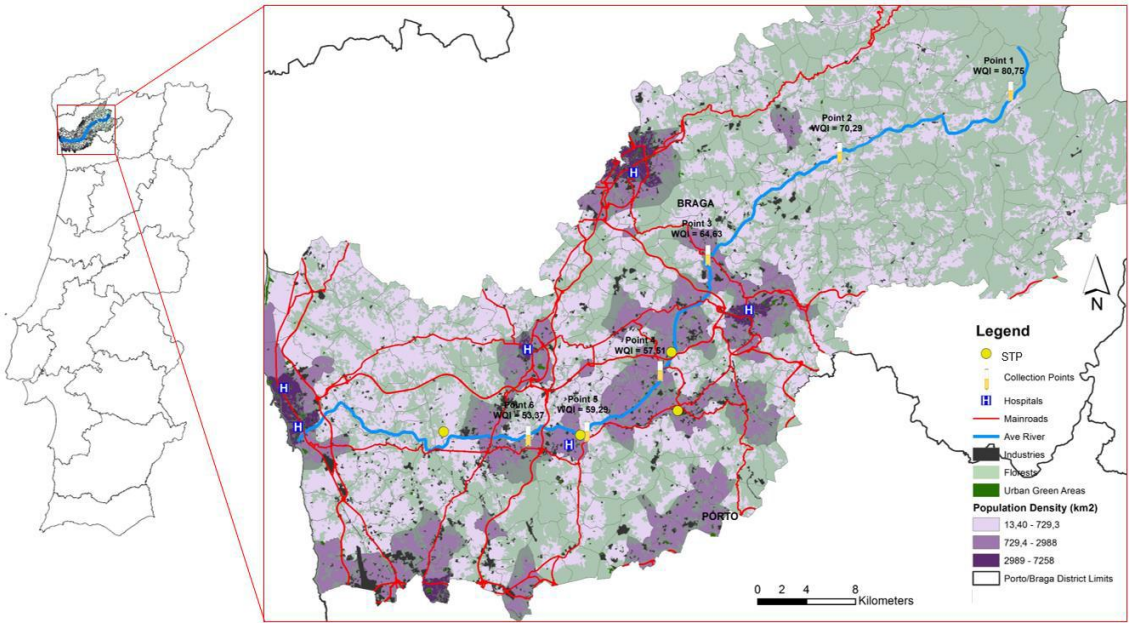


Figura 2: Mapa do curso do Rio Ave com a distribuição da população, industria, ETARs, hospitais e a rede de estradas até um rio de 100 km a partir do curso do rio (A. Martins & Mendes, 2015).

No total, em cada um dos seis pontos, foram realizadas 5 recolhas ao longo de um ano (Junho de 2014, Setembro de 2014, Novembro de 2014, Fevereiro de 2015 e Maio de 2015). Na recolha 5 não se recolheu biofilme nem se fez análises de isolados a suscetibilidades a antibióticos.

2- Locais de recolha

Foram selecionados 6 pontos para análise, apesar de não serem equidistantes, estão dispersos ao longo do troço do rio estudado e foram escolhidos principalmente devido à sua localização, à proximidade de ETARs e à entrada dos principais efluentes do rio Ave, nomeadamente o rio Vizela e o rio Selho. Além disso, estes pontos diferem também substancialmente na densidade populacional que os circundam. Os pontos de recolha foram:

- ✓ Ponto A - Ponte da Parada, Agra, Vieira do Minho - 41º 36' 11.06"N-8º2'54.72" W
- ✓ Ponto B - Praia Fluvial da Rola, Arosa, Guimarães - 41º 33' 28.36"N-8º 12' 58.68"W
- ✓ Ponto C - Calçada de Barco, Caldas das Taipas, Guimarães - 41º 28'54.23"N-8º20'40.78"W
- ✓ Ponto D - Azenha Velha, Riba D'Ave, Vila Nova de Famalicão - 41º 23' 49.00"N-8º 23' 28.73"W
- ✓ Ponto E - Parque Urbano da Rabada, Burgães, Santo Tirso -41º 21' 7.74"N-8º 27' 46.12"W
- ✓ Ponto F - Ponte da Lagoncinha, Lousado, Vila Nova de Famalicão - 41º 20' 56.65"N-8º 31' 12.02"W

1. O ponto A (**fig. 3**) é o mais próximo da nascente, uma zona montanhosa sem grande influência antropogénica, na qual a maior parte do sustento provém ainda de uma agricultura de subsistência com algumas cabeças de gado caprino e bovino. É considerado o ponto base, sendo um local pristino em que a água se apresenta com características típicas de locais não alterados e em estado selvagem. O sedimento era arenoso grosso, com pedras roladas de pequenas e grandes dimensões.

Figura 3:Ponto A, ponte da Parada na freguesia de Anjos, em Vieira do Minho. Como é visível pela imagem, as águas são cristalinas e o ambiente envolvente é de montanha, com rápidos baixos e pouco profundos e zonas mais calmas.

2. O ponto B (**fig. 4**) localiza-se a seguir a duas barragens, sendo que a primeira grande barragem no rio é a Barragem de Ermal-Guilhofrei, na freguesia de Guilhofrei, em Vieira do Minho, uma barragem de tipo gravidade, com 49 m de altura e 190 m de largura no coronamento, e a segunda, mais pequena, a Barragem de Andorinhas, em Travassos, Fafe, barragem também do tipo gravidade, com uma altura de 24 m e comprimento de 107 m no coronamento. Estudos feitos sobre albufeiras em outros cursos de água mostram que há uma perda da qualidade da água que sai da barragem devido ao facto de ficar armazenada durante longos períodos de tempo. O ponto foi escolhido por se encontrar após estas duas barragens principais. O local é utilizado como praia fluvial, praia fluvial da Rola, com uma ponte pedonal entre as duas margens. Tem um sistema de descargas ocasionais de água do rio que é desviada do caudal principal na barragem de Andorinhas. O sedimento é arenoso e com pedras roladas. Possui vegetação aquática diversificada e abundante.

Figura 4: Ponto B, praia fluvial da Rola. Apesar de a água se apresentar também límpida, situa-se numa zona com alguma população e infraestruturas para servir a mesma. Possui vegetação aquática e diferentes tipos de sedimento.

3. O ponto C (**fig. 5**) fica no que se pode considerar o início do grande foco populacional. Localizando-se em Caldas das Taipas, encontra-se à entrada de Guimarães, que se pode considerar a primeira grande cidade nas margens do rio. A água neste local apresenta já alguma turvação e uma corrente fraca e muito estagnada. Quanto à zona ripária envolvente apresenta várias infraestruturas construídas nas duas margens, como um parque de lazer na margem direita, uma ponte que suporta a Nacional 101, uma ponte pedonal donde foram efetuadas as recolhas e um parque de merendas na margem esquerda mais a montante do local de recolha. Na margem esquerda a jusante do ponto de recolha as margens encontram-se envoltas em mato rasteiro, predominantemente silvas. Apresentava uma praia fluvial na margem direita, sendo este o único acesso que permitiu, a alguns metros mais para dentro do rio, fazer as recolhas. O sedimento é arenoso e fino e com aspeto lamacento.

Figura 5: Ponto C, Calçada de Barco, Caldas das Taipas, Guimarães. As margens foram alteradas sendo que a margem direita têm um parque de merendas com uma praia fluvial e a margem esquerda encontra-se contida por um pequeno muro de cimento.

4. O ponto D (**fig. 6**) situa-se alguns quilómetros a jusante da ETAR de Serzedelo. Esta ETAR tem uma capacidade de 15.800 m^3/dia, num total de 100.800 habitantes equivalentes. Em 2004 foi feito um estudo de impacto ("Estudo para a Construção, Ampliação e Beneficiação das ETARs de Serzedo, de Lordelo/Aves, de Serzedelo, de Rabada e de Agra" (DHVFBO, 2004)) e verificou-se que a ETAR estava a operar em sobrecarga, uma vez que recebia 25.099m^3/dia, num total de 142.013 habitantes equivalentes. Por essa razão em 2004 lançou-se um projeto para amplificação da ETAR, sendo inaugurada em 2011. A estação Serzedelo II tem uma capacidade de 25.577m^3/dia, num total de 170.513 habitantes equivalentes. Esta ETAR serve parte do concelho de Guimarães, onde se localiza. Possui como rede de sistema de tratamento de efluentes, tratamento preliminar (remoção de sólidos grosseiros, areias e gorduras), tratamento biológico por lamas ativadas e tratamento terciário, para remoção do CQO residual e da cor. A montante deste ponto encontra-se um importante foco industrial de têxteis, curtumes e siderurgias. Ficando localizado imediatamente abaixo da Cooperativa de Ensino Didáxis de Riba D'Ave, é utilizada como zona de pesca desportiva. A nível das margens tem muito poucas alterações antropogénicas, tendo as recolhas sido efetuadas perto do açude. Possui uma grande

diversidade de flora envolvente, grande parte dela autóctone, sendo que o rio apresenta diferentes tipos de sedimento, desde calhaus rolados a sedimento fino. Apresentava vários regimes de corrente, baixos rápidos, baixos lentos, fundos rápidos e fundos lentos. As margens eram povoadas por vegetação aquática, tendo uma aglomerado de juncos.

Figura 6: Ponto D, Azenha Velha em Riba D'Ave. As margens não têm infraestruturas relevantes e não apresentam grandes modificações. Zona com uma população mais numerosa e com indústria envolvente. A água apresentava sempre uma cor mais acastanhada e um odor característico.

5. O ponto E (**fig. 7**) fica imediatamente a seguir ao parque urbano da Rabada, Burgães, no concelho de Santo Tirso. Este parque urbano tem uma zona dedicada a pesca lúdica e desportiva. Poucos metros mais a frente fica a ETAR da Rabada. Este ponto foi escolhido por se encontrar depois da entrada no caudal principal do rio, de um dos efluentes mais poluídos do Rio Ave, o Rio Vizela. A montante deste ponto, continua a haver uma intensa atividade Industrial, com algumas explorações agrícolas de médias dimensões e alguns matadouros e explorações pecuárias. As recolhas foram feitas debaixo da ponte do passeio pedonal que atravessa o rio. Este local foi escolhido por ser após o parque urbano e por se situar numa zona muito populosa, ficando situada mais ou menos à entrada da cidade de Santo Tirso. As margens deste local encontram-se muito alteradas, com margens sem corredor ripário do lado

esquerdo do curso do rio, e do lado direito a vegetação que existe é essencialmente baseada em arbustos baixos e silvado. Nas duas margens, o rio é contido por dois pequenos muros de pedra. O sedimento deste local é constituído unicamente por pedras de grande porte e sedimento muito fino. A recolha neste ponto foi feita diretamente a partir da margem uma vez que esta não apresentava uma descida progressiva, sendo que era constituída por blocos de pedra que desapareciam a menos de um metro da margem.

Figura 7: Ponto E, ponte pedonal à entrada do parque Urbano da Rabada. O sedimento é muito fino e as margens são pouco estáveis, tendo alguns blocos, a maioria deles de cimento, sem grade estabilidade. A água apresenta apenas um regime de lento profundo e apresentava-se com uma cor acastanhada.

6. O ponto F (**fig. 8**) situa-se no limite entre o concelho de Santo Tirso e Vila Nova de Famalicão. As recolhas foram efetuadas nas margens da ponte da Lagoncinha, uma ponte romana no concelho de Lousado. Este ponto, apesar da sua proximidade geográfica com o ponto E, cerca de 4 km de distância, foi escolhido por se encontrar a jusante da ETAR da Rabada e da Escola Profissional Agrícola Conde São Bento, escola essa que possui alguns hectares de exploração agrícola e pecuária e que tem um canal de drenagem para o Rio. A ETAR da Rabada está dimensionada para servir uma população de cerca de 168 mil habitantes equivalentes, o que equivale ao tratamento de cerca de 24.884m^3/dia de águas residuais. Possui como rede de

sistema de tratamento de efluentes, tratamento preliminar (remoção de sólidos grosseiros, areias e gorduras), tratamento biológico por lamas ativadas e tratamento terciário, para remoção do CQO residual e da cor. Em redor deste ponto, e alguns metros a montante, fica a zona industrial da Várzea do Monte. As margens a montante eram pontuadas por alguns terrenos agrícolas de pequenas dimensões, a maior parte domésticos. O corredor ripário é em muitos locais contido por muros que protegem os campos agrícolas das margens do rio. A montante, perto da estação ferroviária de Santo Tirso são visíveis algumas descargas diretas para o rio de água pluviais. A recolha não pôde ser feita sempre na mesma margem, sendo que a primeira e a quinta foram feitas na margem esquerda e as restantes foram feitas na margem direita, uma vez que a margem esquerda se encontrava inacessível e no caso da recolha 3, estava inundada. Devido à descida gradual das margens foi possível fazer as recolhas alguns metros para dentro do caudal do rio, uma vez que as margens e o sedimento assim o permitiam. Mais uma vez, havia uma grande diversidade de sedimento, não tendo, no entanto, o sedimento fino característico do ponto E. O corredor ripário existia, embora não em grande abundância, mas o existente era essencialmente constituído por carvalhos, na margem direita. A esquerda era contida por muros e com uma vegetação rasteira e arbustiva. Apresentava vários regimes de corrente, baixos rápidos, baixos lentos, fundos rápidos e fundos lentos. Aquando de baixo caudal, eram visíveis plantas aquáticas nas zonas mais baixas e em redor dos pilares da ponte. Apresentava uma ilha de grandes dimensões onde só crescia vegetação, essencialmente autóctone.

Figura 8: Ponto F, ponte romana da Lagoncinha, na freguesia de Lousado, concelho de Vila Nova de Famalicão. Possui margens estáveis mas de difícil acesso, nomeadamente na margem esquerda devido à vegetação herbácea densa e alta. Na margem direita, em alturas de caudal mais baixo, apresenta apenas pequenas poças sem ligação ao caudal principal, e alguns fios de água com ligação estreita ao caudal principal. Apresenta uma cor acastanhada.

3- Recolhas de campo

Para a realização destas recolhas foi usada uma sonda multiparamétrica para pH/ORP, EC, OD (Hanna Instruments) para recolher alguns parâmetros físico-químicos *in situ*. Com este equipamento fez-se um levantamento de parâmetros como pH, condutividade, temperatura, sólidos suspensos, percentagem de oxigénio dissolvido, concentração oxigénio dissolvido.

3.1- Recolha de água e biofilme

No campo, em cada um dos pontos recolheu-se água para 2 frasco Schott de 1000 mL previamente autoclavados para posterior análise microbiológica. Recolheu-se biofilme de pedras para um frasco estéril de plástico. Foi recolhida água para uma garrafa de 1 L de plástico de água mineral, para posterior análise físico-química. Estas amostras de água foram recolhidas o mais longe possível da margem para não ter interferência de sedimentos das margens. Na recolha do biofilme, utilizou-se escovas de dentes duras para raspar o biofilme de 4 a 6 pedras para o frasco e adicionou-se água autoclavada até perfazer um volume de 30 mL. A superfície da pedra raspada era medida com o auxílio de uma régua, sendo pedra devolvida ao rio. Todas as

amostras foram conservadas durante o transporte para o laboratório (onde ficaram a 4°C até ao dia seguinte) em malas térmicas refrigeradas e ao abrigo da luz.

3.2- Recolha de macroinvertebrados

O protocolo para a recolha de macroinvertebrados (**fig. 9**), baseou-se no *Manual para a avaliação biológica da qualidade de água em sistemas fluviais segundo a Diretiva Quadro da Água: Protocolo de amostragem e análise para os macroinvertebrados* elaborado pelo INAG (2008) para dar resposta às novas exigências de monitorização de parâmetros biológicos pela Diretiva Quadro da Água.

Segundo este protocolo, recorreu-se à utilização de redes de mão com uma malha de 0.5 mm de diâmetro, suportadas por uma armação metálica com largura de 25 cm. Esta rede possui uma borda inferior metálica de forma a permitir raspar os locais mais rochosos. Como objetivo de obter uma amostra representativa do ponto em estudo, esta recolha foi feita com 6 arrastos em diferentes habitats existentes, assim como diferentes tipos de sedimento, quando os havia, e de diferentes regimes de corrente no ponto em análise, de forma a representar toda a estação da recolha.

A rede foi deslocada de jusante para montante, contra o sentido da corrente do rio, em posição vertical e junto ao fundo, levantando o sedimento e desalojando os seres bentónicos para seres recolhidos pela rede. No caso de substrato rochoso, as rochas foram raspadas com a parte metálica da rede de forma a conseguir a suspensão dos seres bentónicos, para estes poderem ser recolhidos.

As amostras recolhidas destes 6 arrastos foram todas colocadas na mesma caixa plástico com um bocado de água, vedada e devidamente identificada. Uma vez no laboratório, o substrato foi fixado e conservado em álcool a 96% para posteriormente se proceder à triagem e identificação dos macroinvertebrados.

Figura 9: Recolha de macroinvertebrados no ponto D na primavera. Foram usadas redes de mão e caixas de plástico para guardar os sedimentos.

3.3- Habitat

Foi feito um levantamento observacional de cada um dos pontos para melhor os caracterizar e analisar segundo habitat para determinados seres bentónicos. A firmeza do substrato, deposição de sedimentos, regimes de velocidade/profundidade, alterações do canal, frequência de rápidos e caraterização do corredor ripário e sua largura, foram os dados analisados.

Foi feita também uma estimativa da largura e profundidade de cada um dos locais de amostragem, assim como foram anotadas as características físicas da água nesse mesmo ponto, parâmetros como regimes de corrente, cor e cheiro.

Para relacionar os habitats com todos os outros parâmetros analisados, calculou-se o índice de qualidade do bosque da ribeira (QBR) (Munné *et al.*, 2003) (**Anexo IV**).

4- Análise de parâmetros físico-químicos em laboratório

Logo que se chegou ao laboratório, recorrendo à água recolhida nas garrafas de plástico, utilizaram-se 12 frascos (duas réplicas por ponto) de Winkler de 250 mL que se encheram com água até ao topo e se deixaram na obscuridade durante 5 dias. Os valores de CBO_5 foram então medidos, através de uma sonda de banca de medição de oxigénio dissolvido. Para cada ponto, foi feita a leitura das duas réplicas e calculada a média das leituras.

A restante água foi utilizada para fazer análises aos nutrientes considerados limitantes e importantes para as condições de qualidade do local analisado e tem um impacto na sua capacidade de albergar alguns seres vivos, tais como os fosfatos, nitratos, nitritos e amónia. Para a recolha destas informações foi usado um fotómetro multiparamétrico C200 de bancada (Hanna Instruments). Foram feitas sempre três leituras em cada amostra para cada um dos parâmetros e feita uma média dos valores lidos. Estas leituras tinham de ser posteriormente convertidas através da sua multiplicação por uma constante fornecida pelo protocolo de cada um dos parâmetros analisados. No caso dos fosfatos, as leituras são dadas diretamente em mg/L de fosfatos.

Os protocolos para cada um dos reagentes vêm com o fotómetro de bancada e o respetivo programa tem de ser selecionado.

5- Triagem e identificação de macroinvertebrados

O sedimento recolhido e previamente fixado em álcool foi passado por um crivo com uma grelha de 1mm para separar os sedimentos maiores dos mais pequenos, e analisado esse substrato de maiores dimensões, onde se encontravam na sua maioria gastrópodes, foram diretamente analisado. O sedimento restante foi passado novamente por um crivo com uma malha de 0.5 mm de diâmetro e lavado com água corrente. Após a lavagem, o substrato foi triado em pequenas porções que foram analisadas num tabuleiro branco com o auxílio de luz artificial e pinças com pontas finas. Os indivíduos que foram sendo encontrados foram armazenados em pequenos tubos de plástico em álcool a 70%, identificados com a data da recolha e local de recolha.

Para a identificação dos macroinvertebrados, foram usadas lupas binoculares com iluminação. Foi utilizado um livro de identificação "*Invertébrés d'eau douce*" edição de 2003 (Tachet *et al.,* 2003) como recurso para a identificação. O nível de identificação foi a ordem para as Oligochaetas, e família para os restantes grupos taxonómicos, sendo que para os casos em que foi possível se chegou à espécie para ter uma maior fiabilidade no cálculo de alguns índices pretendidos.

Para a análise de macroinvertebrados, foram determinados vários índices de forma a ter um retrato o mais fiel possível da qualidade real da água nos 6 pontos. Os índices que se usaram foram o IBB (Índice Biológico Belga), IBMWP (Biological Monitoring Working Party) (Hawkes, 1998), ASP (Average Score Per Taxon) (Chon *et al.*, 2013), Índice Português de Invertebrados Norte (IPtIN) (INAG, 2009) EPT, EPT/C, %DF, Índice de diversidade de Shannon-Wiener e de uniformidade de Pielou (Ravera,

2001) (**Anexo III e IV**). O cálculo destes índices foi feito com o auxílio do programa Microsoft Excel.

6- Tratamento das amostras para análises microbiológicas

Para cada uma destas amostras foram feitos dois tipos de contagens dos indicadores de contaminação fecal (*E. coli* e *Enterococcus* spp.), um pelo método tradicional de contagens de colónias em meio de cultura e outro pela técnica de FISH (*fluorescence in situ hybridization*). Além disso, as contagens dos microrganismos totais foram feitas pelo método da incorporação.

6.1- Tratamento das amostras para contagens através do método de cultura

6.1.1- Coluna de água

Usou-se a técnica de microfiltração por vácuo, utilizando filtros de 0.45 µm (Millipore Corporation, EUA). Para cada um dos pontos foram utilizados dois meios de cultura seletivos, um era específico para *E. coli*, Tryptone Bile X-glucuronide (TBX) (Oxoid, France), e o outro específico para *Enterococcus* spp., Slanetz & Bartley Medium (S.B.) (Oxoid, France). Para além dos meios simples foram também usados os mesmos meios mas suplementados com antibiótico (descrição mais detalhada em baixo)

As contagens de microrganismos totais na coluna de água foram feitas pelo método de incorporação em placa, colocou-se 1 ml de água numa placa de Petri estéril à qual se adicionava o meio Muller-Hinton (MH) (Biorad, France), estabilizado a 50°C, sendo que após solidificação era adicionada uma segunda camada de meio. As placas foram incubadas a 37°C por 24h.

6.1.1.1- Isolamento e enumeração de *Enterococcus* spp.

Foram feitas várias filtragens de 100 mL por cada amostra, transferindo-se o filtro para várias placas de meio: em SB suplementados com ampicilina (8 μg/mL) (S.B.+AMP), SB suplementada com vancomicina (6 μg/mL) (SB+VA) e em SB suplementado com ciprofloxacina (4 μg/mL) (SB+CIP). Estas placas foram incubadas numa estufa a 37 °C durante 24 h. Ao fim dessas 24h, os filtros foram transferidos para placas de meio de cultura Kanamicin-esculin Azid Agar (KAA) (Liofilchem, Itália), as quais foram incubadas a 37 °C e observadas a cada 20 min até perfazer 4h, para

verificação e contagem de colónias com atividade esculina rápida (fenotipicamente compatíveis com *Enterococcus* spp.).

A partir das quatro estratégias de isolamento aplicadas, foram aleatoriamente repicadas para KAA para confirmação fenotípica:

- ✓ Duas colónias retiradas do meio SB.
- ✓ Cinco colónias retiradas do meio SB+VA
- ✓ Três colónias retiradas do meio SB+CIP

Quando as colónias se encontravam bem isoladas e eram fenotipicamente característicos de *Enterococcus* spp., repicavam-se algumas colónias aleatoriamente, de cada placa para APT (Oxoid) para, posteriormente, realizar antibiogramas. Em caso de dúvida, a confirmação era efetuada em Litsky - Ethyl Violet Azide Broth (Biokar Diagnostics) e incubadas a 44.5°C *over night* (aproximadamente 18h).

A identificação que foi dada aos isolados provenientes dos vários meios foi: 0 para isolados retirados de SB, 60 para os isolados retirados de SB+CIP e 100 para os isolados recolhidos de SB+VA.

6.1.1.2- Isolamento e enumeração de *E. coli*

Utilizou-se a mesma metodologia aplicada a *Enterococcus* spp., com alteração dos meios. Para a identificação e enumeração de *E. coli* TBX simples e com suplemento de antibióticos. Especificamente foram usadas quatro meios onde se colocaram os filtros após filtragens de 100 mL: TBX, TBX com ampicilina (8 μg/mL) (TBX+AMP), TBX com cefotaxima (2 μg/mL) (TBX+CTX) para o qual se filtrou 100 ml de água da amostra e TBX com ciprofloxacina (4 μg/mL) (TBX+CIP) com um filtrado de 100 ml de água da amostra e TBX com imipnem (2 μg/mL) (TBX+IMP) no caso das amostras provenientes dos pontos D, E e F. Estas placas foram colocadas a 37°C durante 24h. Quando retiradas da estufa, as colónias foram enumeradas com o auxílio de uma lupa, e foram recolhidas aleatoriamente colónias que, quando bem isoladas, foram diretamente repicadas para APT para posterior realização de antibiogramas. De cada meio foi retirado um número específico de isolados:

- ✓ Duas colónias retiradas de TBX
- ✓ Cinco colónias retiradas de TBX+CTX
- ✓ Três colónias retiradas de TBX+CIP
- ✓ Cinco colónias retiradas de TBX+IMP (apenas para o ponto D, E e F)

O imipnem apenas foi utilizado nestes 3 pontos por serem presumivelmente os mais contaminados e por ter sido nesta zona que em 2010 foi encontrado um isolado resistente ao IMP num trabalho semelhante por nós realizado (Poirel et al., 2012).

Em alguns casos, os volumes tiveram de ser otimizados conforme o ponto a que pertencia a amostra que se estava a analisar. Assim sendo, nos pontos A e B os volumes foram os que se encontram descritos no protocolo, mas para os outros 4 pontos, os volumes tiveram de ser reduzidos de modo a permitir contagem de CFU (*colony forming unit*). Os valores dos CFUs foram todos convertidos para CFU/100ml.

Todos os isolados selecionados foram passados primeiro para HEA (Hete Entérica Agar) (Oxoid) e depois para TSI (Crípton Sugar Iro) (Oxoid). Todos eles, antes de se passar para antibiograma, foram sujeitos ao teste do Índole, um teste bioquímico que utiliza o reagente de Kovach para avaliar se a bactéria possui a capacidade de degradas o tryptofano em índole (a *E. coli* possui a enzima que intervém nesta conversão).

O sistema de identificação dos isolados provenientes dos diferentes meios foi: 0 para os isolados recolhidos de TBX, 60 para os isolados recolhidos de TBX+CIP, 100 para os isolados recolhidos de TBX+ CTX e 200 para os isolados recolhidos de TBX+IMP.

6.1.2- Biofilme

Para o biofilme foram usados os mesmos meios de cultura que para a coluna de água mas a técnica que se usou foi por incorporação, no caso do TBX e SB, ou por espalhamento no caso dos meios suplementados com antibiótico. Devido à quantidade elevada de sedimento que se encontrava nas amostras de biofilme, foi necessário proceder a um pré-tratamento da amostra de modo a desagrega-la antes de a passar para as placas.

Como pré-tratamento das amostras de biofilme, usou-se um sonicador (Banho ultrassons Sonorex, RK52) em banho na potência máxima por 10 min, intercalado com centrifugações de 10 mL da amostra de biofilme a 420xg por 10 min, de onde se recolheu 9.5 mL do sobrenadante sem tocar no pellet, que era ressuspendido em 9.5 mL água desionizada estéril, e repetiu-se estes passos por pelo menos 3 vezes. Por fim, todo sobrenadante foi recolhido, vortexado e usado para inocular nas placas.

As placas suplementadas com antibiótico foram inoculadas com 100 μL da amostra de biofilme que foi espalhada por toda a placa. Para o caso dos meios sem suplemento, utilizou-se a técnica de incorporação, em que se utilizou 100 μL da amostra. Após o espalhamento ou incorporação incubaram-se as placas a 37 °C por 24h, para *E. coli*, ou 48h, para *Enterococcus* spp..

Mais uma vez, à semelhança do que acontecia com a coluna de água, nos locais mais contaminados (caso dos pontos D, E e F), foi necessário fazer uma

diluição da amostra em Triptone Salt (TS) (Biokar Diagnostics, França), de modo a tornar possíveis as contagens.

Para as contagens de microrganismos totais o protocolo foi semelhante, mas usou-se o meio de cultura MH.

6.2- FISH (fluorescence in situ hybridization)

Usou-se esta técnica de FISH para contar *E. coli*, *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* na coluna de água e no biofilme (**fig. 10**).

Esta técnica foi feita para o biofilme diretamente após o pré-tratamento da amostra, usando o método de hibridização em lâmina. As sondas utilizadas estão descritas na **tabela 1**.

Tabela 1: Sondas utilizadas para a técnica de FISH.

Sonda	Sequência (5'-3')	Alvo	5' e corante	Referência
Eco 440	TCCCTTCCTCCCCGCTG	E. coli (16S rRNA)	cy3	(Fuchs et al., 1998)
ENF 191	GAAAGCGCCTTTCACTCTTATGC	E. faecalis (16S rRNA)	fluorescein	(Wellinghausen et al., 2007)
ENU 1470	GACTCCTTCAGACTTACTGCTTGG	E. faecium (23S rRNA)	cy3	(Wellinghausen et al., 2007)
BET42a	GCCTTCCCACTTCGTTT	Beta subclass of proteobacteria		(Hogardt et al., 2000)

6.2.1- Técnica de FISH em suspensão - biofilme

Começou por se centrifugar 1 mL de sobrenadante obtido por sonicação (como já descrito acima) a 10 000xg durante 5 min. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 500µl de paraformaldaido a 4% para fixar a amostra. Centrifugou-se novamente e voltou-se a ressuspender o pellet em 500 µL de etanol a 50% e incubou-se a -20°C por 30min. Após mais uma centrifugação, no caso das amostras a hibridizar com as sondas para os enterococus, houve um passo suplementar: ressuspender o pellet em 500 µL de lisozima a 10 mg/mL e incubar por 30 min a 37°C, após os quais se fez nova centrifugação. Esta necessidade de adicionar lisozima deveu-se ao facto de ter de degradar a membrana e a parede bacteriana para haver hibridização, uma vez que a degradação das paredes é mais difícil em bactérias

Gram-positivas que em Gram-negativas. Em seguida ressuspendeu-se o pellet em 100 μL de solução de hibridização com a mistura das sondas oligonucleotidicas (Eco440 e BET42a, no caso da E. coli, e ENF 191, ENU 1470 e BET42a, no caso dos enterococus, cada uma a 5 ng/μL) e incubou-se a 46°C por 3h. Depois destas 3 h de incubação fez-se uma nova centrifugação e adicionou-se a solução de lavagem e voltou a centrifugar-se e por fim adicionou-se 500 μL água estéril e seguidamente filtrou-se por vácuo através de uma membrana (Nucleopore® Polycarbonate – Whatman) de polycarbonato com poros de 2 μm de diâmetro, previamente molhada em água estéril, e filtrou-se a solução final. Esta membrana foi colocada sobre uma lâmina e foi-lhe adicionada uma gota de meio de montagem com DAPI, Vecta-Shield (Vecta Laboratories Inc.) e coberta com uma lamela para poder ser analisada ao microscópio de fluorescência, mantendo-se na obscuridade e em lugar fresco até observação.

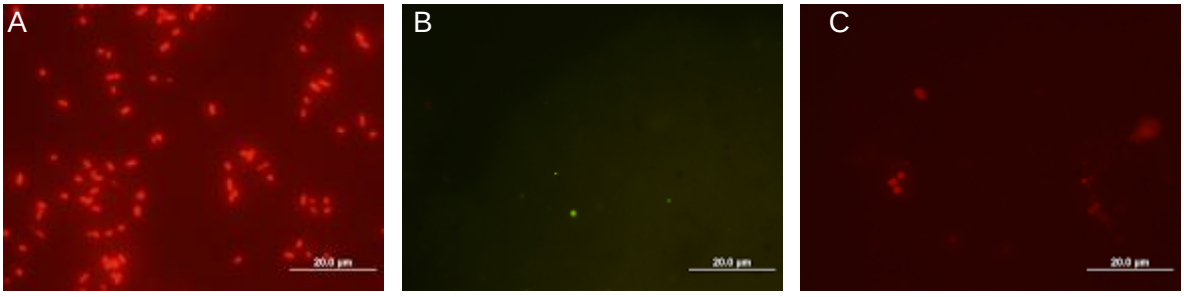


Figura 10: Imagens, a título de exemplo, tiradas nas contagens por FISH. A- *Escherichia coli* B- *Enterococcus faecalis* C- *Enterococcus faecium*

6.2.2 - Técnica de FISH em lâmina - coluna de água

De cada solução pré-enriquecida a partir de cada amostra da coluna de água, transferiram-se 10 μL para um poço da lâmina (marca e características), deixando-se secar ao ar fixando-se com 20 μL de solução de paraformaldaido 4% por 10 min, seguido de 20 μL de soluções de concentração crescente de etanol (50, 80 e 100%), cada um por 3 min. No caso dos Enterococcus spp. tratou-se com 20 μL de solução de lisozima (10 mg/mL) por 10 min a 37 °C. De seguida adicionou-se 10 μL da respetiva solução de hibridização contendo as sondas (como acima descrito) e cobriu-se com uma lamela e incubou-se em atmosfera húmida a 46 °C por 3h. Após esse tempo, retirou-se a lamela e transferiu-se a lâmina de poços para o *Coplin jar* contendo a solução de lavagem, incubou-se a 46 °C por 15 min. Por fim, deixou-se secar ao ar e adicionou-se uma gota de maio de montagem com DAPI, Vecta Shield e observou-se ao microscópio de fluorescência.

7 - PCR-DGGE do biofilme do rio

Para realizar o DDGE, previamente foi necessário extrair o DNA bacteriano do biofilme, usando um kit de extração apropriado (Powersoil DNA Isolation Kit – Mo Bio Laboratories), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante.

De seguida, para a reação de PCR (25 μL), usaram-se os primers, 341F-com uma CG *clamp* de 40 pares de bases na extremidade 5'e 907R (Schauer et al., 2000), assim como outros reagentes indicados na **tabela 2**. O protocolo que se utilizou no termociclador para este PCR (Lyautey *et al.*, 2005) encontra-se descriminado na **tabela 3**.

Para o DGGE, são necessários vários passos, sendo que o primeiro a preparação de um gel de poliacrilamida usando um gradiente de desnaturante de 40-60% (gradiente desnaturante de 100% é ureia a 7 M e formamida a 40%) . Alguns dos reagentes necessários e as quantidades necessárias estão apresentados na **tabela 4**. Para além das presentes na **tabela 4** são também necessários os catalisadores de polimerização da acrilamida, o APS, *ammonium persulfate* (Sigma) numa concentração de 10% e de TEMED (Biorad).

Tabela 2: Composição da reação para realização do PCR para o DGGE.

Reação de PCR	
H2O	14,25 μL
Buffer 10x	2,5 μL
Mg Cl2 (25 mM)	0,5 μL
dNTP (10 mM	0,5 μL
341F (10 μM)	1 μL
907R (10 μM)	1 μL
Taq polimerase (5 U)	0,25 μL
DNA	5 μL

Tabela 3: Protocolo para o PCR. O *touchdown* corresponde a uma diminuição de 1ºC por cada ciclo até chegar ao 55ºC.

Temperatura (°C)	Duração (min)	Ciclos
95	5	1
94	1	10
Touchdown-65-55	1	
72	1	
94	1	20
55	1	
72	30	
72	5	1

Tabela 4: Reagentes necessários para fazer o gel para a eletroforese do DGGE

Reagentes	40%	60%
TAE (10x) (ml)	2	2
Poliacrilamida 99.5% (ml)	3	3
Formamida 40% (ml)	3,2	4,8
Ureia pura (g)	3,36	5,04
Water (ml)	Até 20 ml	Até 20 ml

.

Portanto, para preparar cada gel no sistema usado (CBS Scientific Co) foram preparados 11.5 mL de solução de concentração alta e de concentração baixa de desnaturante, às quais foi adicionado 80 μL de APS, e 10 μL de TEMED. A tina de eletroforese cheia de TAE 1x foi pré-aquecida até atingir 61°C por 1 h e o gel depois de polimerizado foi colocado na tina e os poços foram carregados com 20 μL do produto de PCR, ao qual foram anteriormente adicionados 2 μL de loading Buffer. A corrida de eletroforese durou 16h a uma voltagem de 60 V e a 61 °C. Após realizada a eletroforese, o gel foi corado com uma solução de SafeGreen Premium (NZTech) - 10 μL em 100 mL de água destilada) à temperatura ambiente por 15 min e de seguida lavado com 100 mL de água destilada por 10 min. O gel foi observado no GelDoc (Biorad).

Para excisão das bandas do gel, a banda era cortada do gel com o auxílio de uma lâmina e colocado num eppendorf ao qual se adicionou 100 μL de H_2O ultra pura e deixou-se 24h a 4°C. Ao fim dessas 24h, usaram-se 5 μL para realizar um novo PCR

e o produto resultante do PCR foi depois mandado para sequenciação (*Sanger sequencing*). O "Ribossomal Database Project (RDP) Classifier" foi usado para a classificação taxonómica das bandas sequenciadas (Wang et al., 2007).

8 - Teste de suscetibilidade antimicrobiana

Para preparação do inóculo de cada isolado pretendido, repicou-se uma colónia típica e bem isolada para 5 mL de APT e incubou-se 37ºC até atingir uma turvação equivalente a 0.5 McFarland. A partir do APT, procedeu-se `inoculação em placas de Muller-Hinton (MH), com o auxílio de uma zaragatoa.

Os padrões de resistências antimicrobianos, foram testados recorrendo ao método de difusão por discos, de acordo com as diretivas do *Clinical and Laboratory Standards* (CLSI, 2013). Os discos de antibióticos (Oxoid) usados para testar os isolados de *Enterococcus* spp. foram 14: ampicilina (AMP, 10μg), quinopristina-dalfopristina (QD, 15μg), tetraciclina (TE, 30 μg), rifampicina (RD, 5μg), eritromicina (E-15μg), gentamicina (CN, 120μg), vancomicina (V, 30μg), azitromicina (AZM, 15μg), teicoplanina (TEC, 30μg), cloranfenicol (C, 30μg), nitroforantoína (F, 300μg), ciprofloxacina (CIP, 5μg), doxicilina (DO, 30μg), linezolida (LZD, 30μg) a estirpe referência usada para *Enterococcus* spp. foi ATCC 29212. No caso de *E. coli* foram usados 19 antibióticos: ampicilina (AMP, 10μg), tobramicina (TOB, 10μg), ciprofloxacina (CIP, 5μg), cefoxitina (FOX, 30μg), imipenem (IPM, 10μg), gentamicina (CN, 10μg), nitroforantoína (F, 300μg), tetraciclina (TE, 30μg), cefotaxima (CTX, 30μg), aztreoname (ATM, 30μg), ceftazidima (CAZ, 30μg), amoxicilina/ácido clavulânico (AMC, 10μg), cefalotina (KF, 30μg), amicacina (AK, 30μg), estreptomicina (S, 10μg), cloranfenicol (C, 30μg), ácido nalidíxico (NA, 30μg), sulfamethoxazol/trimetoprim (SXT, 20μg), canamicina (K, 30μg), e a estirpe referencia usada para *E. coli* foi ATCC 25922. A interpretação dos diâmetros da zona de inibição foi realizada segundo recomendado pela CLSI (2013).

Foram guardados os isolados multirresistentes (MDR) em e refrigeradas a -20ºC, para estudos futuros. Considera-se que os isolados são MDR se são resistentes a 3 ou mais antibióticos de pelo menos 3 categoria de antimicrobianos (Magiorakos *et al*., 2011).

9 - Estudo genético

Os isolados de *E. coli* foram caracterizados genotipicamente para a atribuição de filogrupo e os de *Enterococcus* spp. para identificação de espécie. Sendo a *E. coli*

uma Gram-positivo e os *Enterococcus* spp. um Gram-negativo, o protocolo de extração de DNA utilizado foi diferente.

9.1 - Extração de *E. coli*

Para a extração de *E. coli* usou-se o kit InstaGene matrix (Biorad), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Este procedimento é rápido e com uma percentagem de eficácia muito elevada.

9.2 - Extração de *Enterococcus* spp.

Usaram-se dois tipos de extração diferente, uma com recurso a um kit de extração de DNA bacteriano, GF-1 Bacterial DNA Extration (Vivantis), e outra físico-química muito mais demorada e nem sempre eficaz.

No caso do Kit de extração, seguiu-se o protocolo que é enviado com o kit, recomendado pelo fabricante.

A técnica de extração físico-química que se realizou na maior parte dos casos, sendo que o kit era usado em caso de esta extração falhar, envolvia mais passos e mais regentes. Os reagentes necessários para esta extração estão presentes na **tabela 5**.

Tal como no caso a cima descrito para a *E. coli*, parte-se de uma cultura pura do isolado que se quer extrair e repica-se uma colónia para um tubo de ensaio com 10 ml de BHI e incuba-se *over-night* (18h). Para iniciar a extração, transferiu-se 1mL deste inóculo para um ependorf estéril e centrifugou-se a 10 000 rpm por 7 min. Este procedimento foi repetido as vezes necessárias até se ter um pellet bem visível. Em seguida fez-se uma lavagem com água autoclavada. O pellet que se obteve foi ressuspendido em tampão SET e SDS, homogeneizado, e em seguida adicionado a solução de lise e a lisozima e incubou-se durante 2h a 37°C. Seguidamente, adicionou-se a Proteinase K e voltou a incubar-se a 56°C por mais 2h. Terminado este tempo de incubação, foi adicionado o NaCl e o clorofórmio, agitando vigorosamente até obter uma solução homogénea esbranquiçada. Esta solução é centrifugada por mais 10min a 10 000 rpm e como produto da centrifugação observava-se uma solução com duas fases separadas por uma membrana esbranquiçada. Transfere-se a fase superior para um novo ependorf e acrescenta-se isopropanol frio (-20°C), homogeneiza-se e deixa-se precipitar durante 1 h a -20°C, após o qual se realiza nova centrifugação e se rejeita o sobrenadante. Por fim, realiza-se uma última lavagem com etanol a -20°C. Após secar, ressuspender em 50 μL de H_2O ultra pura e guardar a -20 °C.

Tabela 5:Reagentes utilizados na extração físico-química do DNA de *Enterococcus* spp..

Reagentes	Quantidades (μL)
Solução de Lise	180
Lisozima (50mg/mL)	10
Proteinase K (20mg/ml)	20
SET (5%)	500
SDS (20%)	25
Na Cl (5M)	182
Cloroformio (24:1)	578
Isopropanol (99,8%)	700
Etanol (70%)	800

9.1.2 - PCR para a determinação dos filogrupos de *E. coli*

O protocolo que se usou para este PCR foi o proposto por Clermont *et al*. (2013), sendo que os primers que se utilizaram foram os propostos neste mesmo artigo.

Foi preciso otimizar os volumes necessários para uma reação de PCR de 25 μL (20 μL da mistura de reagentes + 5 μL de DNA previamente extraído).

Ao todo, os isolados são testados para 6 possíveis filogrupos. Destes 6 filogrupos, o filogrupos A, B1, B2 e D tinham sido propostos pelos mesmos autores em 2000, referindo que os isolados pertencentes aos filogrupos A e B1 seriam considerados comensais, ou seja, comuns na flora microbiana intestinal, e os dos filogrupos B2 e D seriam patogénicos (Clermont *et al.*, 2000). No artigo publicado em 2013 (Clermont *et al.*, 2013), estes autores vieram propor novos primers e novo protocolo de PCR para identificação destes mesmos filogrupos e adicionar mais 3 filogrupos, C, E e F. Destes novos filogrupos, o C é considerado o mais próximo a nível genotípico dos filogrupos considerados comensais. Por sua vez, os filogrupos E e F estão mais próximos dos filogrupos B2 e D, considerados patogénicos. Apesar de estes novos primers permitirem a identificação de um maior número de isolados que os anteriores, os autores reconhecem que há uma pequena fração de E. coli para a qual não é possível identificar o filogrupo recorrendo a este método, sendo que uma das explicações propostas será a grande variabilidade genética que estas bactérias possuem.

Foram realizadas 3 reações de PCR diferentes para diferentes identificações de filogrupos (**tab. 6**). Os primers utilizados estão representados na **tabela 7**.

Tabela 6: Volumes utilizados para a realização das diferentes reações de PCR propostas.

Reação de PCR (filogrupos de *E. coli*)					
Quadruplex		**Grupo C**		**Grupo E**	
H2O	4,1μL	**H2O**	12,1 μL	**H2O**	12,1μL
Buffer 10x	2,5μL	**Buffer 10x**	2,5 μL	**Buffer 10x**	2,5μL
dNTP (10 mM)	0,5μL	**dNTP (10 mM)**	0,5 μL	**dNTP (10 mM)**	0,5μL
chuA.1b (10 μM)	1,25μL	**trpAgpC.1 (10 μM)**	1,25 μL	**ArpAgpE.f (10 μM)**	1,25 μL
chuA.2b (10 μM)	1,25μL	**trpAgpC.2 (10 μM)**	1,25 μL	**ArpAgpE.r (10 μM)**	1,25 μL
yjaA.1b (10 μM)	1,25μL	**trpBA.f (10 μM)**	1 μL	**trpBA.f (10 μM)**	1 μL
yjaA.2b (10 μM)	1,25μL	**trpBA.r (10 μM)**	1 μL	**trpBA.r (10 μM)**	1 μL
TspE4C2.1b (10 μM)	1,25μL				
TspE4C2.2b(10 μM)	1,25μL				
AceK.f (10 μM)	2,5μL				
ArpA.r (10 μM)	2,5μL				
Taq polimerase (5U)	0,4μL	**Taq polimerase (5U)**	0,4 μL	**Taq polimerase (5U)**	0,4μL
DNA	5μL	**DNA**	5μL	**DNA**	5μL

Tabela 7: Primers utilizados para identificação de Filogrupos.

Primers	**Sequencia (5'-3')**
chuA.1b	5′-ATGGTACCGGACGAACCAAC-3′
chuA.2b	5′-TGCCGCCAGTACCAAAGACA-3′
yjaA.1b	5′-CAAACGTGAAGTGTCAGGAG-3′
yjaA.2b	5′-AATGCGTTCCTCAACCTGTG-3′
TspE4C2.1b	5′-CACTATTCGTAAGGTCATCC-3′
TspE4C2.2b	5′-AGTTTATCGCTGCGGGTCGC-3′
AceK.f	5′-AACGCTATTCGCCAGCTTGC-3′

ArpA1.r	5′-TCTCCCCATACCGTACGCTA-3′
trpAgpC.1	5′-AGTTTTATGCCCAGTGCGAG-3′
trpAgpC.2	5′-TCTGCGCCGGTCACGCCC-3′
ArpAgpE.f	5′-GATTCCATCTTGTCAAAATATGCC-3′
ArpAgpE.r	5′-GAAAAGAAAAAGAATTCCCAAGAG-3′
trpBA.f	5′-CGGCGATAAAGACATCTTCAC-3′
trpBA.r	5′-GCAACGCGGCCTGGCGGAAG-3′

No Quadruplex usa-se um conjunto de 4 pares de primers que vão identificar diretamente os filogrupos A, B2, B1 e F a partir de amplificação dos diferentes genes correspondentes aos primers utilizados. No entanto há casos em que o perfil de bandas não permite atribuir diretamente o filogrupo, o que obriga a uma segunda reação de PCR (reação do grupo C ou do grupo E).

O protocolo para a reação de PCR do Quadruplex e para o filogrupo C estão presentes na **tabela 8.**

Tabela 8: Protocolo para a reação de PCR para o Quadruplex e filogrupo C. Para o caso da reação do filogrupo E, só muda a temperatura de amplificação, que neste caso é de 57°C.

Temperatura (°C)	Duração (min)	Ciclos
94	4	1
94	0.5	30
59	0.2	
72	0.2	
72	5	1

9.2.2 - PCR para a identificação de espécies de *Enterococcus*

O produto da extração de DNA foi usado para realizar várias reações Multiplex-PCR sequenciais até à identificação da espécie.

Devido ao elevado número de espécies existentes de *Enterococcus*, e ao facto de muitos das espécies serem idênticas a nível genético e os primers serem idênticos em alguns casos, os primers das diferentes espécies foram agrupados em 7 grupos de Multiplex-PCRs em que alguns têm 4 pares de primers e outros apenas 2 (Jackson, 2004). Na **tabela 9** estão indicados os reagentes e respetivos volumes necessários para a mix grupo 1, com os primers correspondentes às espécies *E. faecium*, *E faecalis*, *E. durans* e *E. malodoratus*, e o grupo 2, com os primers correspondentes às

espécies *E. gallinarum* e *E. casseliflavus*. Ao todo foram testados 18 pares de primers correspondentes a 18 espécies de *Enterococcus* spp. (**tab. 10**).

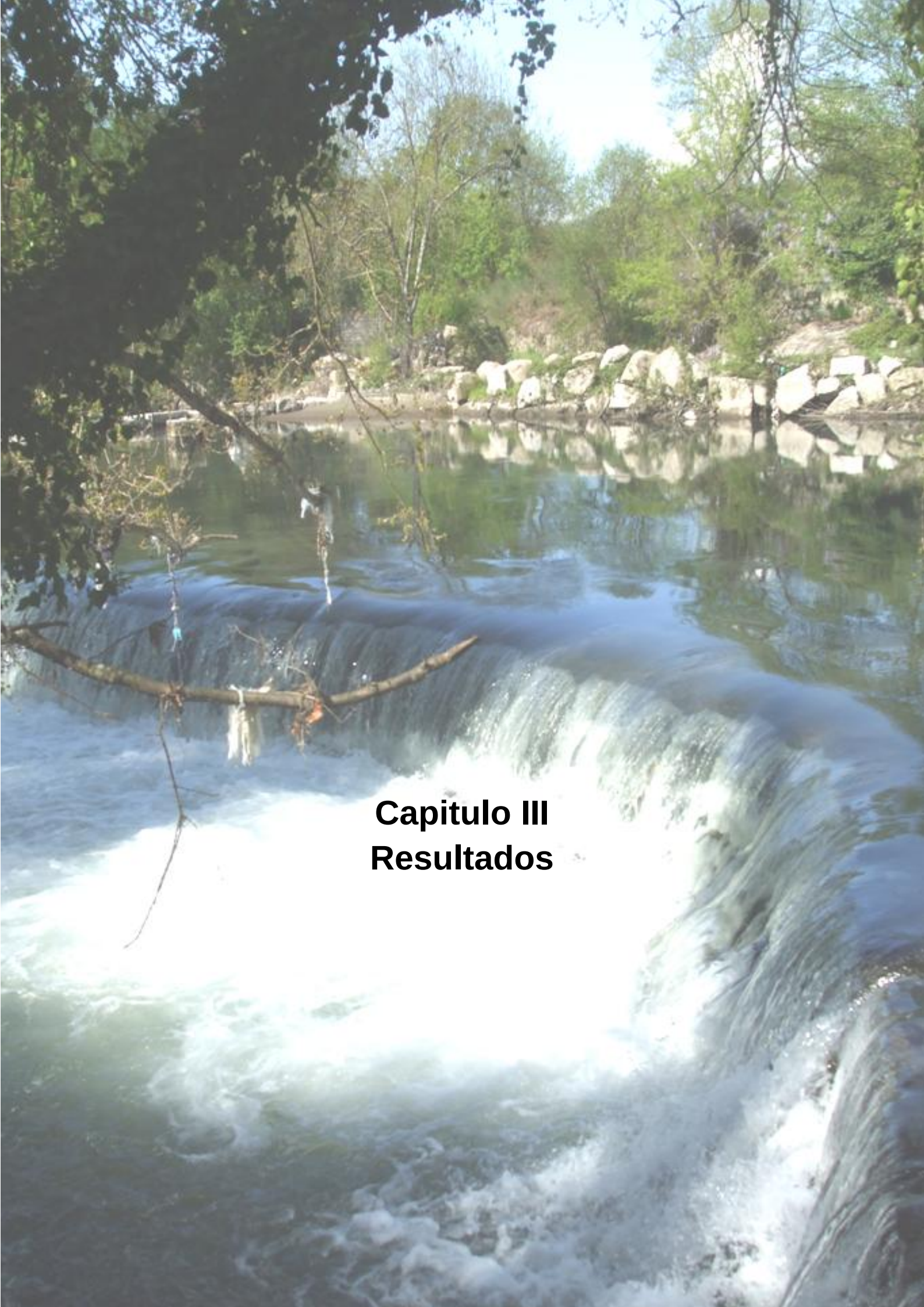
Tabela 9: Volumes utilizados nas mix de PCR dos grupos 1 e 2

Reação de PCR (Especiação de *Enterococcus*)			
Grupo 1		**Grupo 2**	
H2O	0,25 μL	**H2O**	8,25 μL
Buffer 10x	2,5 μL	**Buffer 10x**	2,5 μL
dNTP (10 mM)	0,5 μL	**dNTP (10 mM)**	0,5 μL
FM1 (10 μM)	2 μL	**GA1 (10 μM)**	2 μL
FM2 (10 μM)	2 μL	**GA2 (10 μM)**	2 μL
FL1 (10 μM)	2 μL	**CA1 (10 μM)**	2 μL
FL2 (10 μM)	2 μL	**CA2 (10 μM)**	2 μL
DU1 (10 μM)	2 μL		
DU2 (10 μM)	2 μL		
MA1 (10 μM)	2 μL		
MA2 (10 μM)	2 μL		
Taq polimerase (5U)	0,25 μL	**Taq polimerase (5U)**	0,25 μL

Tabela 10: Primers utilizados para os 7 grupos para o PCR (Jackson, 2004).

Espécies	**Primer**	**Sequência (5'-3')**	**Tamanho do produto (bp)**	**Grupo**
E. faecium	FM1	GAAAAAACAATAGAAGAATTAT	215	1
	FM2	TGCTTTTTTGAATTCTTCTTTA		
E. faecalis	FL1	ACTTATGTGACTAACTTAACC	360	1
	FL2	TAATGGTGAATCTTGGTTTGG		
E. durans	DU1	CCTACTGATATTAAGACAGCG	295	1
	DU2	TAATCCTAAGATAGGTGTTTG		
E. malodoratus	MA1	GTAACGAACTTGAATGAAGTG	134	1
	MA2	TTGATCGCACCTGTTGGTTTT		
E. gallinarum	GA1	TTACTTGCTGATTTTGATTCG	173	2
	GA2	TGAATTCTTCTTTGAAATCAG		
E. casseliflavus	CA1	TCCTGAATTAGGTGAAAAAAC	288	2
	CA2	GCTAGTTTACCGTCTTTAACG		
E. dispar	DI1	GAACTAGCAGAAAAAAGTGTG	284	3

	DI2	GATAATTTACCGTTATTTACC		
E. pseudoavium	PV1	TCTGTTGAGGATTTAGTTGCA	173	3
	PV2	CCGAAAGCTTCGTCAATGGCG		
E. sacchorolyticus	SA1	AAACACCATAACACTTATGTG	371	3
	SA2	GTAGAAGTCACTTCTAATAAC		
E. flavescens	FV1	GAATTAGGTGAAAAAAAAGTT	284	4
	FV2	GCTAGTTTACCGTCTTTAACG		
E. mundtii	MU1	CAGACATGGATGCTATTCCATCT	98	4
	MU2	GCCATGATTTTCCAGAAGAAT		
E. avium	AV1	GCTGCGATTGAAAAATATCCG	368	5
	AV2	AAGCCAATGATCGGTGTTTTT		
E. columbae	CO1	GAATTTGGTACCAAGACAGTT	284	5
	CO2	GCTAATTTACCGTTATCGACT		
E. cecorum	CE1	AAACATCATAAAACCTATTTA	371	6
	CE2	AATGGTGAATCTTGGTTCGCA		
E. hirae	HI1	CTTTCTGATATGGATGCTGTC	187	6
	HI2	TAAATTCTTCCTTAAATGTTG		
E. raffinosus	RF1	GTCACGAACTTGAATGAAGTT	287	6
	RF2	AATGGGCTATCTTGATTCGCG		
E. gilvus	GI1	CTGGCTGGGCTTGGCTAGTGA	98	7
	GI2	ATAATCGGTGTTTTACCGTCT		
E. porcinus/villorum	PO1	TGGTTTCTGATATGGATGCGA	280	7
	PO2	GTAATCGCTAATTTCTCTCCA		



Capitulo III
Resultados

Resultados

1 - Parâmetros físico-químico

Os parâmetros físico-químicos foram analisados através da sua progressão espaciotemporal nas 5 recolhas nos 6 pontos. Segue a análise dos parâmetros recolhidos.

1.1 - pH

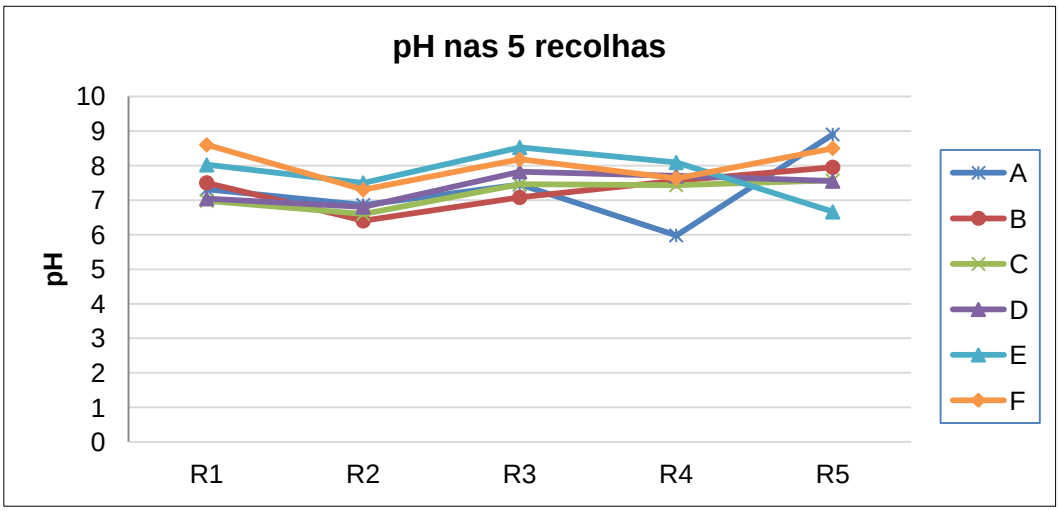


Figura 11: Variação do pH ao longo das cinco recolhas efetuadas.

De uma maneira geral, pH dos 6 pontos mantêm-se entre os 6,0 e os 9,0, recomendado para o "bom estado ecológico" pelo INAG (2009). O pH que verifica maior variação ao longo do tempo, sendo mais visível nas recolhas 4 e 5, é o correspondente ao ponto A. Este ponto é o mais próximo da nascente e estas oscilações não podem ser explicadas com recurso à poluição.

Analisando a **figura 11**, o que se consegue ver numa primeira abordagem é que o ponto F é aquele que possui o pH mais elevado na recolha 1, descendo na recolha 2, voltando a subir ligeiramente na recolha 3, voltando a descer ligeiramente na recolha 4, voltando a subir na recolha 5. O pH deste ponto varia entre 7,3 e 8,6. Em termos de média, este ponto pode ser indicado como o mais alcalino dos 6 pontos, tendo uma média de 8,0 nas 5 recolhas. Uma vez que a alcalinidade é tida em conta como um indicador de contaminação, esta pode ser uma das razões para este facto. Os pontos C e D apresentam uma variação de pH entre o 6,6 e o 7,8. De uma forma geral, pode-se dizer que a média do pH nestes dois pontos é de mais ou menos 7, pH

considerado neutro. Nos pontos A e B, apesar de variarem ao longo das 5 recolhas, o pH médio é de 7. No entanto, no ponto 1, na recolha 4, houve a leitura de um pH de 5.98 que pode ser considerado um *out spot* na progressão geral o pH desse ponto.

1.2 - Temperatura

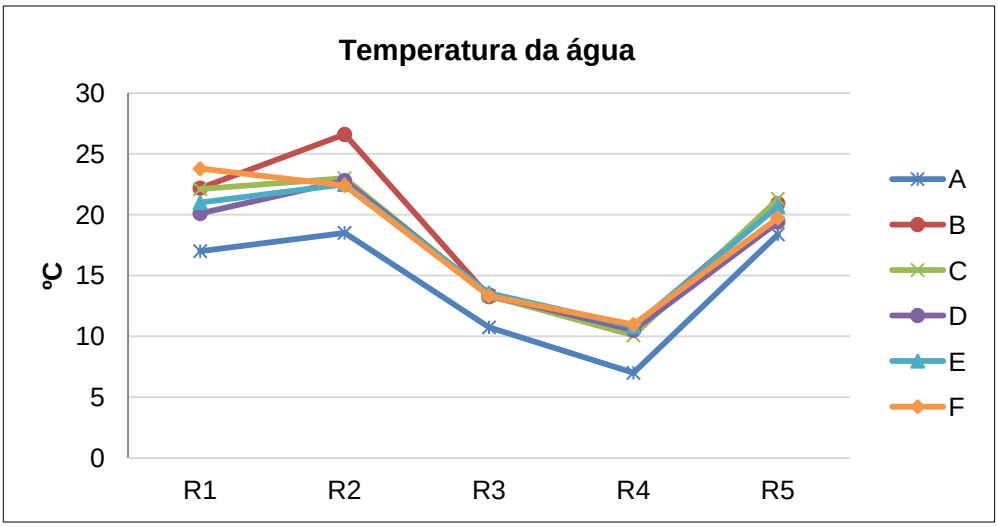


Figura 12: Variação da temperatura ao longo do tempo.

A temperatura da água apresentou uma tendência de acompanhar a temperatura ambiental, na maioria dos casos. Efetivamente, as recolhas 3 e 4 foram feitas com as temperaturas mais baixas, sendo que a recolha 2, em Setembro, foi feita com sol e calor, assim como as recolhas 1 e 5. As recolhas 3 e 4 coincidiram com os meses de Novembro e Fevereiro, os mais frios, onde se verificou uma descida na temperatura da água. Sendo que as recolhas de macroinvertebrados foram feitas na recolha 1, recolha 3 e recolha 5, estas 3 datas correspondem a típicos panoramas, em termos de temperatura, com a Primavera-Outono-Primavera, que coincidem com ciclos de vida dos macroinvertebrados. Assim sendo, será de esperar uma maior abundância de indivíduos na recolha 1 e recolha 5, onde se detetaram as temperaturas mais altas.

As temperaturas mais baixas foram detetadas no ponto A, perto da nascente, uma zona montanhosa e de elevada altitude, tendo o mínimo sido observado na recolha 4, correspondente a uma temperatura de 6,99 °C. Por sua vez, a temperatura mais elevada foi detetada na recolha 2 no ponto B, com uma temperatura de 26,6.

1.3 - Oxigénio

Observando a **figura 13**, o que se pode verificar é que as taxas de saturação mais baixas foram detetadas na recolha 2 nos ponto C, E e F. O ponto foi sempre o que apresentou uma taxa de saturação mais baixa, com exceção da recolha 4, em que o valor mais baixo foi no ponto B. As características do ponto C podem explicar esta baixa taxa de saturação, uma vez que é um local com apenas dois regimes de corrente, baixo lento e lento profundo. Mesmo assim, apresenta apenas na recolha 2 valores abaixo dos 70%.

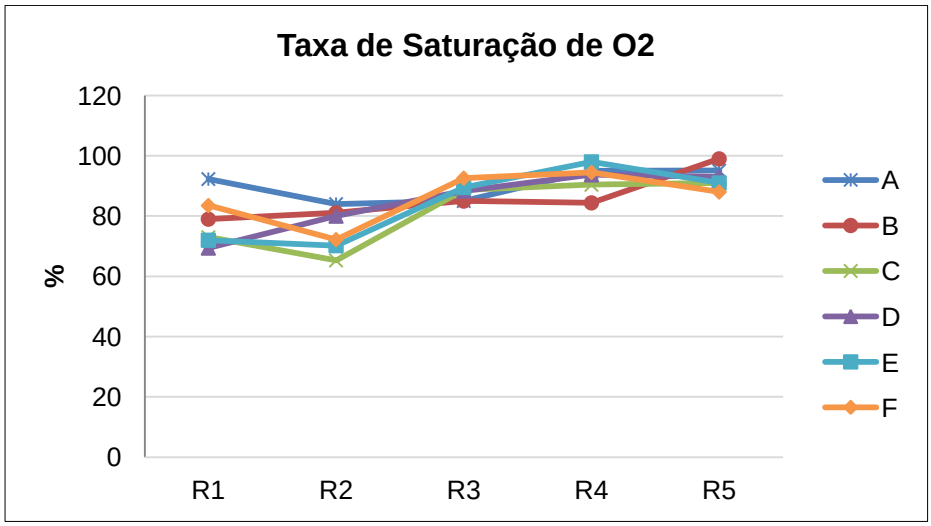


Figura 13: Progressão espácio-temporal a taxa de saturação de O_2

Analisando a concentração de Oxigénio Dissolvido, de uma forma geral, a concentração está acima dos 6 ppm.

Da recolha 1 para a recolha 2 houve um aumento dos valores de O_2 em todos os pontos, menos no que diz respeito ao ponto A, que manteve o mesmo valor de oxigenação. Da recolha 2 para a recolha 3 houve um ligeiro decréscimo das condições de oxigenação de todos os pontos, menos do ponto F, que teve um ligeiro aumento. Este é o único ponto que sofre um decréscimo na concentração de oxigénio para a recolha 4, sendo que todos os outros tiveram tendência de aumento. Na última recolha, verificou-se uma descida grande, mais uma vez seguida por todos os pontos, mesmo assim, para valores entre os 8 e os 9 ppm, podem considerar-se uma boa oxigenação da água.

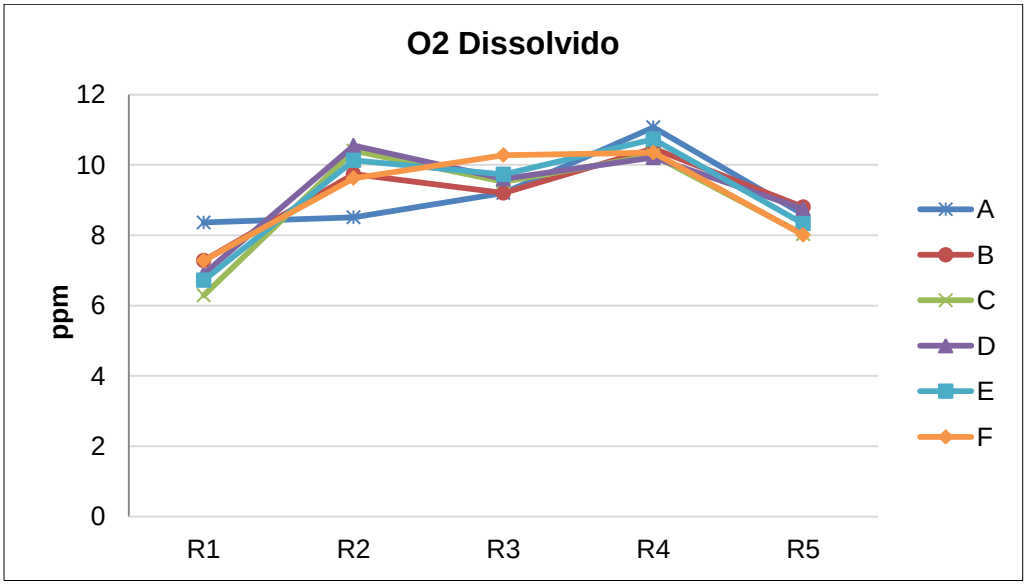


Figura 14: Progressão espácio-temporal do O_2 dissolvido.

1.4 - Condutividade

O que se verifica na recolha 5 é o que se esperaria encontrar em todas as recolhas, em que, aliando a condutividade a um aumento da poluição, ao longo do curso do rio haveria um aumento da condutividade, uma vez que efetivamente se previa um aumento da poluição conforme se afasta da nascente e entra em zonas povoadas e com um aumento da indústria nas suas margens. Na recolha 1 esta tendência é mais ou menos seguida, sendo que os valores de condutividade do ponto C e D são muito idênticos, mas não foge ao perfil do que se previa. Na recolha 2, o ponto B tem um pico de valores de condutividade anormais, que pode ter a explicação numa descarga esporádica. Na recolha 3 e 4, o ponto E é aquele que apresenta uma condutividade mais elevada, descendo para o ponto 6. Mais uma vez, na recolha 4, a ponto B tem um valor elevado não esperado para este ponto.

Apesar de ser um parâmetro que pode ter varias variáveis que o influenciem, é importante saber os valores de condutividade, sendo que ao relaciona-lo com os outros parâmetros podes tirar conclusões mais viáveis.

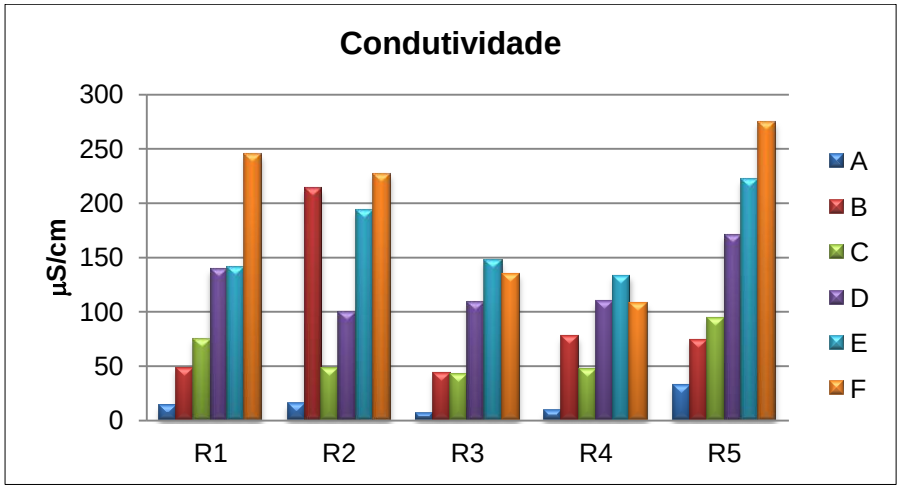


Figura 15: Progressão espácio-temporal da condutividade.

1.5 - Carência Bioquímica de Oxigénio (CBO_5)

Seria de supor, à partida, que a qualidade da água fosse baixando ao longo do curso do rio, mas que no ponto A, perto da nascente, os valores de CBO_5 fossem, baixos. Observando a **figura 16** construído com os valores de CBO_5 analisados, o que se verifica é que na realidade, no ponto A, os valores da carência bioquímica de oxigénio são abaixo dos 2 mg/L, sendo que apenas o ultrapassam na recolha1.

O ponto B apresenta na recolha 1 valores a sima do limite recomendado de 3 mg/l, assim como na recolha 2. Este valor desce na recolha 3 para valores perto de 1 e voltam a registar uma subida progressiva na recolha 4 e recolha 5, levando a acreditar que houve uma introdução de matéria orgânica progressiva neste ponto.

No ponto C registados os valores mais altos de CBO_5 nas recolhas de Junho e Setembro de 2014, recolha 1 e recolha 2, ultrapassando os valores máximos recomendados, chegando a ultrapassar as 5 mg/L na recolha 2. Tem um decréscimo acentuado da recolha 2 para a recolha 3, e continua a diminuir par a recolha 4, atingindo valores na ordem dos 2 mg/L na recolha 5.

O ponto D tem uma tem uma dinâmica parecida, mas com valores mais baixos, sendo que tem o seu máximo nas 4 mg/L na recolha 2, desce acentuadamente na recolha 3, quase se anulando na recolha 4 e subindo drasticamente na recolha 5, para valores perto dos 3 mg/L.

No caso do ponto 5, o limite máximo recomendado só é ultrapassado na recolha 2, mantendo-se em valores abaixo dos 2 mg/L nas recolhas 1 e na 3 e ultrapassando os 2 mg/L nas recolhas 4 e 5.

O ponto F demonstra mais uma vez, como na maioria dos outros pontos, um pico acima dos 3 mg/L na recolha 2, sendo que tem um decréscimo ao longo das últimas três recolhas, atingindo valores inferiores a 1 mg/l na última recolha.

De uma forma geral, pode-se afirmar que a recolha 2 verificou os valores mais elevados de CBO_5 nos pontos C, D, E e F, sendo que os pontos A e B verificaram uma diminuição da concentração de oxigénio dissolvido. A recolha 3 foi a que registou valores mais baixos para os pontos B e E, uma vez que os menores valores para o ponto C e D foram na recolha 4, e no ponto F foi na recolha 5.

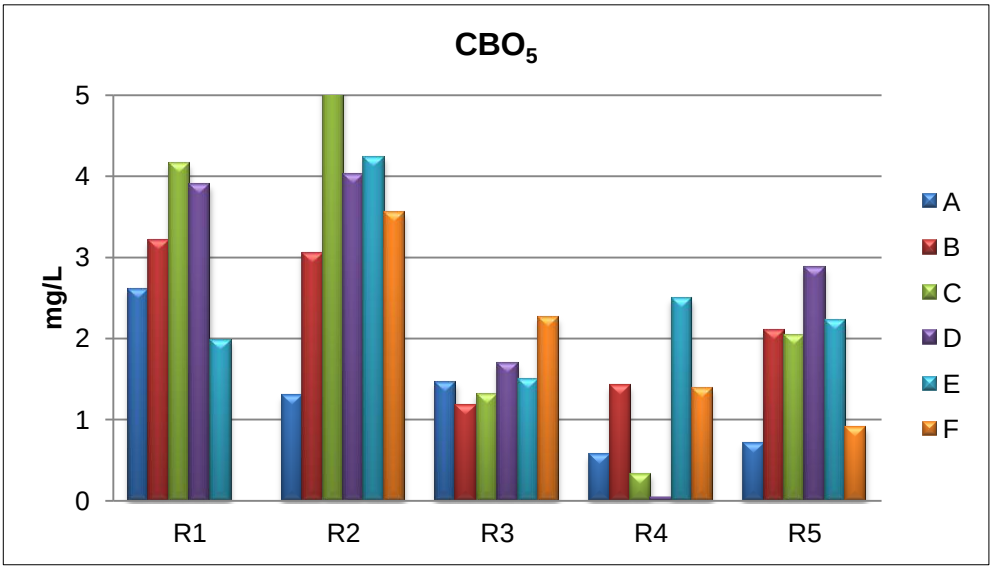


Figura 16: Progressão espácio-temporal do CBO5.

1.6 - Nutrientes

Os 4 nutrientes que foram estudados são os considerados limitantes e indicadores de poluição de origem urbana ou industrial. Todos eles têm um impacto importante na manutenção do ecossistema aquático, sendo por isso importantes para a determinação da qualidade da água.

1.6.1- Amónia, Nitratos e Nitritos

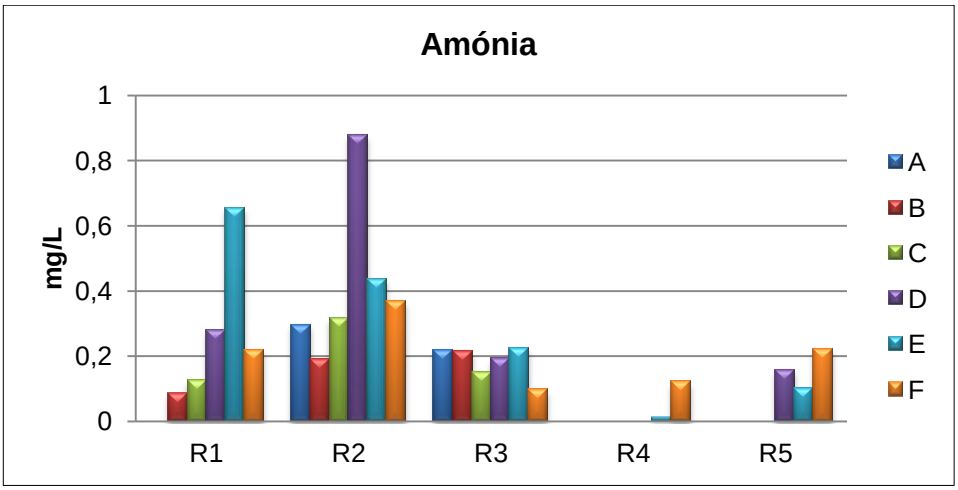


Figura 17: Progressão espácio-temporal da concentração de Amónia.

Analisando a **figura 17**, verifica-se que nas 3 primeiras recolhas foram encontradas concentrações de amónia em todos os pontos, sendo que na recolha 1 o máximo foi no ponto E e na recolha 2 o máximo foi no ponto D.

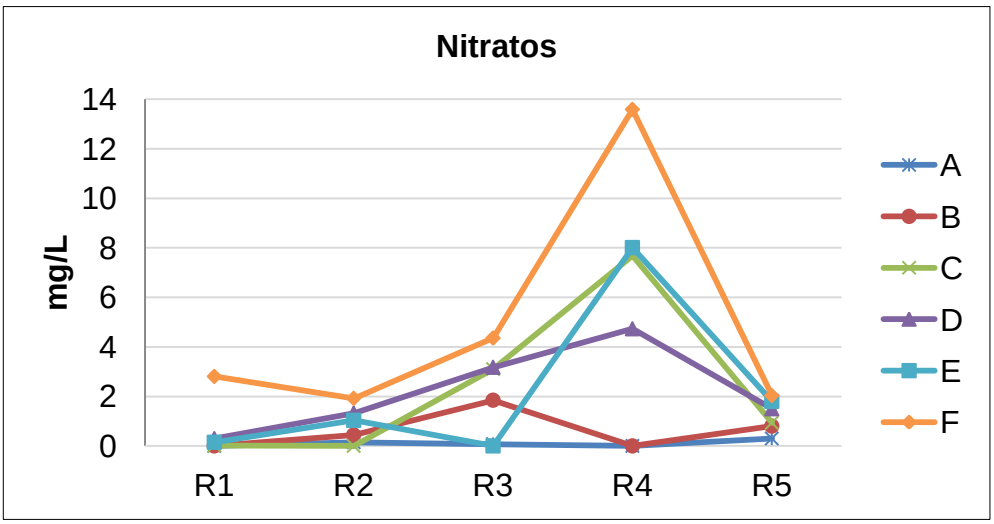


Figura 18**: Progressão espácio-temporal da concentração de nitratos.**

No caso dos nitratos, é na recolha 4 que se encontram maiores valores de por litro em todos os pontos analisados. Apesar de não chegar aos máximos propostos pelo INAG, 25 mg/L, os valores da concentração de nitratos, especialmente no ponto F, tem é bastante elevada, tendo um pico de 13,59 mg/L na recolha 4. Os pontos C e E tiveram os dois valores próximos das 8 mg/L. O aumento que se verificou entre as recolhas 3 e 4 não é semelhante a mais nenhuma variação de nenhum outro parâmetro físico-químico. Como seria de esperar, o ponto A apresenta valores de

nitratos muito baixos, o que coincide com massas de água não poluídas. Da mesma maneira se vê que o ponto B tem também valores baixos de concentração de nitratos, o que se mantem como esperado. No caso do ponto C, tem o pico mínimo na recolha 1 e 2, subindo até ao máximo na recolha 4. O ponto D parte de uma concentração baixa na recolha 1 e tem um aumento progressivo até à recolha 4. No caso do ponto E, tem diversas oscilações ao longo das 5 recolhas, tendo o seu máximo também na recolha 4. Excetuando os ponto A e B, a recolha 4 representa o pico máximo em todos os pontos. A recolha 5 foi feita no mês de Maio, com tempo quente e seco, e com um caudal do rio mais reduzido. Foi nesta recolha que se registou a diminuição de todos os pontos para os seus valores mais baixos, com exceção do ponto B.

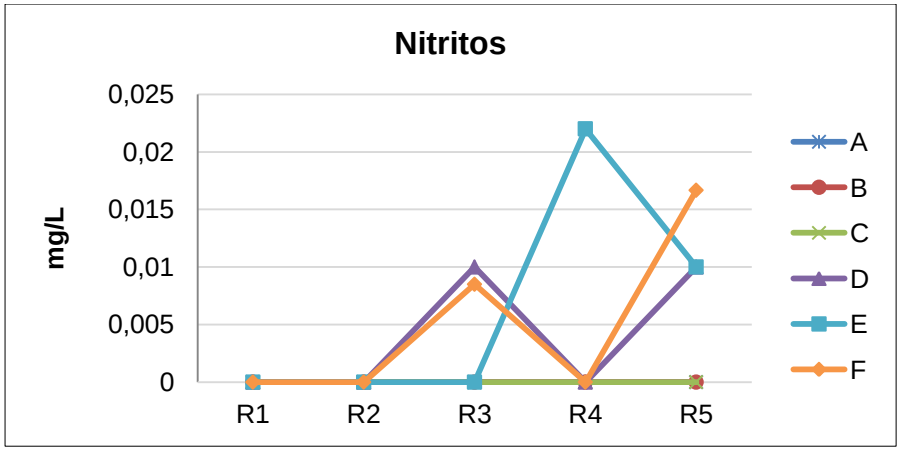


Figura 19: Progressão espácio-temporal da concentração de Nitritos.

No caso dos pontos analisados para a concentração de nitritos (**fig. 19**), apenas foram detetados nitritos nos pontos D, E e F, em cujo valor mais alto foi de 0,02 mg/l. Efetivamente, estes valores são muito baixos para se poder considerar significativo, sendo interessante destacar que o máximo do ponto E foi na recolha 4 e dos pontos D e F foi na recolha 5, recolha que apresentou os valores mais baixos em todos os outros parâmetros.

3.1.6.2- Fosfatos

Os dados que se seguem (**fig. 20**) referem-se aos fosfatos, mas vai-se fazer o cálculo de conversão e ver se está dentro do estado ecológico de “bom”.

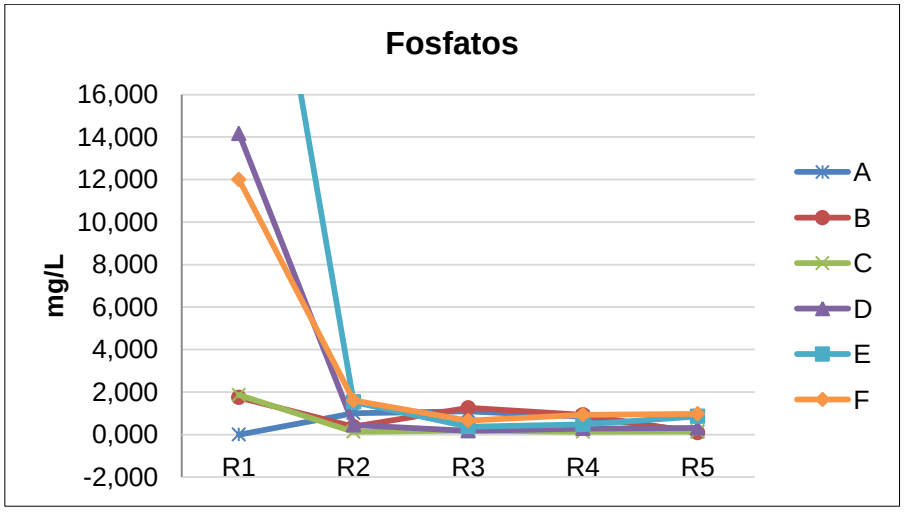


Figura 20: Progressão espácio-temporal da concentração de Fosfatos.

Para se poder interpretar as concentrações de fosfatos obtidas, foi necessário limitar a escala do gráfico. O valor mais alto de fosfatos foi detetado no ponto E sendo que atingiu os 33 mg/L. Na recolha 1 foi onde se encontraram os valores mais elevados de fosfatos, sendo que o ponto D e F obtiveram uma concentração de 14 mg/L e 12 mg/L, respetivamente. Na recolha 2, os valores baixaram abruptamente para valores entre os 0,13 e os 1,60 mg/L, sendo que o valor mais alto se situou no ponto F. Em mais nenhuma recolha voltaram a subir para valores acima de 1,60 mg/L. Se se multiplicar os valores de fosfatos pelo quociente 0,326 (segundo o protocolo da Hanna), estão encontrados os valores da concentração de fósforo.

Tabela 11: Concentrações de Fósforo recolhidas por ponto e por recolha e a média anual.

Fosforo	R1	R2	R3	R4	R5	Média
A	0,000	0,329	0,354	0,272	0,043	0,200
B	0,569	0,120	0,409	0,302	0,028	0,285
C	0,606	0,043	0,063	0,043	0,048	0,161
D	4,618	0,147	0,057	0,092	0,101	1,003
E	10,758	0,500	0,121	0,155	0,279	2,363
F	3,912	0,522	0,214	0,304	0,318	1,054

2- Macroinvertebrados

As recolhas de macroinvertebrados foram feitas na primeira recolha, primavera, na terceira recolha, outono, e na quinta recolha, primavera. Estas épocas do ano foram escolhidas devido aos ciclos de vida dos invertebrados. Foram feitas em espaços de mais ou menos 2 m de comprimento e 1,30 m de largura, o que perfaz uma área de 2,6 m^2 por recolha.

Para avaliar a qualidade do rio, foram feitos vários índices, com especificidades diferentes mas que num conjunto nos dão o panorama da qualidade do rio em geral e nos diferentes pontos em específico.

Começando por analisar o número total de indivíduos contabilizados nas 3 recolhas, o que se verifica é que houve um ligeiro aumento no total dos indivíduos da primavera para o outono e um aumento muito acentuado do outono para a última primavera. Na figura 20 estão presentes as percentagens das 15 ordens taxonómicas nos 6 pontos ao longo das recolhas. O número total de indivíduos que foram identificados por recolha foram 1850 na primeira primavera, 1113 na recolha de outona e de 3627 na última recolha.

No geral, o que se destaca é predominância da Ordem Díptera seguida da ordem Ephemeroptera. A ordem Oliocheta está presente em todos os pontos com percentagens variáveis, sendo mais abundante no ponto E na recolha da primavera recolha 1, com 23%, e na recolha de outono, com 17%. A ordem Ephemeroptera está ausente apenas na última primavera, recolha 5, no ponto E. Os pontos B e C são os que registam menor variabilidade e uma maior percentagem de Díptera em relação às outras ordens. As ordens Odonata e Plecóptera concentram-se no ponto A. O ponto D tem uma percentagem elevada de Gastrópodes nas 3 recolhas assim como uma crescente percentagem de Bivalves.

Tabela 12: Número de indivíduos nos diferentes pontos ao longo das 3 recolhas

	A	B	C	D	E	F
Primavera (R1)	954	88	29	329	79	371
Outono (R3)	128	57	57	283	139	449
Primavera (R5)	236	1817	200	1140	36	198

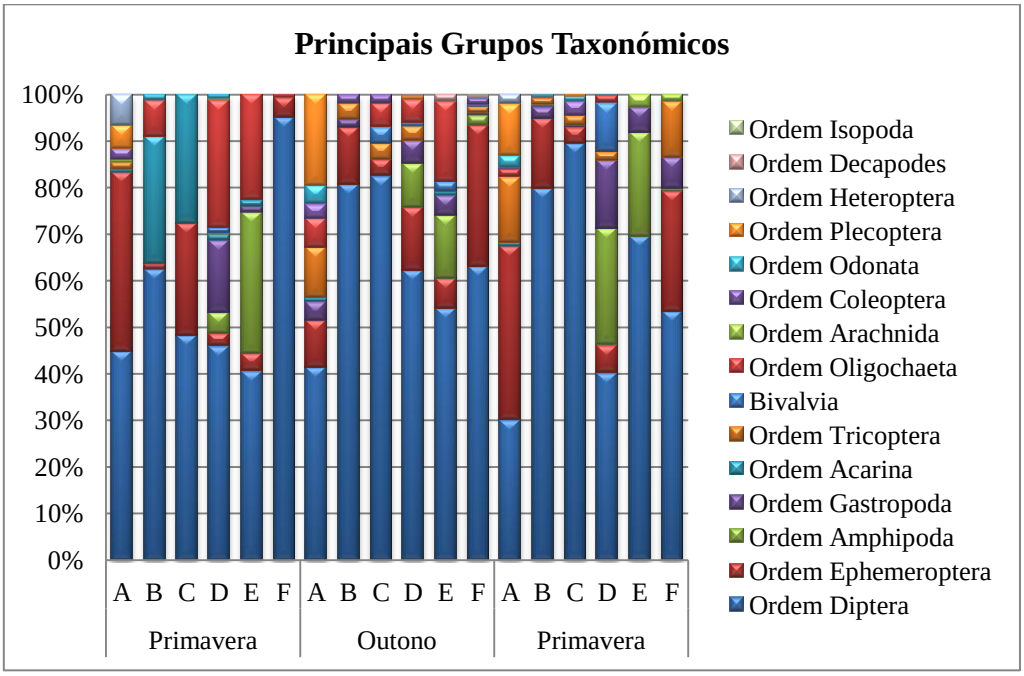


Figura 21: Progressão espácio-temporal dos principais grupos taxonómicos identificados nas amostras.

Os bivalves que foram identificados eram todos da mesma família, até então não registada na bacia hidrográfica do rio Ave, *Corbicula* (Rosa *et al.*, 2011). Este bivalve foi encontrado essencialmente no ponto D, sendo que na recolha de Outono, recolha 3, foram encontrados alguns indivíduos nos ponto C e E. Registou-se um aumento na população de *Corbicula* ao longo das 3 recolhas no ponto D, o que se pode verificar com o aumento dos indivíduos identificados principalmente da recolha de outono para a recolha de primavera.

Em termos de distribuição de indivíduos pelos pontos, os que registaram menor número foram os pontos B na recolha 1 e recolha 3, o ponto C na recolha 1 e recolha 2, e o ponto E na recolha 1 e recolha 5. Na última recolha houve um incremento de indivíduos nos pontos B e C significativo, tendo passado de contagens na ordem das dezenas para a ordem das centenas, no ponto C, ou na ordem dos milhares, no ponto B. Neste último ponto, verificou-se, não só um aumento do número de indivíduos, como do número de famílias encontradas, acontecendo o mesmo com o ponto C. Os pontos D e F apresentaram em todas recolhas um número elevado total de indivíduos, sendo que o ponto D apresentou sempre um grande número de famílias identificadas.

Foram encontrados no ponto F Thricopteros, todos eles da família *Hydropsichydae*, Ephemeropteras, das famílias *Canidae*, *Baetidae* e *Leptophlebidae*. Os Gastrópodes encontrados eram essencialmente *Bithyniidae* e *Hydrobiidae*. Em relação aos Díptera, a grande maioria pertencia à família dos *Chironomidae*. Apesar do elevado número de indivíduos da família *Chironomidae*, foram identificados

indivíduos de outras famílias, como os *Simuliidae*, *Dixidae* e *Empididae*, sendo que na recolha 3 a família *Simuliidae* teve um elevado número de indivíduos.

No caso do ponto E o que se encontrou foi essencialmente *Chironomidae*, Oligochetas e Amphipoda (*Gammaridae*).

No ponto D, para além da família *Corbicula*, na ordem dos Gastropodes foram identificados essencialmente *Bithyniidae* e *Hydrobiidae,* apesar de na recolha 5 os indivíduos identificados como *Viviparidae* tiveram uma abundância significativa. Na ordem Díptera na sua maioria eram *Chironomidae*, mas na recolha 3 como se contaram invertebrados da família *Simoliidae*, assim também na recolha 5 foram identificados mais indivíduos das famílias *Cerotopogonidae* e *Tipulidae*. No que diz respeito à ordem Ephemeroptera, foram identificadas em todas as recolhas *Canidae*, sendo que na recolha 3 forma detetados *Baetidae* e na recolha 5 *Ephemerella* foram identificados com valores significativos. Foram encontrados *Gammaridae* nas 3 recolhas assim como Oligochaetas.

O ponto C, foram detetados, na sua maioria, *Chironomidae* e Oligochaetas. As Ephmeropteras contabilizadas, entre os 2 e 7, eram da família *Canidae*. Na recolha 5 foram identificados 6 Coleoptera, 4 *Elmidae* e 2 *Dryopidae*.

No ponto B, na recolha 1 e recolha 3 os totais de indivíduos foi de 57 e 88, respetivamente, passando na recolha 5 para os 1817 indivíduos. Deste total, 1381 eram *Chironomidae*, representando uma grande parte dos indivíduos identificados. A segunda ordem com mais indivíduos, Ephemeroptera, era na sua grande maioria da família *Caenidae* e *Baetidae,* em valores superiores a 100 indivíduos. Foram identificados Tricoptera, essencialmente *Hydroptilidae* e *Leptoceridae*, mas na ordem dos 10 indivíduos. Também foram identificados alguns Gastropodes, que não tinham sido detetados nas outras recolhas, assim como apenas 1 indivíduo da família *Gerridae* da ordem Hetroptera recolha 5.

O ponto A foi em todas as recolhas aquele que apresentou maior número de famílias identificadas e teve uma consistência ao longo do tempo. Neste ponto, os *Chironomidae* foram identificados mas em menor abundância, sendo que as contagens de Ephemeropteras eram superiores aos Díptera. Desta ordem de macroinvertebrados foram identificadas famílias como *Cerotopogonidade* e *Limonidae* em valores significativos para o total de indivíduos em quantidades que apesar de serem mais baixas que as contagens de *Chironomidae*, apresentam uma diversidade dentro desta ordem até então não verificada. Os Ephemeroptera encontrados neste ponto eram essencial mente Leptophlebiidae. Foram identificados indivíduos da família Hetropteros, juntamente com Colepteras, Tricopteras e Plecopteras. Dos Hepteroptera, foram identificados *Gerridae* e *Corixidae*, sendo que apenas se

identificou um *Gerridade* na recolha 1, apenas 1 indivíduo. No caso dos Coleoptera foram identificados famílias como *Dytiscidae* e *Elmidae*. Para os Tricoptera foram essencialmente identificados *Polycentropodidae, Serycostomatidae, Hydroptilidae* e *Limnephilidae,* mais uma vez, uma maior diversidade de famílias que nos outros pontos. Na ordem Plecoptera foram identificados invertebrados das famílias *Taniopterigidae*, *Capnidae* e *Leuctricidae*.

2.1- Percentagem de Ephemeropteras Trircopteras e Plecopteras

O índice de EPT é um índice que se baseia nas contagens dos indivíduos pertencentes a estas ordens, Ephemeroptera, Plecoptera e Tricoptera em relação ao total dos indivíduos contabilizados. Este índice é considerado um indicador de boa qualidade uma vez que estas ordens são consideradas as mais sensíveis à poluição (Mandaville, 2002). Apesar disso, há famílias de Ephemeroptera, como os *Caenidae* e os *Baetidae*, estão descritos como sendo resistentes à poluição (Mandaville, 1993).

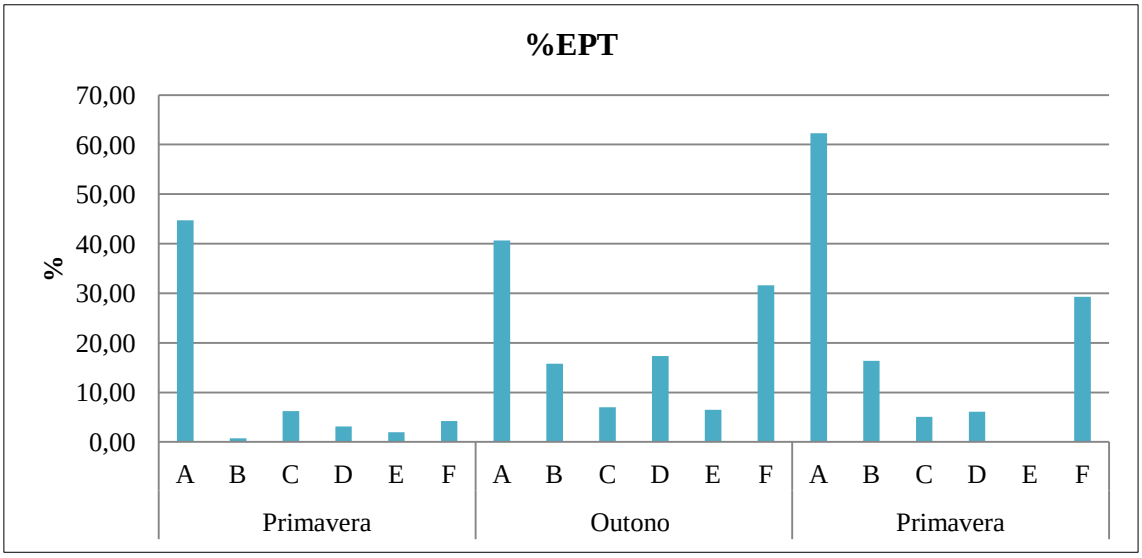


Figura 22: Progressão espácio-temporal da percentagem de EPT

Este índice vai variar conforme varia o número de indivíduos destas ordens taxonómicas. Sendo que estas ordens são as mais sensíveis a poluição, em teoria, conforme a qualidade da água decai, o índice apresentará valores mais baixos.

Observando a **figura 22** observa-se que em todas as recolhas as maior percentagem de EPT localizou-se no ponto A, o que seria de prever, uma vez que este será o ponto sem qualquer poluição associada. O valor mais alto é detetado na última recolha, em que a %EPT ultrapassa os 60%. Na recolha 1 o ponto B apresenta uma percentagem de EPT de 0, sendo que nas outras recolhas apresenta valores acima

dos 10%. Na recolha 3, outono, estes valores são mais elevados que nas outras recolhas, com exceção do ponto A. Estas oscilações devem-se ao número de Tricopteras e Ephemeropteras, uma vez que os Plecopetera não estão presentes nestes pontos. Este facto explica os valores elevados do ponto F nas recolhas 3 e 5, outono e primavera, pois neste ponto, nestas duas recolhas foram encontrados um número elevado de Ephemeroptera e Tricoptera sem casulo. Com efeito, a ordem mais sensível à turvação e alterações das condições do meio são os Plecoptera, daí serem usados como indicadores de boa qualidade.

2.2- Proporção de EPT e *Chironomidae* (EPT/C)

O cálculo vai fazer do EPT/C vai dar um balanço entre as comunidades. Uma vez que o EPT é um indicador de boa qualidade por as ordens presentes serem as mais sensíveis à poluição, os *Chironomidae* é uma das famílias mais resistentes à poluição (Czerniawska-Kusza, 2005). Assim sendo, este índice vai indicar se uma comunidade se encontra em boas condições bióticas, sendo que se esta estiver em boas condições bióticas vai apresentar uma distribuição equilibrada entre estes 4 grupos, sendo que no caso de se verificarem números desproporcionalmente elevados de *Chironomidae* pode ser um indicar de *stress* biótico. Assim sendo, quanto mais baixo o valor de EPT/C maior é indicação de que esse local se encontra em situação de *stress* biótico.

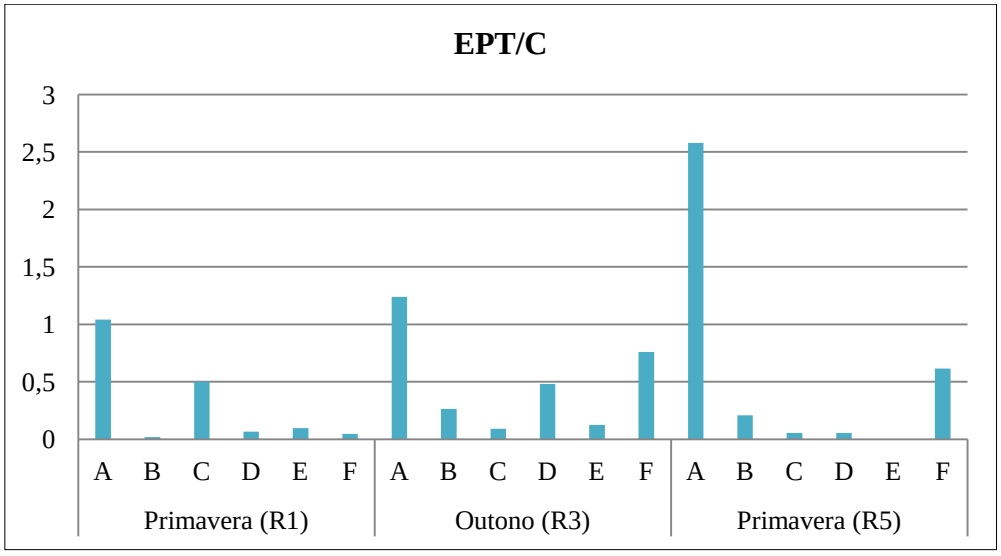


Figura 23: Progressão espácio-temporal a razão EPT/C

Analisando a **figura 23** verifica-se que os valores mais elevados são efetivamente no ponto 1, onde o valor mais alto, na recolha 5, é superior a 2,5. O ponto B mantem o valor de EPT/C baixo, apesar de subir da recolha 1 para a 3,

mantem valores muito abaixo de 1. Pelo contrário no ponto C parte de um valor perto de 0,5 e desce para valores muito baixos nas outras duas recolhas. O ponto D tem valores perto de 0,5 na recolha 3, ma volta a descer para valores muito baixos. O ponto E mantem valores muito baixos, chegando a 0 zero na recolha 5. O ponto F é um caso de interesse. Esta parte de valores muito baixos, para valores acima de 0,5, descendo ligeiramente na recolha 5, mantendo-se acima de 0,5.

2.3- Percentagem de Ephemeroptera Tricoptera e Odonata (ETO)

O princípio do cálculo do índice ETO é idêntico ao do índice de EPT. Uma vez que os Ephemeroptera, os Tricoptera e os Odonata estão descritos como sendo famílias de macroinvertebrados intolerantes à poluição, este índice vai dar uma noção dos locais de melhor qualidade.

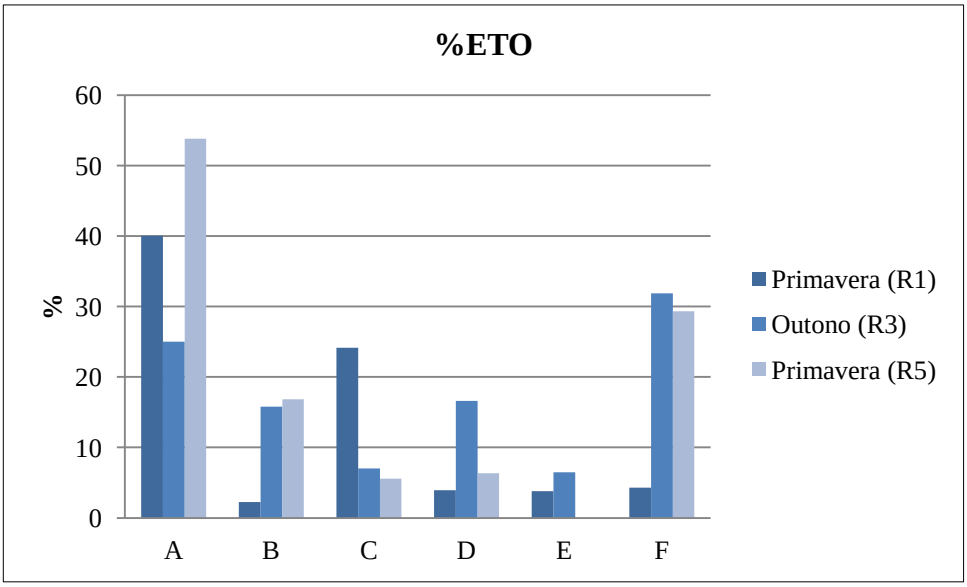


Figura 24: Progressão espácio-temporal da percentagem de ETO

As percentagens mais elevadas mantêm-se no ponto A, o que seria de esperar uma vez que é um ponto sem interferência de poluição. As percentagens que se desviam mais ao esperado são os valores no ponto B na recolha 3 e recolha 5, no ponto C na recolha 3 e no ponto C na recolha 3 e recolha 5. Apesar disso corres podem às percentagens que se verificavam no índice EPT, com exceção do ponto C, que apresenta um pico que na recolha 1 que não se verificou no EPT.

2.4- Percentagem da contribuição da família dominante ou percentagem de dominância (DF%)

Esta percentagem vai ser igual à abundância da família mais bem representada na comunidade relativamente ao valor total dos indivíduos contados. Este índice é importante para demonstrar a situação presente na comunidade analisada ao nível das famílias. Desta forma, se o valor de DF for muito elevado significa que uma grande percentagem de indivíduos encontrados naquele local pertence àquela família, demonstrando que a diversidade dentro da comunidade é baixa, indicando um caso de possível *stress* sobre a comunidade em estudo.

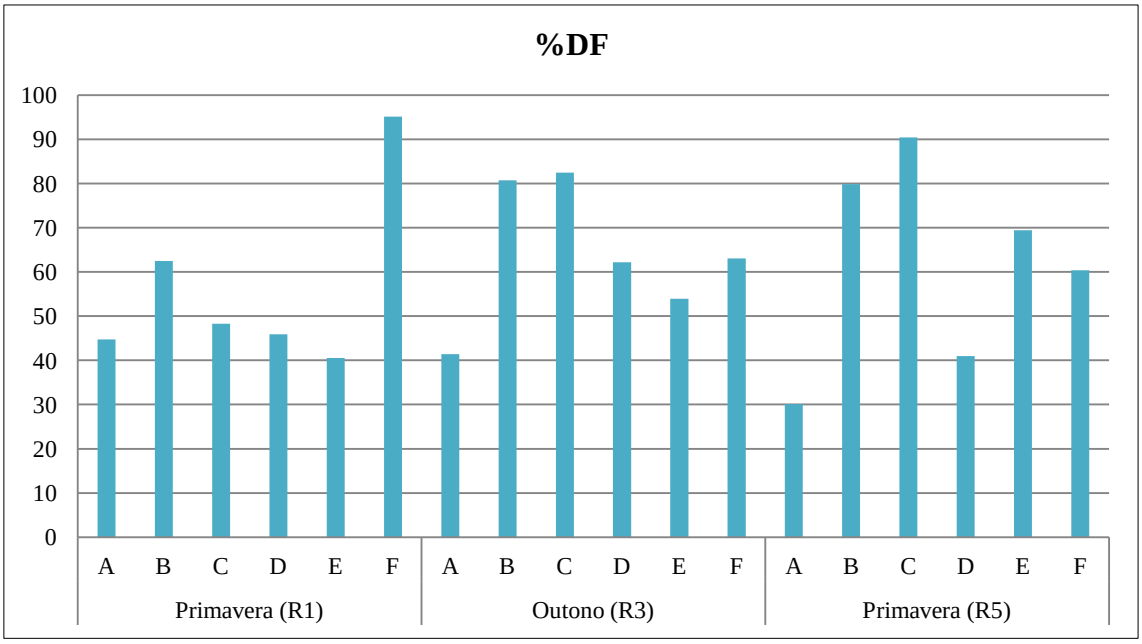


Figura 25: Progressão espácio-temporal da percentagem da família dominante

Este índice permite ter uma ideia da diversidade da comunidade que se está a estudar. Olhando para o gráfico da **figura 25** pode-se verificar que os valores mais baixos em todas as recolhas é o ponto A. O pico maior e na recolha 1 no ponto F, em que a família dominante corresponde a cerca de 95% da população total. O ponto B apresenta valores elevados, sendo que chega a valores superiores a 80%. Valores acima de 50% podem indicar uma perturbação importante no ecossistema, colocando as comunidades em situação de *stress*. O ponto D apresenta valores perto dos 40% na recolha 1 e 5 e valores acima de 60% na recolha 3.

2.5- Índice de Diversidade de Shannon-Wiener

O índice de Diversidade de Shannon-Wiener tem como objetivo analisar a diversidade de uma comunidade. Este índice é usado para o estudo de diversidade de diferentes tipos de comunidades e é um dos índices mais usados para o estudo da diversidade de macroinvertebrados. Este índice vai permitir saber se uma população se encontra em estado estável ou em stress, sendo que, segundo vários autores (Ravera, 2001), uma população em equilíbrio apresenta um elevado índice de diversidade, enquanto que uma população perturbada tem uma baixa diversidade, uma vez que apenas os taxa com uma maior capacidade de resistência a stress prevalecem.

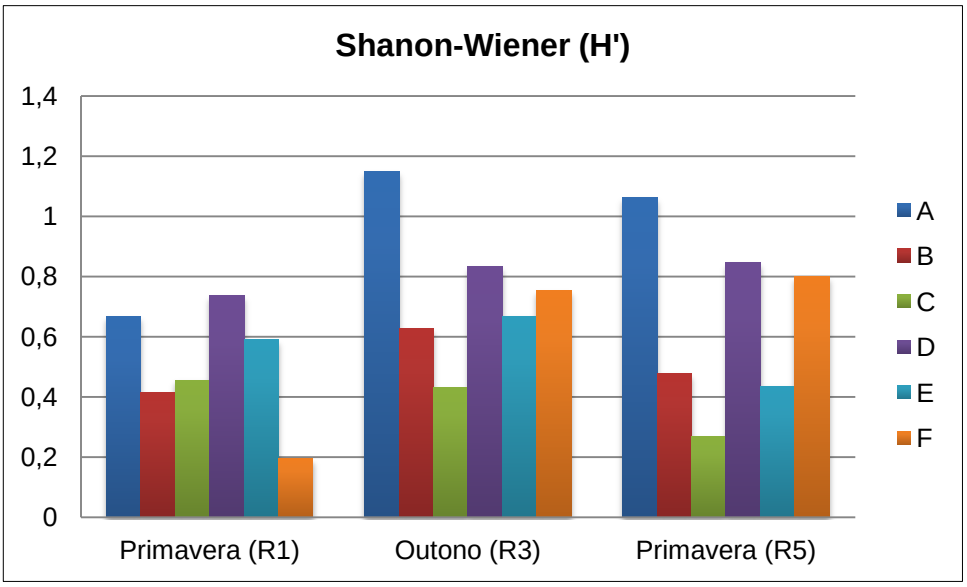


Figura 26: Progressão espácio-temporal do índice de Shannon-Wiener

Analisando o gráfico da **figura 26**, em primeiro lugar, o que se destaca é o facto de os valores não ultrapassarem os valares de 1,1. À partida, o que se pode dizer é que há uma baixa diversidade em todos os pontos analisados, em todas a recolhas feitas.

Olhando especificamente para os valores atribuídos a cada ponto, verifica-se que em toda a recolha 1, os valores não chegam ao 1, que é associado a águas ligeiramente poluídas. Mesmo tendo valores abaixo de 1, o ponto que apresenta maior diversidade é o ponto D, seguido pelo ponto A. O ponto E apresenta um valor de diversidade mais elevado que os pontos B, C e F, sendo que o ponto com menor diversidade é o ponto F. Analisando a recolha 3, o que verifica é que o ponto A é aquele que apresente maior índice de diversidade, como era esperado, mas mesmo

assim, o valor é de 1,15, o que é um valor baixo de diversidade. Mimetizando o verificado na recolha anterior, o ponto D apresenta o segundo valor de diversidade mais elevado. Apenas o ponto C não regista um aumento da diversidade, verificando um ligeiro decréscimo. Todos os outros pontos registaram um aumento da diversidade, sendo a mais expressiva o aumento da diversidade no ponto F da primeira recolha para a segunda. O ponto E apresenta um índice de diversidade ligeiramente mais elevado que o ponto B. Na última recolha foi onde se verificou as variações mais expressivas. O ponto com maior diversidade continua a ser o ponto A, seguido do ponto D. O ponto F tem o terceiro valor mais elevado de diversidade, tendo um ligeiro incremento em relação à recolha anterior. O ponto B apresenta um valor de diversidade visivelmente mais baixo que no ponto F, mas ligeiramente mais elevado que o ponto E. O ponto C é o que apresenta um índice de diversidade mais baixo.

2.6- Índice Uniformidade de Pielou

O índice de Pielou é um dos muitos índices de uniformidade existentes. Assumindo que o intervalo de estudo deste índice é entre 0 e 1, a uniformidade de uma comunidade é tanto maior quanto mais próximo de 1 se encontrar o valor deste índice. Quanto mais perto de 0 se situar o valor obtido, maior a discrepância entre a abundancia entre a diferente taxa que compõem a comunidade. No caso deste trabalho, este índice vai demonstrar o nível de uniformidade entre as diferentes famílias que constituem as comunidades.

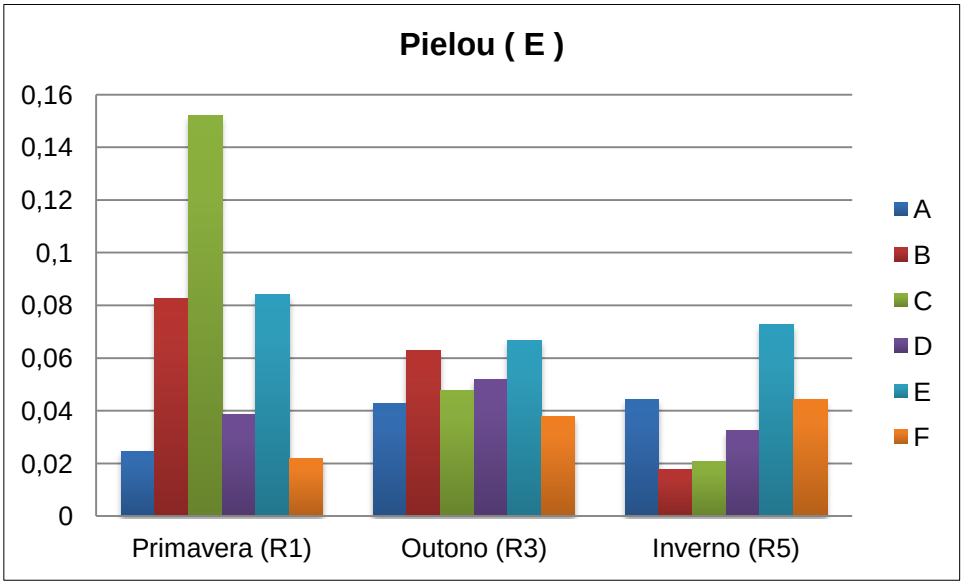


Figura 27: Progressão espácio-temporal do índice de Pielou.

Tal como se verificou com o índice de Shannon-Wiener, os valores deste índice nas três recolhas e em todos os pontos é muito baixo, sendo que o valor mais alto se verifica na recolha 1 no ponto C e não ultrapassa os 0,15.

Na recolha 1, o valor mais baixo verificado é no ponto A, sendo quase igual ao valor do ponto F. O ponto B e E apresentam valores idênticos, com o ponto C a registar valores ligeiramente mais elevados. O ponto C é o que apresenta o valor máximo registado para este índice. O ponto D tem valores ligeiramente abaixo de 0,04.

Na recolha 3, apenas o ponto B e E ultrapassam os 0,06. Embora todos os outros pontos tenham registado valores superiores aos registados na recolha anterior, com exceção do ponto C que verificou uma grande diminuição da uniformidade. Assim sendo, o ponto F é apenas ligeiramente mais baixo que no ponto A e do ponto C para o D verifica-se um aumento de 0,045 para 0,052.

Na última recolha, o ponto que expressa um valor de uniformidade maior é o ponto E, 0,07, seguido do ponto A e F, com o mesmo valor, 0,044. Do ponto B ao D observa-se uma progressão na uniformidade, com valores de 0,018, 0,020 e 0,033, respetivamente.

2.7- Índices IBMWP (Iberia Biological Monitoring Working Party) ASPT (Average Score Per Taxon) e IBB (Belgian Biotic Index)

Estes índices são os mais comuns de se usar para o estudo de macroinvertebrados como um indicador biótico de qualidade em uma massa de água.

O IBMWP é uma adaptação para a Península Ibérica do índice BMWP. Este índice necessita de especificação até ao nível da família, com exceção da ordem Oligochaeta. É um índice que pretende ser um indicador das alterações num determinado local analisado, como o aumento da contaminação. Este índice atribui um valor, que vai de 1 a 10, a diferentes famílias conforme a sua capacidade de resistência á poluição, sendo que as famílias marcadas com 10 valores são as mais sensíveis à poluição e as marcadas com 1 as mais resistentes a situações de *stress* (**tab. 32 no Anexo IV**).

O ASPT é a média do valor obtido pelo BMWP pelo número de taxa identificados. Não se podendo chamar um índice, é a adaptação do índice BMWP às especificidades da mostra. Este cálculo vai permitir que a atribuição de qualidade do BMWP seja ajustada às dimensões da amostra, sendo que uma amostra com um número total de indivíduos baixo não vai sofrer uma diminuição da qualidade por ter

menos famílias identificadas, uma vez que essas famílias até podem fazer parte das famílias com maior pontuação.

O índice IBB é um índice que caiu em desuso por ter muitas interferências que podem adulterar o valor atribuído à qualidade. Este índice possui uma espécie de chave de correlações, em que indica a pontuação a atribuir a determinadas famílias ou mesmo ordens, indicando aquelas famílias que devem ser incluídas ou excluídas. O valor correspondente à qualidade é atribuído conforme o número de unidades sistemáticas encontradas de cada uma das ordens, variando entre 10, qualidade excelente, e 0, extremamente poluído (**tab. 31 no Anexo IV**).

Para melhor interpretação destes índices, foi atribuída uma cor a cada intervalo que delimita a qualidade (**tab. 29 e 34 no Anexo IV**). O IBMWP e o IBB têm uma escala de 5 cores, sendo que o laranja é um intermédio entre o fracamente poluído e o fortemente poluído. No caso do ASPT, foram-lhe atribuídas apenas 4 cores.

Tabela 13: Progressão dos 3 índices bióticos nas 3 recolhas nos 6 pontos.

	Primavera (R1)			Outono (R3)			Primavera (R5)		
	IBB	IBMWP	IASPT	IBB	IBMWP	IASPT	IBB	IBMWP	IASPT
Ponto A	10	169	6,3	10	159	5,89	10	179	7,46
Ponto B	4	25	5	6	45	4,5	9	122	4,5
Ponto C	4	10	3,3	5	32	3,6	6	56	4,3
Ponto D	9	79	4,2	8	68	4,3	8	89	3,4
Ponto E	5	24	3,4	7	40	4	3	18	3
Ponto F	7	33	3,7	8	89	4,5	7	58	3,2

Analisando o resultado dos diferentes índices, o que se verifica é que estes nem sempre são concordantes. O facto de o ASPT não ter um intermédio entre o poluído e o extremamente poluído, a variação entre o amarelo e o vermelho ou o laranja e o vermelho não é propriamente uma inconsistência.

Em termos gerais, o índice com uma maior probabilidade de erros é o IBB, o que se pode constatar ao analisar a tabela, em locais como o ponto C na recolha 1 e recolha 3. O facto de o número de famílias não ser igual em todas as amostras, havendo amostras, como a amostra na recolha 1 do ponto B, que tinha um total de 5 famílias, ou o caso do ponto C na mesma recolha que tinha 3 famílias identificadas, está expresso no ASPT, daí as variações, em alguns caso grandes entre o IBMWP e o ASPT.

Ao olhar para a **tabela 13**, verifica-se que houve uma coerência em considerar o ponto A como o ponto sem poluição nas três recolhas.

O ponto B, na recolha 1, sofre a um aumento da qualidade devido à relação do valor de IBMWP com o número de famílias identificadas. O baixo valor deste índice não se deve a não ter famílias típicas de águas de boa qualidade, ou ter muitas famílias muito resistentes, mas por ter tido um número total de indivíduos muito baixo, 88, e terem sido identificadas apenas 3 famílias. Na recolha 3 há uma coerência em considerar este ponto como poluído. No caso da recolha 5, a variação entre o IBMWP teve o mesmo motivo, mas por razões contrárias. Neste ponto na última recolha foram contabilizados 1817 indivíduos e identificadas 27 famílias. O valor do IBMWP não se deve ao facto de ter muitas famílias com elevada pontuação, mas por ter muitas com pontuação mais baixa que ao somar dei um valor de IBMWP elevado. Assim sendo há efetivamente um decréscimo da qualidade do ponto B da recolha 1 para A recolha 3, que se mantêm na recolha 5.

O ponto C, apesar de na recolha 1 se ter contabilizado um número muito baixo de indivíduos, 29, o ASPT não alterou a atribuição de extremamente poluído atribuída pelo IBMWP. Na recolha 3 esta diferença de atribuições não é muito relevante, uma vez que o ASPT não descrimina o muito poluído do extremamente poluído, sendo que a qualidade da água mantêm-se muito baixa neste ponto. Da recolha 3 para a recolha 5 houve um aumento da qualidade para poluído, sendo que houve concordância entre os três índices.

No ponto D e F, as discrepâncias entre índices deve-se à mesma razão que se verificou no ponto B na recolha 5. O número de indivíduos presentes nestes pontos foram sempre muito altos, assim como o número de famílias identificadas. Por essa razão os valores elevados do IBMWP deviam-se ao elevado número de famílias com baixa cotação e não a famílias com cotação máxima. Assim sendo a qualidade manteve-se baixa, na gama do poluído, passando a muito poluído na última recolha.

No caso do ponto E na recolha 1 não é uma diferença significativa, sendo que manteve o estatuto de poluído, ainda assim, esta variação tem o mesmo das anteriormente identificados. Uma vez que, como já referido, o ASPT não distingue o muito poluído do extremamente poluído, este valor de IBMWP que indica muito poluído estava no limite entre a designação de poluído e muito poluído. Na recolha 3, apesar do IBB lhe atribuir uma boa qualidade, o IBMWP são coerentes em atribuir uma conotação de poluído, continuando a apresentar a mesma qualidade que lhe tinha sido atribuída da recolha 1. Na última recolha a qualidade da água desceu para muito poluído, sendo que este valor de IBMWP era o limite mínimo entre o muito poluído e o extremamente poluído.

2.8- Índice Português de invertebrados no Norte

Este índice foi proposto pelo INAG na aplicação dos decretos da Diretiva Quadro da Água (DQA). Possui também 4 classes de qualidade com especificações para valores de fronteiros aprovados pela União Europeia (**tab. 25 Anexo IV**).

Para ser mais fácil de interpretar, atribuíram-se cores aos valores que se obtiveram do cálculo deste índice.

Tabela 14: Progressão espácio-temporal do índice Português de invertebrados do Norte

	Primavera (R1)	Outono (R3)	Primavera (R5)
A	1,23	1,14	1,49
B	0,30	0,48	0,82
C	0,43	0,29	0,37
D	0,48	0,60	0,57
E	0,27	0,40	0,14
F	0,40	0,86	0,81

Para as três recolhas, o ponto um foi considerado como tendo uma qualidade excelente, ultrapassando o valor estipulado para a designação de excelente, 0,88. O ponto B foi considerado razoável, tendo tido um aumento da qualidade para bom na recolha 5. Os pontos C, D e E foram demarcados como pertencendo à classe de qualidade de razoável em todas as recolhas. O ponto F foi marcado como razoável na primeira recolha, tendo tido um aumento da qualidade para valores considerados pertencente à classe de “Bom” na recolha 3 e recolha 5.

2.10- Grupos funcionais alimentares.

Para cumprir parte dos objetivos deste trabalho, foram estudados os grupos funcionais alimentares presentes em cada um dos pontos ao longo das 4 recolhas.

Com base na identificação usada por Teresa Jesus (2008) (**tab. 37 no Anexo VI**) fez-se um levamento dos indivíduos existentes em cada ponto nas diferentes recolhas, nos 6 pontos que se analisaram, separando-os em gráficos de forma a poder identificar os grupos funcionais que se encontravam em maior abundância nos diferentes pontos e ao longo do tempo.

Esta identificação foi feita a nível das famílias de macroinvertebrados, sendo que dentro da mesma ordem, diferentes famílias apresentam estratégias alimentares diferentes, podendo em haver estratégias alimentares diferentes dentro da mesma

família. Os 18 gráficos de queijos a baixos apresentados mostram a distribuição dos diferentes grupos funcionais dentro dos 6 pontos nas 3 recolhas.

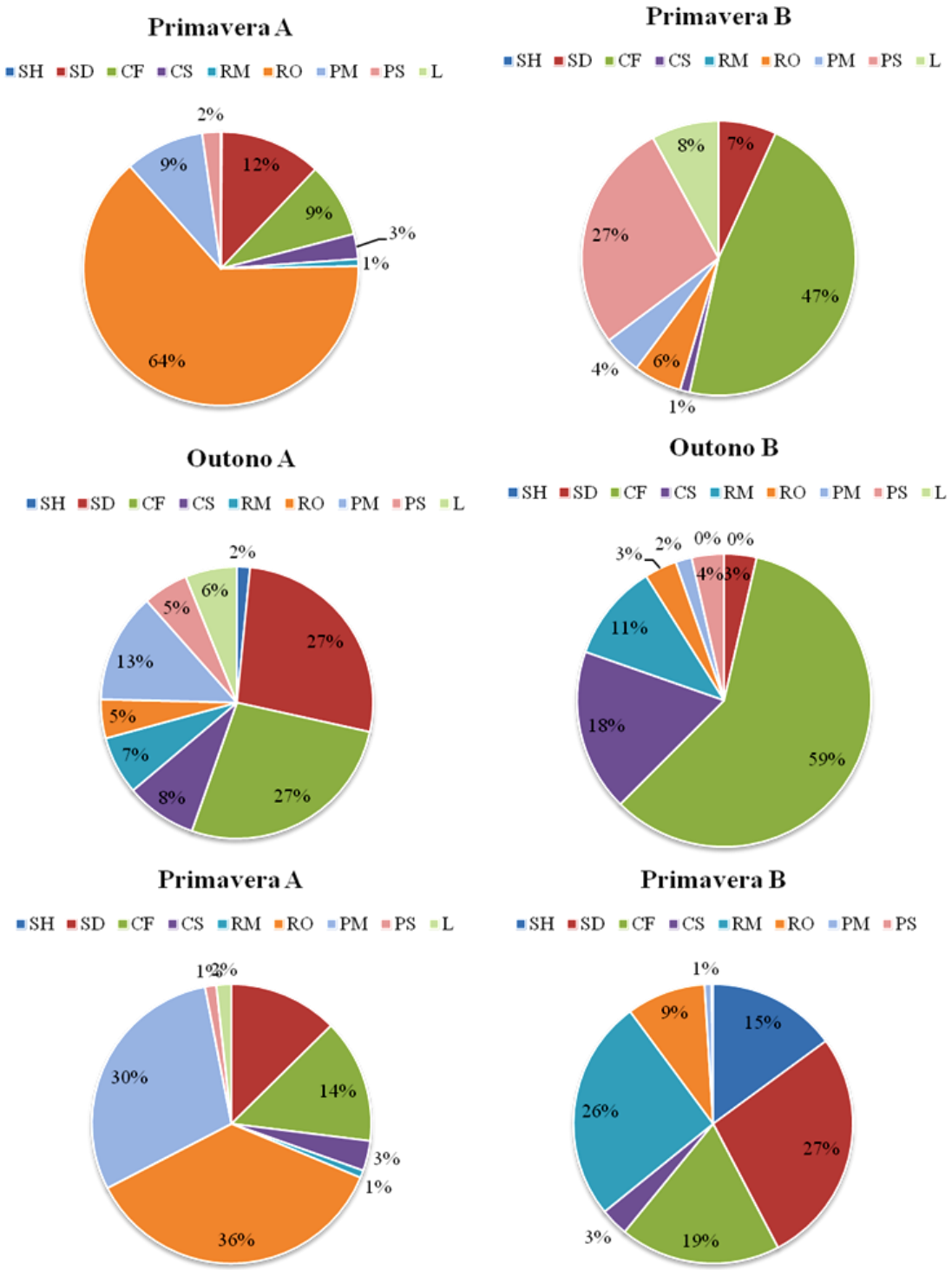


Figura 8: Apresentação dos 3 gráficos circulares do ponto A e B. As iniciais que indicam os diferentes grupos funcionais representam: SH- retalhadores herbívoros, SD- retalhadores detritívoros, CF- coletores filtradores, CS - coletores detritívoros, RM- raspadores minerais, RO- raspadores orgânicos, PM- predadores mastigadores, PS- predadores sugadores, L-limívoros.

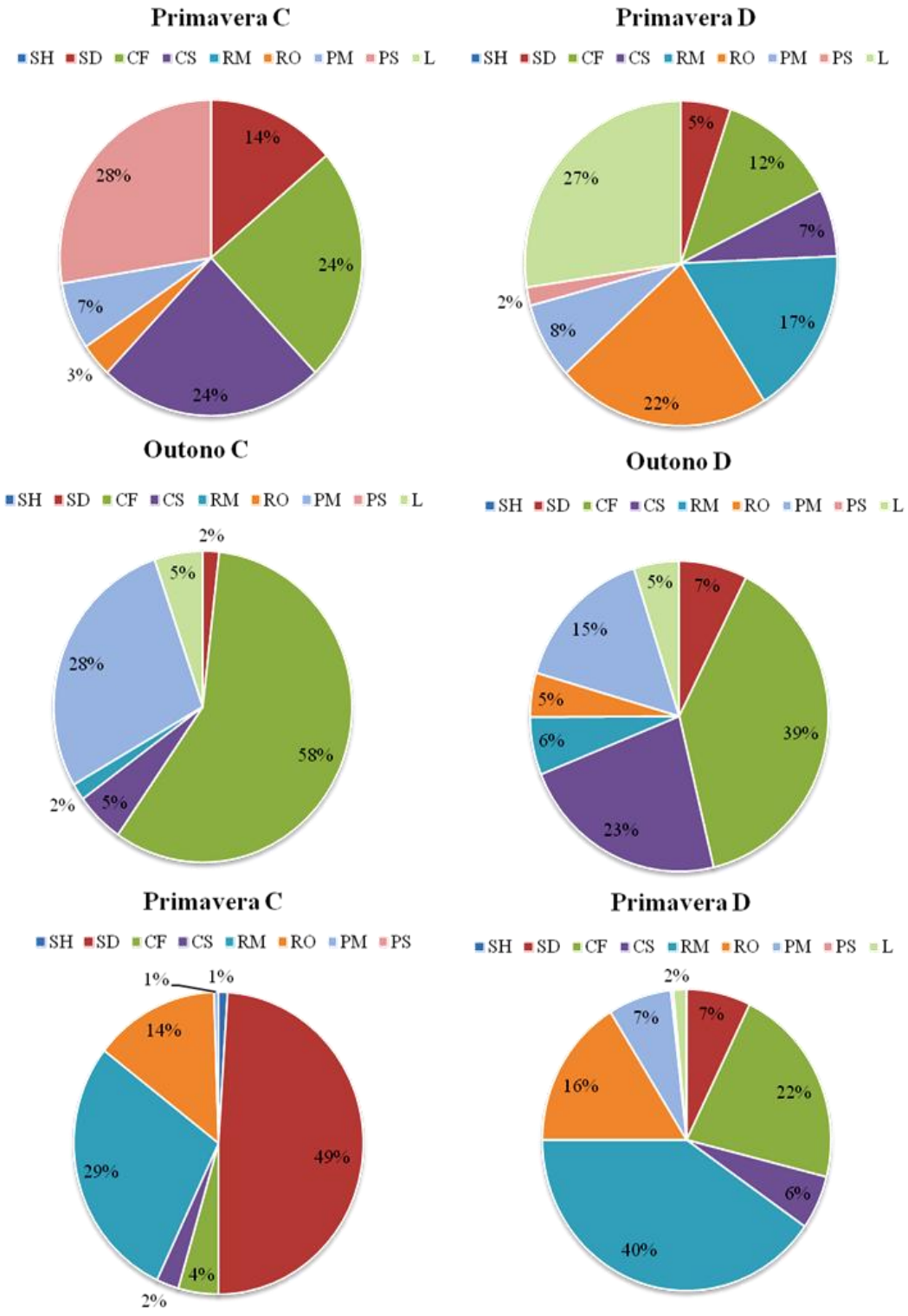


Figura 29: Apresentação dos 3 gráficos circulares correspondentes às 3 recolhas, nos pontos C e D. As iniciais que indicam os diferentes grupos funcionais representam: SH- retalhadores herbívoros, SD- retalhadores detritívoros, CF- coletores filtradores, CS- coletores detritívoros, RM- raspadores minerais, RO- raspadores orgânicos, PM- predadores mastigadores, PS- predadores sugadores, L-limnívoros.

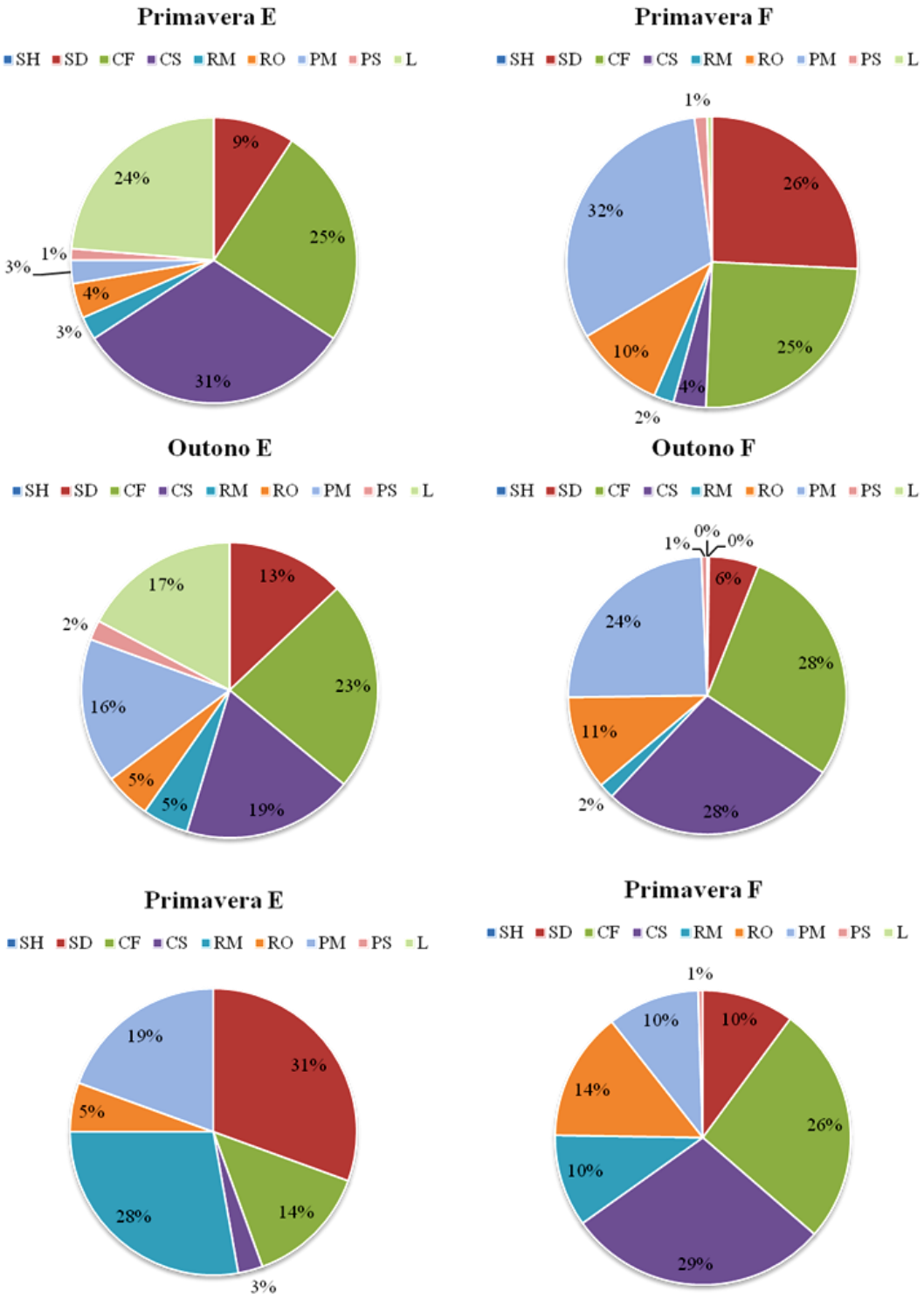


Figura 30: Apresentação dos 3 gráficos circulares correspondentes às 3 recolhas, nos pontos E e F. As iniciais que indicam os diferentes grupos funcionais representam: SH- retalhadores herbívoros, SD- retalhadores detritívoros, CF- coletores filtradores, CS- coletores detritívoros, RM- raspadores minerais, RO- raspadores orgânicos, PM- predadores mastigadores, PS- predadores sugadores, L-limnívoros.

No ponto A, na recolha 1 há uma inegável predominância de invertebrados com o grupo funcional trófico de raspadores orgânicos, o que não se verifica nas recolhas 3 e 5. Na recolha 3 verificou-se uma percentagem de 27% de raspadores detritívoros e 27% de raspadores filtradores, enquanto que na recolha 5 Há 30% de predadores mastigadores e 36% de raspadores orgânicos. Na recolha 3 há uma maior heterogeneidade de grupos funcionais alimentares, sendo que os predadores mastigadores têm uma incidência de 13% e os limívoros representam 6% da população e na recolha 5, este grupo funcional apresenta 2% de incidência. Analisando as três recolhas, o que se verifica é que há um aumento da recolha 1 para a 3 da incidência de coletores detritívoros, aumentando de 3% para 8% e voltando a descer para 3%, tendo um aumento sazona no outono e uma diminuição na primavera. O comportamento dos retalhadores detritívoros e dos coletores filtradores é idêntica, tendo aumentado para a recolha de outono e diminuído novamente para a segunda recolha de primavera para percentagens de indivíduos ligeiramente maiores que na primeira primavera. Por sua vez, o comportamento dos raspadores orgânicos é o contrário, diminuindo no outono. Os predadores mastigadores têm um comportamento de aumento ao longo das três recolhas.

No ponto B, o grupo funcional mais abundante na recolha 1 e 3 foi o dos coletores filtradores, com 47% na 1 e 59% na 3, tendo sofrido um decréscimo para 19% dos indivíduos. Na recolha 1, o segundo grupo mais abundante foi o dos predadores sugadores, enquanto que na recolha 3 foram os coletores detritívoros seguido de perto pelos predadores mastigadores. Apenas na recolha 1 se contabilizaram limnívoros. Na recolha 5, não houve um grupo que se destaca-se uma vez que uma vez que os grupos mais abundantes foram os retalhadores detritívoros com 27% dos indivíduos, seguido pelos retalhadores minerais com 26% e os coletores filtradores e retalhadores minerais, com uma abundância muito próxima, de 19% e 15%, respetivamente. Os predadores sugadores praticamente desapareceram recolha 3, não tendo sido detetados na recolha 5. Os coletores detritívoros tiveram um aumento de 1% na recolha 1 para 18% na recolha 3, voltando a descer para 3% na recolha 5. Os raspadores minerais não foram detetados na recolha 1, tendo apresentado uma incidência de 18% na recolha 3 e subindo para 26% na recolha 5. Os raspadores detritívoros tiveram uma incidência de 7% na recolha 1, diminuindo na recolha 3 para os 3% e voltando a aumentar para 27% da população deste ponto na recolha 5.

O ponto C na recolha 1 não apresenta um grupo alimentar dominante sobre os outros, sendo que três os grupos funcionais têm uma incidência idêntica, 28% dos predadores sugadores, 24% de coletores detritívoros e 24% de coletores filtradores,

seguidos de 14% de retalhadores detritívoros. Na recolha 3 houve uma clara dominância de coletores filtradores sobre os outros grupos, com uma incidência de 58% na população, seguido pelo grupo dos predadores mastigadores com 28%. Na recolha 5 os retalhadores detritívoros têm uma incidência de 49%, seguidos pelos raspadores minerais com 29% e dos raspadores orgânicos com 14%. Ao olhar para as três recolhas, os retalhadores detritívoros têm um decréscimo da primavera para outono, voltando a aumentar na segunda recolha de primavera para valores ainda maiores. Os raspadores orgânicos têm uma incidência de 3% na recolha 1, não tendo sido detetados no outono e voltando a ser identificados na segunda recolha de primavera, em 14% da população. Os coletores filtradores tiveram uma expressividade de 24% na recolha 1, aumentado a abundancia na recolha 3 e voltando a decair na recolha 5, para 4%. Os predadores sugadores foram identificados na recolha 1 e não foram mais detetados nas últimas duas recolhas.

No ponto D, na recolha 1 não houve um grupo que se destaca-se sobre os outros, sendo que se verificou uma incidência de 27% de limívoros, 22% de raspadores orgânicos, 17% de raspadores minerais e 12% de coletores filtradores. Na R3 oc coletores filtradores têm uma abundancia de 39%, seguido dos coletores detritívoros com 23% da população e pelos predadores mastigadores com 25%, não havendo uma dominância óbvia. Na recolha 5 os coletores filtradores tiveram uma incidência de 40%, seguida de 22% de retalhadores detritívoros e 16% de raspadores minerais. Nas 3 recolhas os limnívoros tiveram uma diminuição progressiva da recolha 1 para a 5. Os coletores filtradores tiveram uma percentagem de indivíduos na população de 12% na recolha 1, aumentando no outono, recolha 3, para 39% e desceu na recolha 5 para 6%. Os coletores detritívoros tiveram um aumento progressivo nas 3 recolhas passando de 7% para na recolha 1, para 23% na recolha 3 e apresentando 40% na recolha 5, assim como os retalhadores detritívoros, aumentando de 5% para 7% e por fim registando 22%. Os raspadores minerais têm uma incidência de 17% descendo no outono para 6% e subindo na segunda recolha de primavera, recolha 5), para 16%próximos aos registados na recolha 1.

No ponto E, mais uma vez, não houve um grupo funcional que fosse dominante sobre os outros, tendo-se registado 31% de coletores detritívoros, 25% de coletores filtradores, 24% de limnívoros e e 9% de retalhadores detritívoros. Na recolha 3 houve 5 grupos com uma incidência importante, os coletores filtradores com 23%, os coletores detritívoros com 19%, os predadores mastigadores com 16%, os limnivoros com 17% e os retalhadores detritívoros. Na recolha 5 verificou-se 28% de raspadores minerais, 31% de retalhadores detritívoros, 19% de predadores mastigadores e 14% de coletores filtradores. Nas 3 recolhas os coletores filtradores têm uma ligeira

diminuição até à recolha 5, de 25% para 23% para 14%, assim como os coletores detritívoros que apresentaram um decréscimo mais acentuado, de 31% para 19% para 3%. Os retalhadores detritívoros aumentaram ligeiramente da recolha 1 para a 3, aumentando muito para a recolha 5, à semelhança dos raspadores minerais e os predadores mastigadores. Os limnívoros diminuíram da recolha 1 para a 3 nãos sendo detetados na recolha 5. Os raspadores orgânicos mantiveram uma incidência constante ao longo das 3 recolhas.

No ponto F, na recolha 1 a maior abundancia foi do grupo funcional dos predadores mastigadores com 32%, sendo seguidos dos retalhadores detritívoros, dos coletores filtradores com 25% e dos raspadores orgânicos com 10%. Na recolha 3 verificou-se que 28% da população pertencia aos coletores filtradores e outros 28% aos coletores detritívoros. Os predadores mastigadores tiveram uma abundancia de 24% da população, assim como os raspadores orgânicos tiveram 11% e os retalhadores detritívoros tiveram 6%. Na recolha 5 verificou-se que 29% eram coletores detritívoros, 26% eram coletores filtradores e 14%, eram raspadores orgânicos e três grupos funcionais com 10% dos indivíduos, os predadores mastigadores, raspadores minerais e retalhadores detritívoros. Nas 3 recolhas verificou-se uma manutenção da incidência do grupo dos coletores filtradores, com pequenas oscilações ao longo do tempo. Os coletores detritívoros registaram 4% na recolha 1, aumentando para 28% na recolha 3, e mantendo-se mais ou menos estável na recolha 5. Os predadores mastigadores diminuíram ao longo do tempo enquanto os raspadores orgânicos aumentaram muito ligeiramente. Os retalhadores detritívoros tiveram uma diminuição de 20% para recolha 1 para a recolha 3, registando um pequeno aumento para a recolha 5. Os raspadores minerais mantiveram as 2% na recolha 1 e na 3, aumentando para 10% na recolha 5. Os raspadores orgânicos registaram uma incidência na população de 1% em todas as recolhas.

3- Índice de Qualidade do Bosque da Ribeira

O índice de qualidade do bosque da ribeira é um índice que é recomenda acompanhar as recolhas de macroinvertebrados para o estudo da qualidade de um curso de água (Munné et al., 2003). Este índice tem como principal objetivo estudar a qualidade das margens do rio onde são feitas as recolhas, sendo indicado como um índice para o estudo da qualidade dos habitats. Embora seja um índice bastante subjetivo, com um erro associado grande, uma vez que depende muito dos conhecimentos e da experiencia do observador, este índice vai ser importante para mostrar as qualidade de um local, quer do seu corredor ripário quer do sedimento em

que se assentão as margens. Uma consideração importante neste índice é o facto atribuir um valor às alterações antrópicas que ocorreram nas margens do rio (**tabela 28 Anexo IV**).

Tabela 15: Resultados do cálculo do índice de Qualidade do Bosque da Ribeira em três recolhas.

	QBR-R1	QBR-R3	QBR-R5
Ponto A	83	83	83
Ponto B	60	60	55
Ponto C	32	41	32
Ponto D	112	108	112
Ponto E	60	60	60
Ponto F	65	65	65

Foram feitos levantamentos da qualidade das margens apenas em três recolhas, devido ao facto de as margens não se alterarem muito ao longo do ano, apenas podendo sofrer impactos em casos de inundações ou construções recentes.

Com efeito, ao analisar a tabela, verifica-se que o único ponto que sofreu uma perda da qualidade das margens foi o ponto B. O ponto A apresenta uma qualidade boa, não excelente devido a constrições e algum nível de interferência antropogénica que se detetou nas margens. O ponto C é com efeito o mais perturbado a nível de qualidade das margens, sendo que tinha um impacto visível e importante a nível de alterações das margens. Por sua vez, o ponto D não apresentava qualquer impacto visível. Tinha um corredor ripário rico e sem infraestruturas antrópicas em redor. Os pontos E e F apresentavam alterações às margens, sendo estas mais visíveis no ponto E que no F. Devido a uma construção recente, as margens do ponto E foram consolidadas com blocos de cimento. O ponto F embora não tivesse um impacto tão severo, apresentava uma ilha de grandes dimensões no meio do rio que dividia o curso do rio em dois, para depois este se juntar após a ponte romana.

4- Parâmetros microbiológicos

4.1- Contagens de microrganismos totais

A contagem de microrganismos totais foi realizada nas 5 recolhas para a coluna de água e nas primeiras 4 recolhas para o biofilme, assim como para todas as outras contagens. Apesar disso, não são apresentados dados relativamente à recolha 1 devido a problemas em otimizar a técnica de contagem.

Foi possível observar que de facto as contagens de CFUs eram sempre muito mais elevadas no biofilme que na coluna de água.

Na coluna de água (**fig. 31**) as contagens de microrganismos totais é sempre muito mais baixa que nos outros pontos, sendo que o valor mais alto é de 276 CFU/mL na recolha 3, coincidente com o pico de pluviosidade (P). Os pontos D, E e F são aqueles que apresentaram valores de CFU/mL mais elevados e com uma expressividade mais facilmente observável. Tirando o ponto E, os outros 5 pontos seguem uma tendência coincidente com a pluviosidade, aumentando aquando do pico de pluviosidade e descendo quando os níveis de pluviosidade descem. O ponto E é a exceção a esta tendência, tendo o seu pico sido detetado na recolha 4 e não na 3.

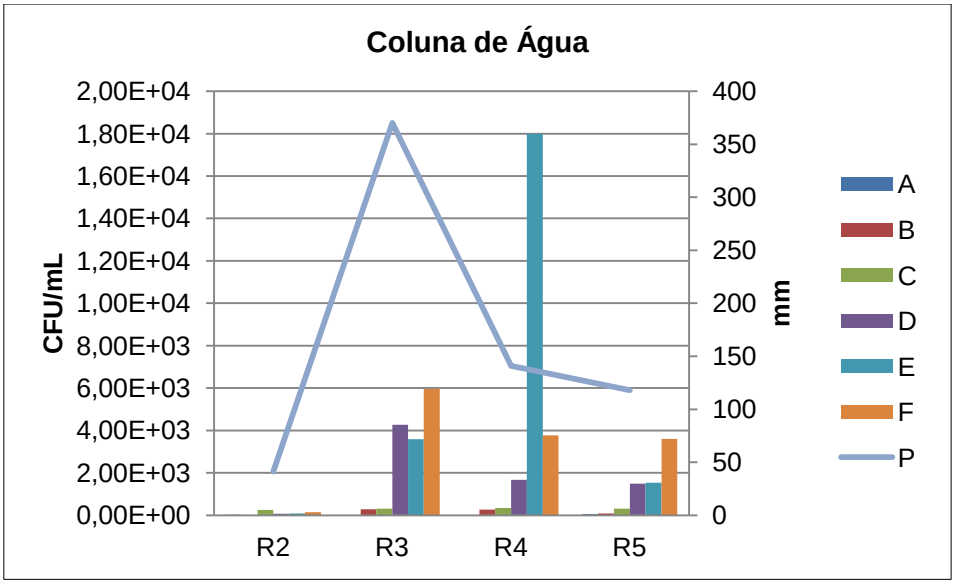


Figura 31: Progressão espácio-temporal das contagens totais de microrganismos na coluna de água.

Para o biofilme (**fig. 32**) a tendência temporal é diferente, assim como a distribuição de CFUs nos 6 pontos. O ponto B e C apresentaram valores elevados nas recolhas 4 e 3, respetivamente, o que não foi verificado nas recolhas 1 e 2.. Na recolha 2 os pontos E e F apresentaram efetivamente uma diferença grande nos níveis de contaminação em relação aos outros pontos, sendo que estes valores diminuem drasticamente nas recolhas 3 e 4. No ponto D, os níveis de microrganismos totais forma semelhantes nas recolhas 2 e 3, decrescendo na recolha 4.

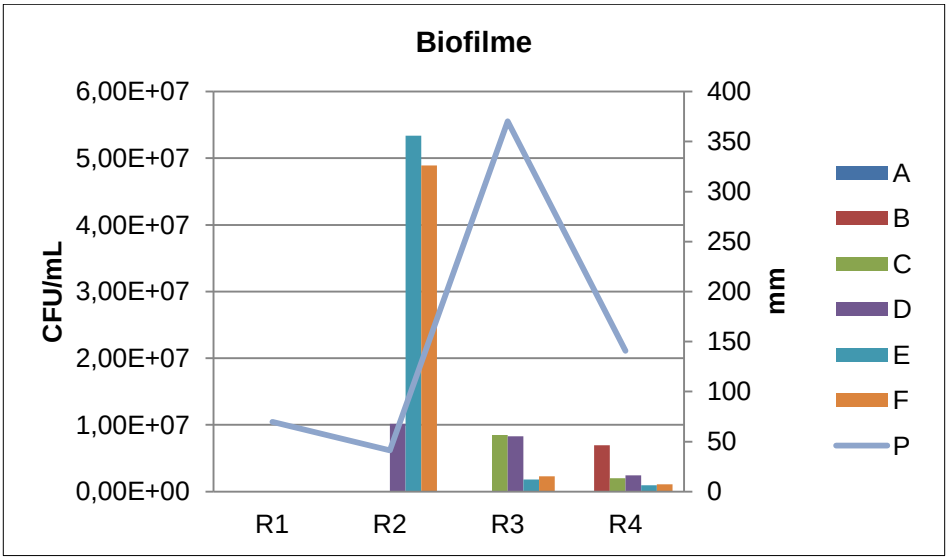


Figura 32: Progressão espácio-temporal das contagens de microrganismos totais no biofilme.

4.2- Contagens de indicadores de contaminação fecal

Efetuaram-se contagens dos dois grupos mais estudados como indicadores de contaminação fecal, *Enterococcus* spp. e *E. coli*.

4.2.1- Contagens de indicadores de contaminação fecal pelo método de cultura

Usando os meios cromogénicos, TBX para E. *coli* e S.B. para *Enterococcus* spp., fizeram-se contagens de CFUs, verificando-se que a variação do número de CFUs em determinados pontos segue uma tendência sazonal, com um aumento na altura de chuvas e circunstâncias de arrastos de sedimentos das margens do rio para o seu caudal, enquanto que outras não apresentam essa progressão espectável, apresentando oscilações ao longo das 5 recolhas que foram realizadas, sendo que não seguem uma progressão ao longo do tempo coincidente com a pluviosidade nem mesmo coincidem com o espectável a nível espacial.

4.2.1.1- *E. coli*

Em seguida são apresentadas as contagens de *E. coli* na coluna de água e no biofilme. Como referido anteriormente, as gráficos de contagens na coluna de água são apresentados para as 5 recolhas estudadas, Junho 2014, Setembro 2014, Novembro 2014, Fevereiro 2015 e Maio de 2015, enquanto que para as contagens do biofilme só foram tidas em conta as primeiras quatro recolhas.

Segue então a análise das contagens de *E. coli* por ponto.

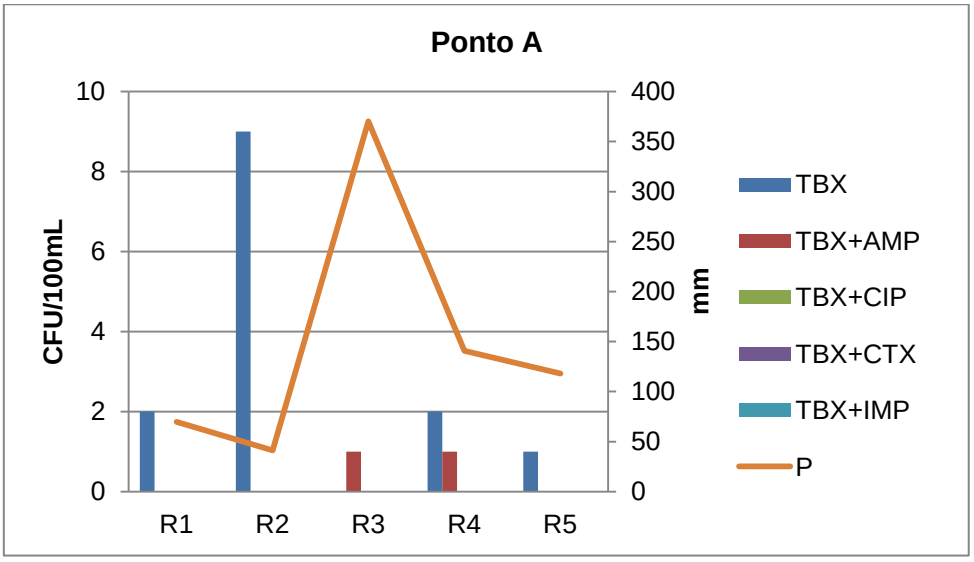
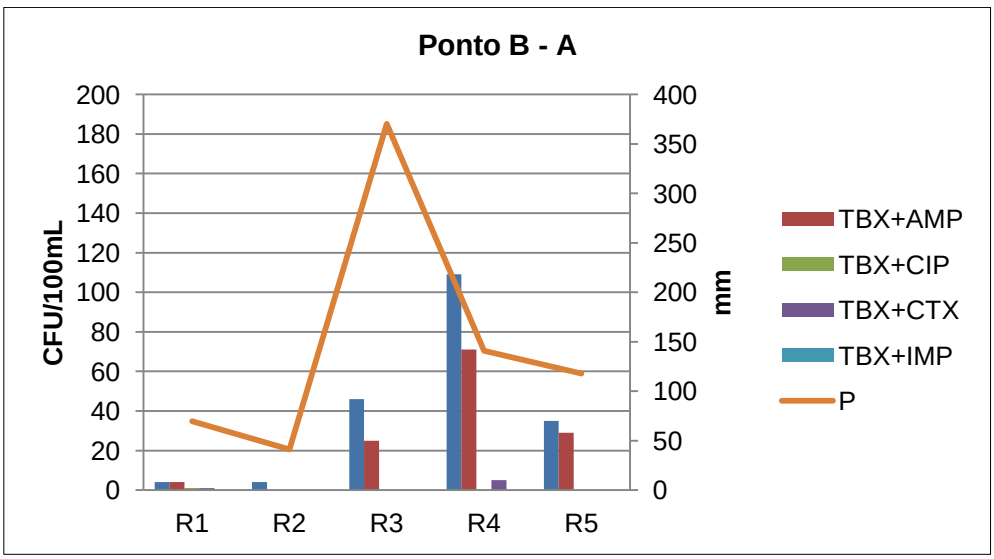


Figura 33: Variação das contagens de *E. coli* na coluna de água no ponto A ao longo das 5 recolhas. O valor P representa a pluviosidade.

No gráfico da **figura 33** estão presentes as contagens totais contabilizados nos diferentes meios de cultura no ponto A. Este ponto é considerado um ponto pristino, em que a envolvência do ponto apresenta muito pouca interferência antropogénica, sendo que a única fonte de potencial contaminação pontual serão alguns animais selvagens que se habitam nas margens do rio. Embora tenham sido encontrados alguns CFUs de *E. coli* neste ponto ao longo das 5 recolhas, os números de CFUs não são significativos (<90 CFU/mL) e portanto não indicadores de contaminação fecal. No caso do biofilme não foi encontrado nenhum CFU em nenhuma das recolhas em que o biofilme foi analisado. Apesar de não ser significativo, verifica-se que as flutuações do número de CFUs não seguem um padrão coincidente com a pluviosidade (identificada no gráfico por P).



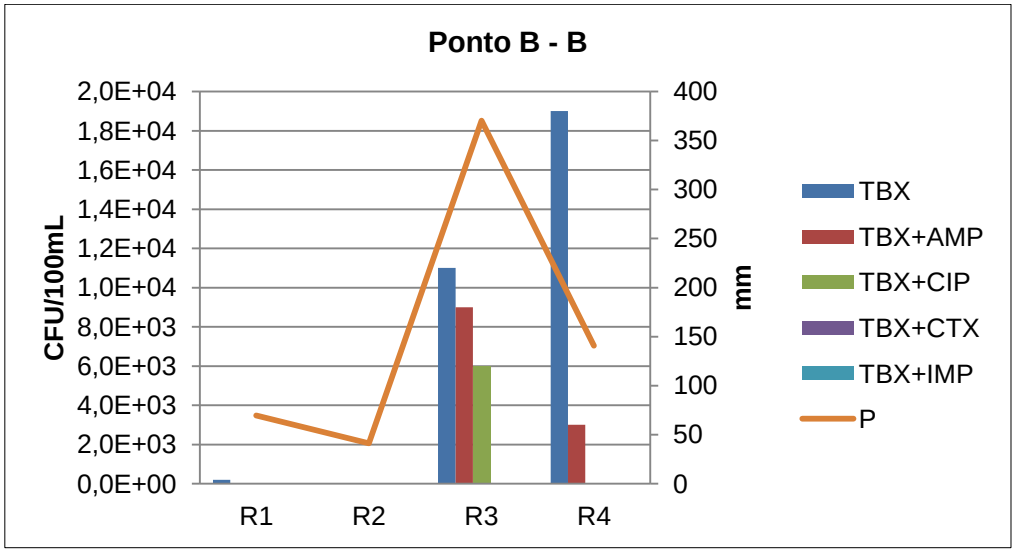


Figura 34: Variação da distribuição das contagens de *E. coli* no ponto B ao longo das 5 recolhas. O gráfico A corresponde à coluna de água e o B corresponde ao biofilme.

Como é visível na **figura 34**, o número de CFUs aumenta do primeiro, A, para o ponto B. Como este ponto se situa após as duas grandes albufeiras do rio, o facto de a qualidade decair era portanto de prever. É possível verificar que tanto no biofilme como na coluna de água houve um aumento no número de CFUs entre as recolhas 3 e 4, sendo que as recolhas 1 e 2 resultam em números de CFUs muito baixos ou mesmo nulos. Este aumento na contaminação não segue, mais uma vez uma relação direta com a pluviosidade, nem a nível do biofilme nem da coluna de água. Apesar disso, se se olhar para estes dados segundo os limites aceitáveis de coliformes fecais em águas superficiais, verificaram-se valores entre os 21 e os 20 000, o que permite considerar a água pouco poluída.

Curiosamente, os valores de CFUs de *E. coli* no biofilme são mais elevados que na coluna de água. Verifica-se também que é no biofilme que são detetados números elevados de CFUs em meios suplementados com antibióticos. Na recolha 3, coincidente com o pico de pluviosidade, no caso do biofilme foi notório o aumento de CFUs obtidos a partir dos meios suplementados com CIP e AMP. A variação dos CFUs, no caso do meio suplementado com AMP, segue uma progressão, na coluna de água, apesar de ter sempre valores mais baixos, idêntica à progressão às contagens totais.

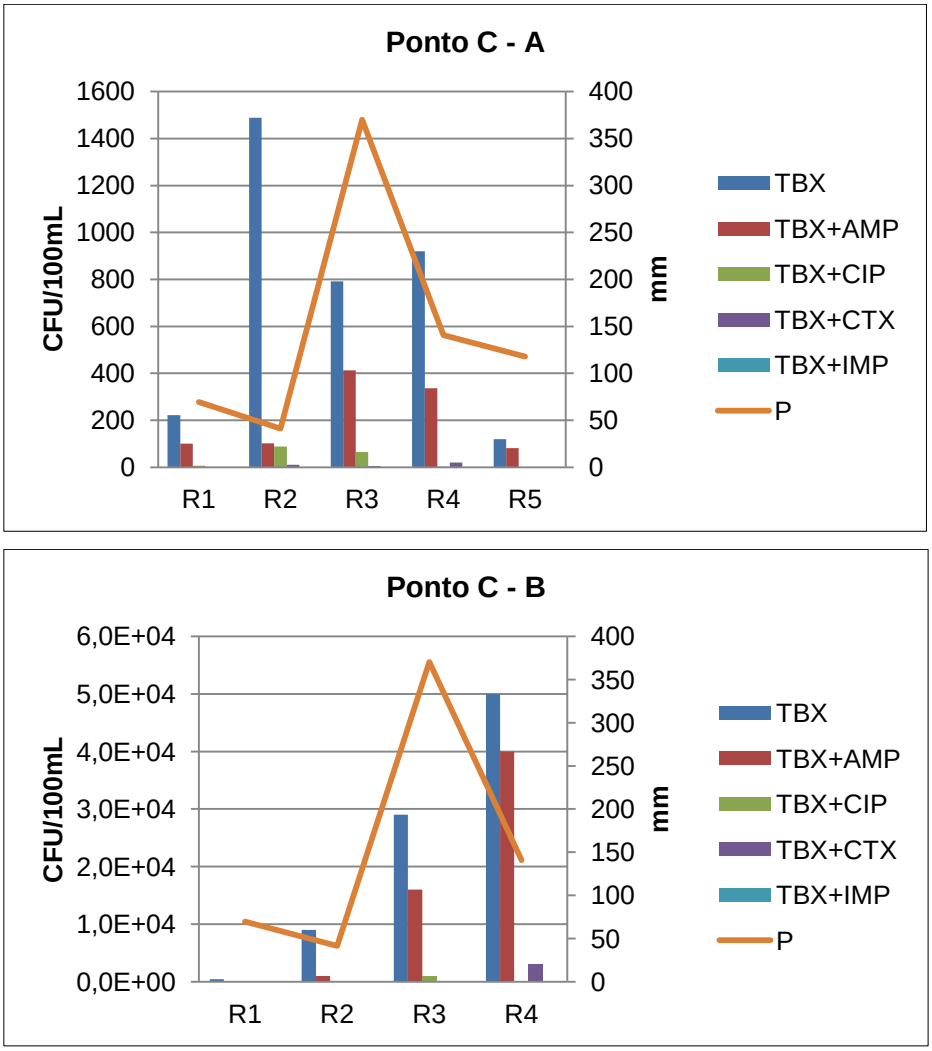


Figura 35: Variação da distribuição das contagens de *E. coli* no ponto C ao longo das 5 recolhas. O gráfico A corresponde à coluna de água e o B ao biofilme.

No ponto C (**fig. 35**), aparece uma nova realidade a nível de contaminação por *E. coli*. Este ponto pode ser visto como um ponto de viragem, uma vez que é a partir deste ponto em que se encontram as primeiras contagens significativas quer na contagem dos CFUs em TBX, como nos números de CFUs encontrados nos meios suplementados. Isto demonstra que a partir deste ponto é importante ter em consideração também as contagens nos meios com antibióticos. A coluna de água, os níveis mais elevados de *E. coli* encontram-se na recolha 2, enquanto que no biofilme houve um crescendo nos níveis de CFUs ao longo das recolhas.

Analisando as 5 recolhas das contagens na coluna, verifica-se que da recolha 4 para a 5 há um decréscimo abrupto nos números de E. coli, quer no meio não suplementado como nos suplementados com antibióticos. Assim sendo, se se comparar as 4 recolhas na coluna de água e no biofilme, verifica-se uma progressão idêntica entre as recolha 3 e 4, em que, apesar de o número de CFUs no biofilme ser

muito maior que na coluna de água, há um crescimento idêntico entre CFUs de *E. coli* nos dois tipos de amostras.

Olhando atentamente agora para as contagens em meios suplementados, verifica-se que contagens em TBX+CIP são sempre baixas e só se verificam valores acima dos 20 CFUs na coluna de água na recolha 2 e 3 e no biofilme na recolha 3 de todo, assim como para TBX+CTX no biofilme só é contado na recolha 4 e na coluna de água, apesar de existirem em todas as recolhas, apenas na recolha 4 atinge os 20 CFUs. Em contra partida as contagens em meio suplementado com AMP são sempre muito mais elevadas e, na maior parte das vezes, segue uma progressão idêntica às contagens totais em TBX.

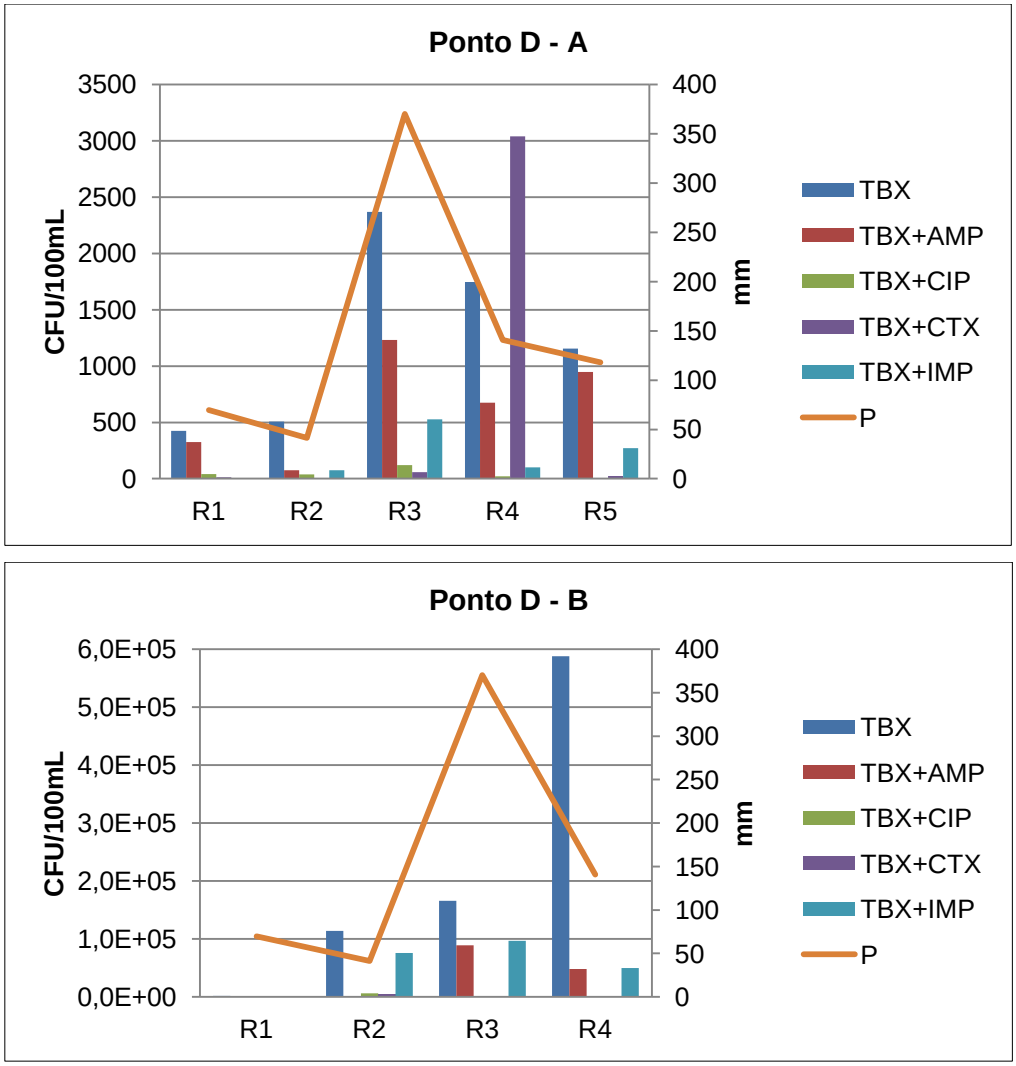


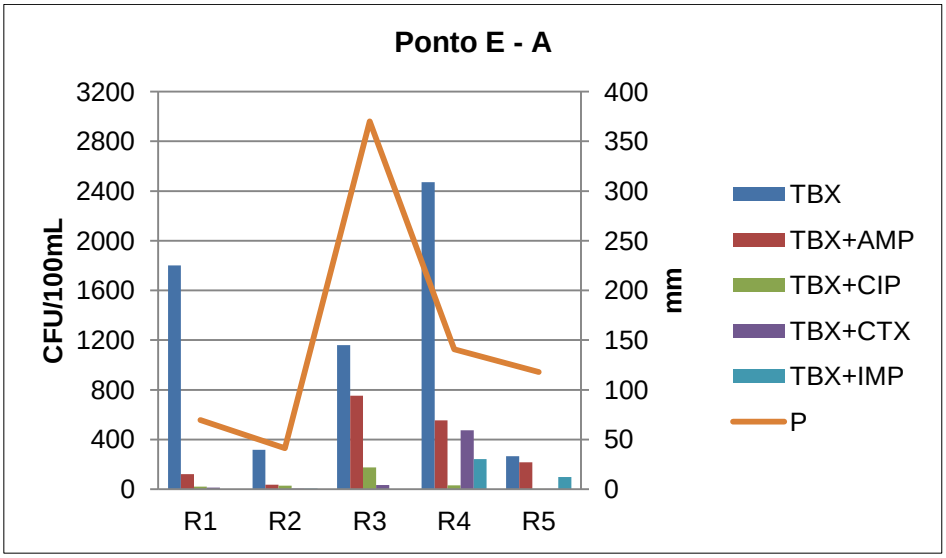
Figura 36: Variação da distribuição das contagens de *E. coli* no ponto D ao longo das 5 recolhas. O gráfico A corresponde à coluna de água e o B ao biofilme.

Neste ponto há discrepâncias grandes e interessantes entre o biofilme e a coluna de água. Sabendo que as contagens no biofilme são sempre muito maiores

que as contagens na coluna de água, verifica-se também que a variação dos CFUs de *E. coli* não seguem uma progressão idêntica nesses dois tipos de amostra. Se se observar as contagens totais em TBX na coluna de água, esta segue mais ou menos uma tendência idêntica à da pluviosidade, tendência essa seguida também pelas contagens em TBX+AMP.

É espectável que as contagens em meios suplementados não ultrapassem as contagens dos CFUs no meio não suplementado, uma vez que nos meios suplementados há uma seleção. No entanto, excecionalmente na recolha 4 no meio suplementado com CTX as contagens de CFUs foram bastante superiores aos totais contados.

A variação de CFUs ao longo do tempo no biofilme é diferente do que acontece na coluna de água. Enquanto os CFUs totais na coluna de água aumentam da recolha 2 para a recolha 3 e decrescem desta para a recolha 4, no biofilme, o aumento dos CFUs entre a recolha 2 e recolha 3 é muito menor que o crescimento da recolha 3 para a 4. Enquanto na coluna de água, a progressão da contaminação parece seguir um padrão sazonal, aumentando com a pluviosidade, no caso do biofilme tal não se verifica, havendo uma progressão efetiva ao longo do tempo.



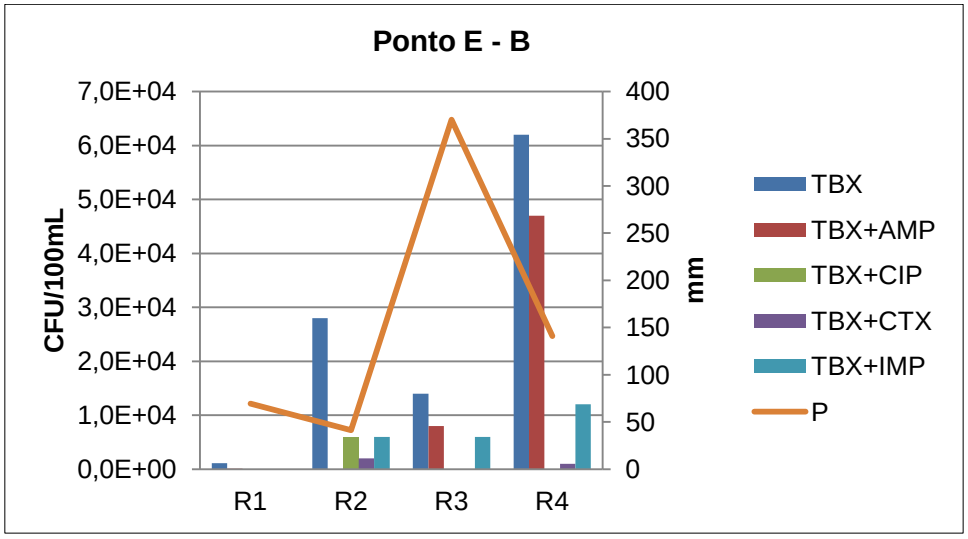
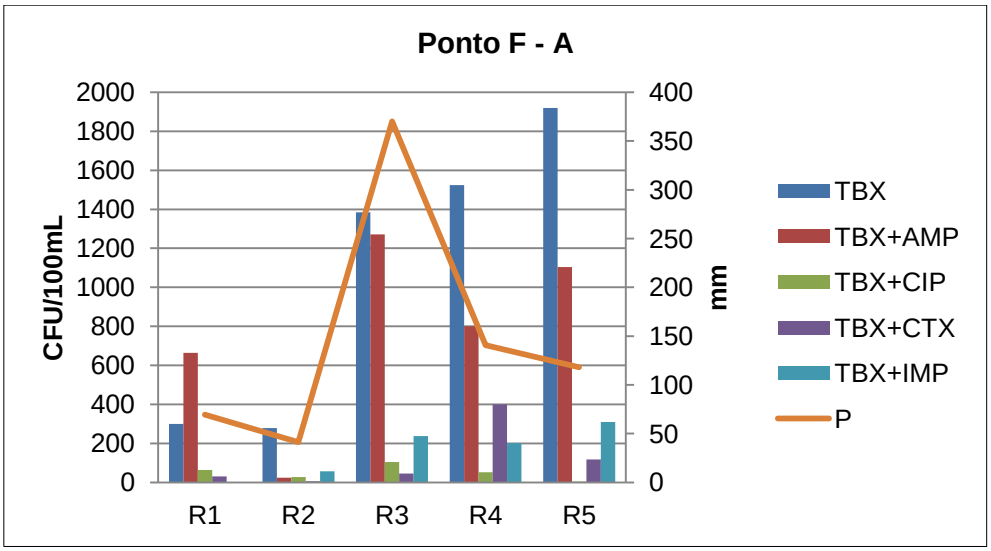


Figura 37: Variação da distribuição das contagens de *E. coli* no ponto E ao longo das 5 recolhas. O gráfico A corresponde à coluna de água e o B ao biofilme

No ponto E (**fig. 37**), na coluna de água sobressaem dois picos bem visíveis, no número de CFUs de *E. coli*, um na recolha 1 e outro na recolha 4. No caso do biofilme, o pico também acontece na recolha 4. Em meios suplementados, o número de CFUs é consideravelmente menor, sendo que foram obtidos quer no biofilme quer na coluna de água com maior incidência no caso da coluna de água nas recolhas 3 e recolhas 4, e no biofilme nas recolhas 2, recolhas 3 e recolhas 4.

Mais uma vez, o pico de contaminação não coincide com o pico de pluviosidade, nem na coluna de água nem no biofilme.



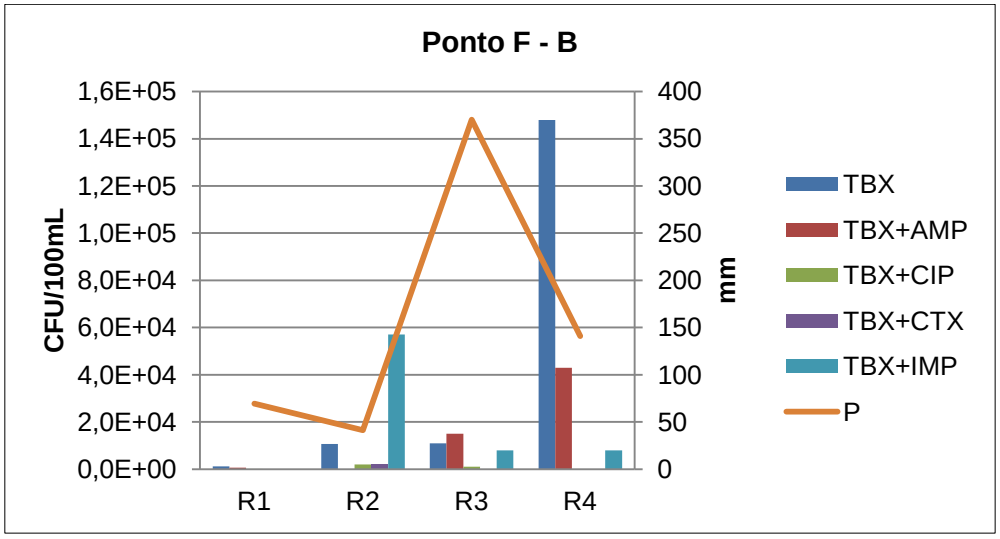


Figura 38: Variação da distribuição das contagens de *E. coli* no ponto F ao longo das 5 recolhas. O gráfico A corresponde à coluna de água e o B ao biofilme

As contagens de *E. coli* no ponto F (**fig. 38**), seguem um padrão muito diferente. Ao contrário de todos os outros pontos, o pico de contaminação por *E. coli* neste ponto é na recolha 5. Da recolha 3 até à recolha 5 verifica-se que há um aumento progressivo da contaminação, que não segue, no entanto a pluviosidade. Neste caso concreto, o fator tempo parece ser o fator com maior interferência na progressão da contaminação, e não a pluviosidade, uma vez que quando a pluviosidade tem um decréscimo acentuado, a contaminação aumenta. Este aumento de CFUs totais não se reflete no aumento de CFUs nos meios suplementados. Na recolha 1 vê-se a única exceção a esta tendência, uma vez que as contagens de CFUs em TBX+AMP, são mais elevadas que as contagens em TBX sem suplemento.

No caso do biofilme, foi inesperado o que se encontrou relativamente às contagens de CFUs em meio suplementado com IMP na recolha 2, sendo este valor muito mais elevado que as contagens totais de *E. coli*.

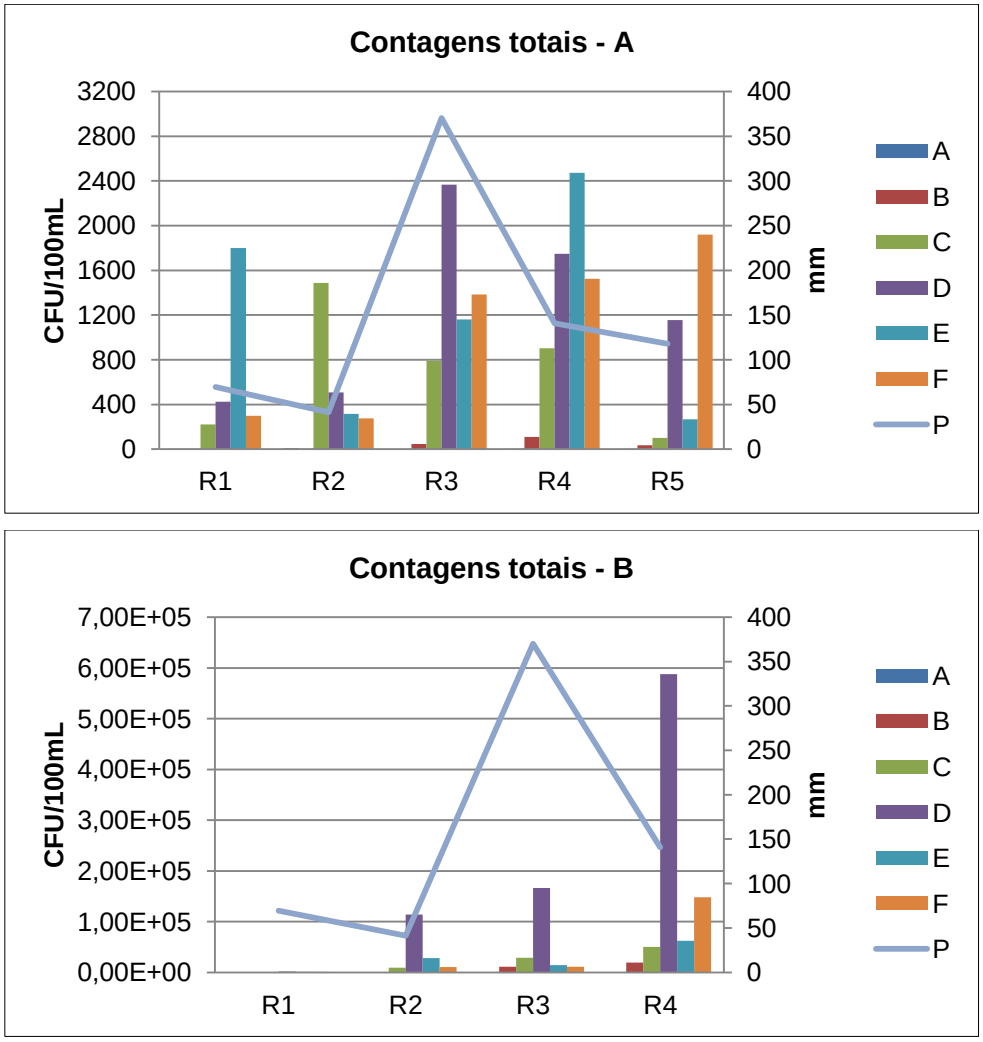


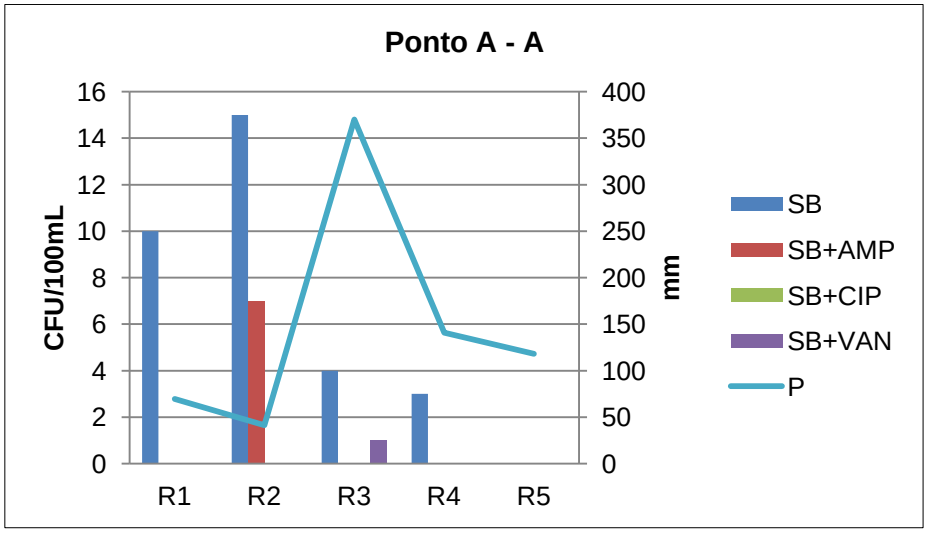
Figura 39: Variação da distribuição das contagens de *E. coli* em meio de TBX nos 6 pontos ao longo das 5 recolhas. O gráfico A corresponde à coluna de água e o B ao biofilme.

Ao analisar a evolução da contaminação nos 6 pontos ao longo do tempo, o que se pode retirar de uma primeira análise é de que a recolha 4 foi uma recolha onde foram detetados os valores de CFUs mais elevados, tanto na coluna de água como no biofilme. A recolha 1 foi a que teve menores valores, sendo que no biofilme os valores mais altos verificados foram no ponto D (1900 CFU/100mL), valores que não são visíveis nesta escala. Mesmo assim, o que nos mostra este gráfico das contagens totais do biofilme é que na primeira recolha, os valores de CFUs não chegaram aos 2000 CFUs, não aparecendo no gráfico, mas que em todas as outras recolhas, os valores de CFUs foram muito mais elevados. Olhando para o panorama geral do biofilme, o que se verifica é que o ponto D é aquele que apresenta maior nível de contaminação por *E. coli*, sendo que apresenta os valores de CFU's mais elevados nas quatro recolhas analisadas.

No caso da coluna de água, a recolha 1 também foi a que registou menores valores de CFUs totais, com exceção do ponto E, que teve um pico de contaminação nessa recolha. Na recolha 2, houve um decréscimo abrupto no número de CFUs no ponto E e um aumento muito grande no ponto C, tendo sido este o que apresentou maior contaminação nesta data. Na recolha 3, houve uma diminuição da contaminação no ponto C, mas um aumento nos pontos D, E e F, sendo que o ponto apresentou o seu maior nível de contaminação nesta data, coincidente com uma elevada pluviosidade. A recolha 4 apresentou o maior pico de contaminação no ponto E, o mais elevado de todas as recolhas e de todos os pontos, mas apresentou um ligeiro decréscimo no ponto D e um ligeiro aumento no ponto F. Curiosamente, foi neste ponto e nesta recolha que se encontraram as maiores e mais importantes multirresistências a antibióticos. Na recolha 5, os pontos D e F contrariaram a tendência de decréscimo acentuado de CFUs, sendo que há uma ligeira diminuição no ponto D e um aumento no ponto F. Este aumento do ponto F não é facilmente explicável, uma vez que imediatamente a montante, no ponto E, a cerca de 4 km de distância, não se verificavam níveis elevados de contaminação. Isto implica, que no decurso desses 4 km provavelmente tenha havido uma descarga poluente importante para justificar estes valores.

4.2.1.2- *Enterococcus* sp.

No caso dos *Enterococcus* spp., tal como para a *E. coli*, Foram feitas contagens dos CFUs para as amostras de água das 5 recolhas em meio SB e SB suplementado com antibióticos e nas amostras do biofilme das primeiras 4 recolhas.



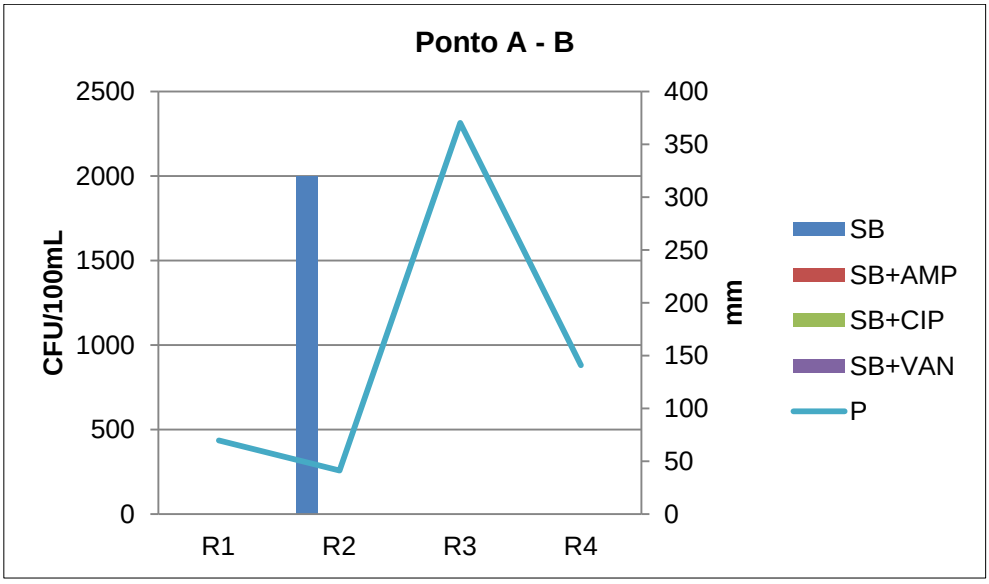
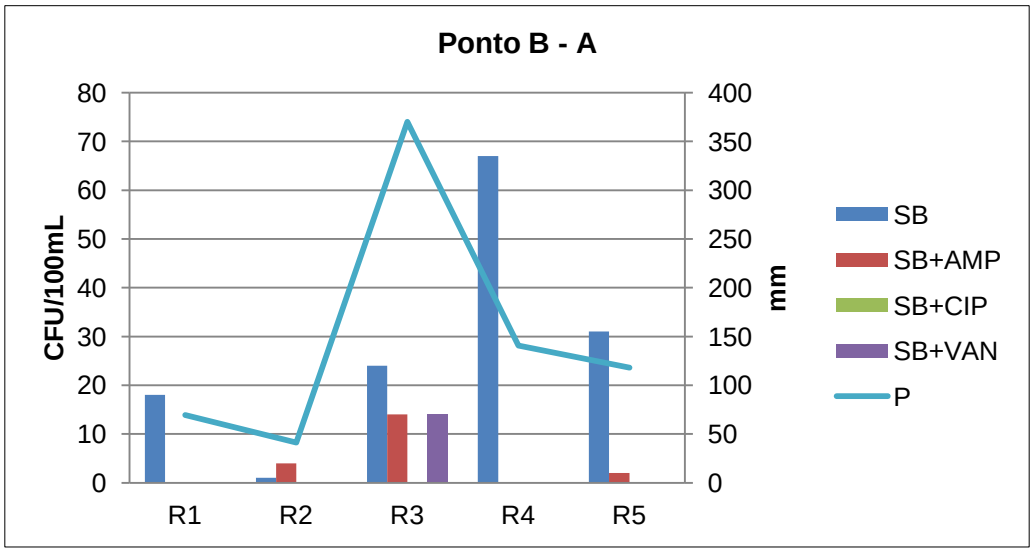


Figura 40: Variação da distribuição das contagens de *Enterococcus* spp. no ponto A ao longo das 5 recolhas. O gráfico A corresponde à coluna de água e o B ao biofilme

Tal como nas *E. coli*, as contagens em meio de cultura de *Enterococcus* spp. (**fig. 40**) no ponto A foram muito baixas, sendo que no biofilme só foram contabilizados CFUs na segunda recolha. Houve um pico de CFUs de *Enterococcus* spp. na recolha 2 na coluna de água. Nas recolhas 3 e 4 foram encontrados entre 3 a 4 CFUs em 100 mL de água filtrada. Apesar deste aumento de CFUs na coluna de água e no biofilme na recolha 2, os valores de CFUs em água são muito baixos, sendo que não representam uma verdadeira contaminação. Na coluna de água, foram contados alguns CFUs na recolha 2 e na 4 em meios suplementados com AMP e VA, respetivamente.



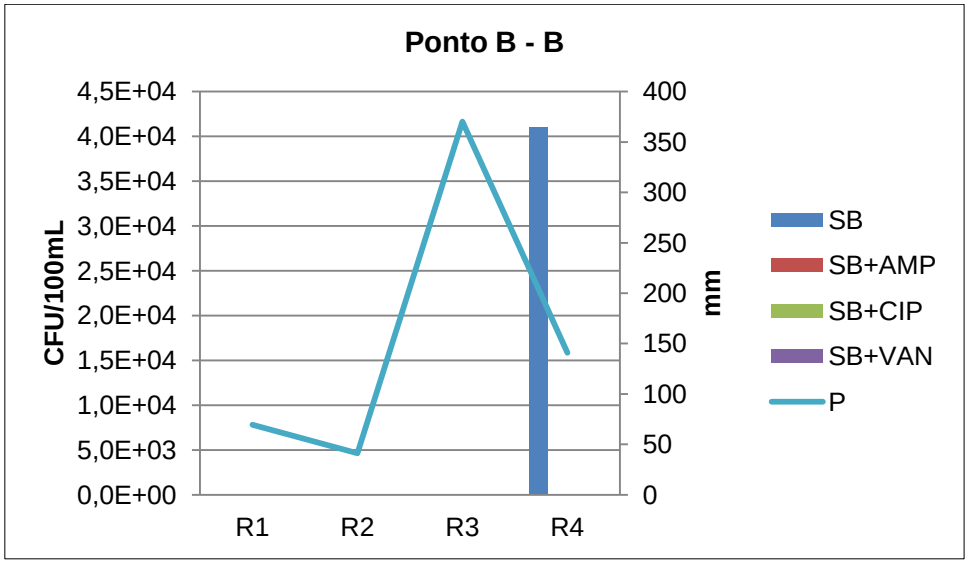
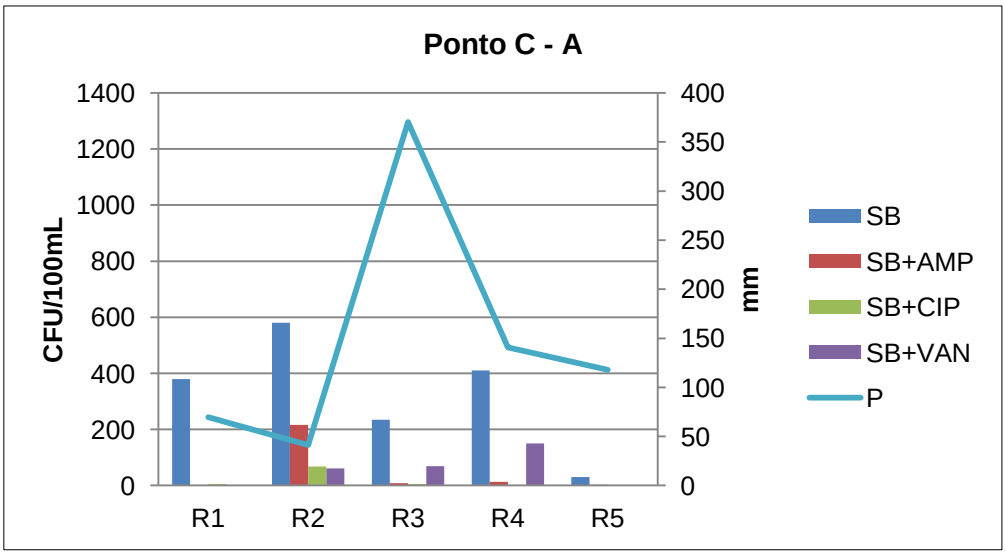


Figura 41: Variação da distribuição das contagens de *Enterococcus* spp. no ponto B ao longo das 5 recolhas. O gráfico A corresponde à coluna de água e o B ao biofilme

No ponto B já foram contabilizados mais *Enterococcus* spp. na coluna de água, sendo que no biofilme apenas foram detetados CFUs na recolha 4. Na coluna de água, foi também na recolha 4 que se verificou haver maiores valores de *Enterococcus* spp., mas ainda assim com valores ainda inferiores a 70 CFU/100 mL. Este aumento na recolha 4, não coincidente no entanto com o pico de pluviosidade. No biofilme não foram encontrados CFUs em nenhum dos meios suplementados com antibióticos, ao contrário do que se verificou na coluna de água, onde foram contabilizados no SB com AMP na recolha 2, recolha 3 e recolha 5 e em SB com VA na recolha 3.



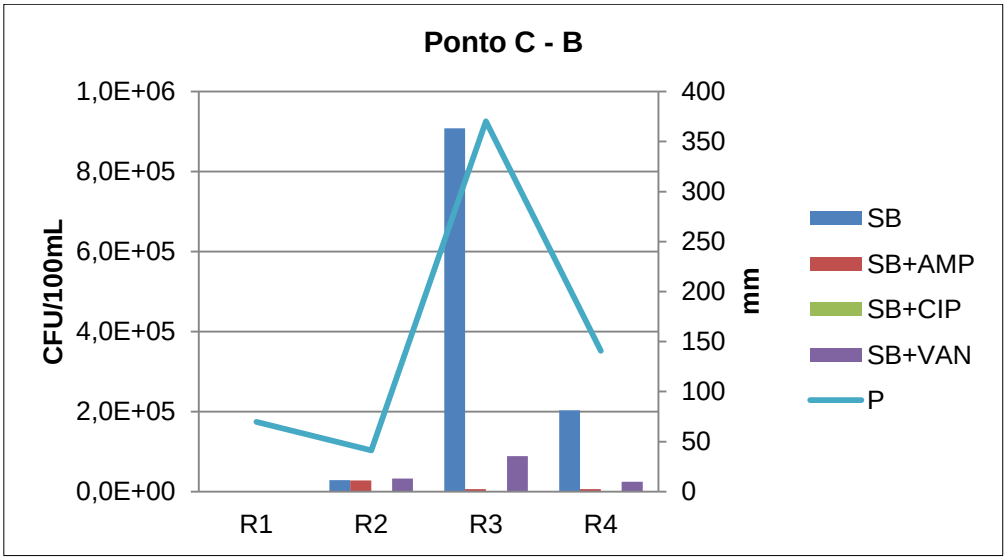


Figura 42: Variação da distribuição das contagens de *Enterococcus* spp. no ponto C ao longo das 5 recolhas. O gráfico A corresponde à coluna de água e o B ao biofilme.

Tal como foi considerado nas *E. coli*, nos *Enterococcus* spp. o ponto C pode ser considerado um ponto que denota uma valteração na contaminação, uma vez que os valores quer de *E. coli* quer de *Enterococcus* spp. passam a ser mais expressivos, como é visível pela escala gráfica que se teve de utilizar a partir deste ponto para as contagens de CFUs, quer para a coluna de água quer para o biofilme. Foi também a partir deste ponto que se começaram a contabilizar *Enterococcus* spp. em meio suplementado com CIP.

Mais uma vez, a progressão da contaminação neste ponto não segue um perfil sazonal, uma vez que o pico da pluviosidade está indicado como sendo na recolha 3, em Novembro e o pico da contaminação foi registado na recolha 2, em Setembro, coincidente com um decréscimo da pluviosidade. As contagens mais baixas, não ultrapassando os 30 CFU/100 mL, foram registadas na recolha 5, em Maio. Contrariamente no biofilme houve um pico no valor das contagens na recolha 3, coincidente com uma época de grande pluviosidade descendo drasticamente na recolha 4. O pico de contagens em meio com VAN também foi na recolha 3.

Na coluna de água, apenas nas recolhas 2, 3 e 4 foram contabilizados CFUs em meios suplementados com antibióticos. Na recolha 2 contabilizaram-se CFUs no meio com CIP, 68 CFU/100 mL, enquanto que na recolha 1 e recolha 3 foram contabilizados apenas 5 CFU/100 mL, não sendo visível no gráfico devido à amplitude da escala. O pico de contagens em meio suplementado com VAN foi na recolha 4, com 150 CFU/100 mL.

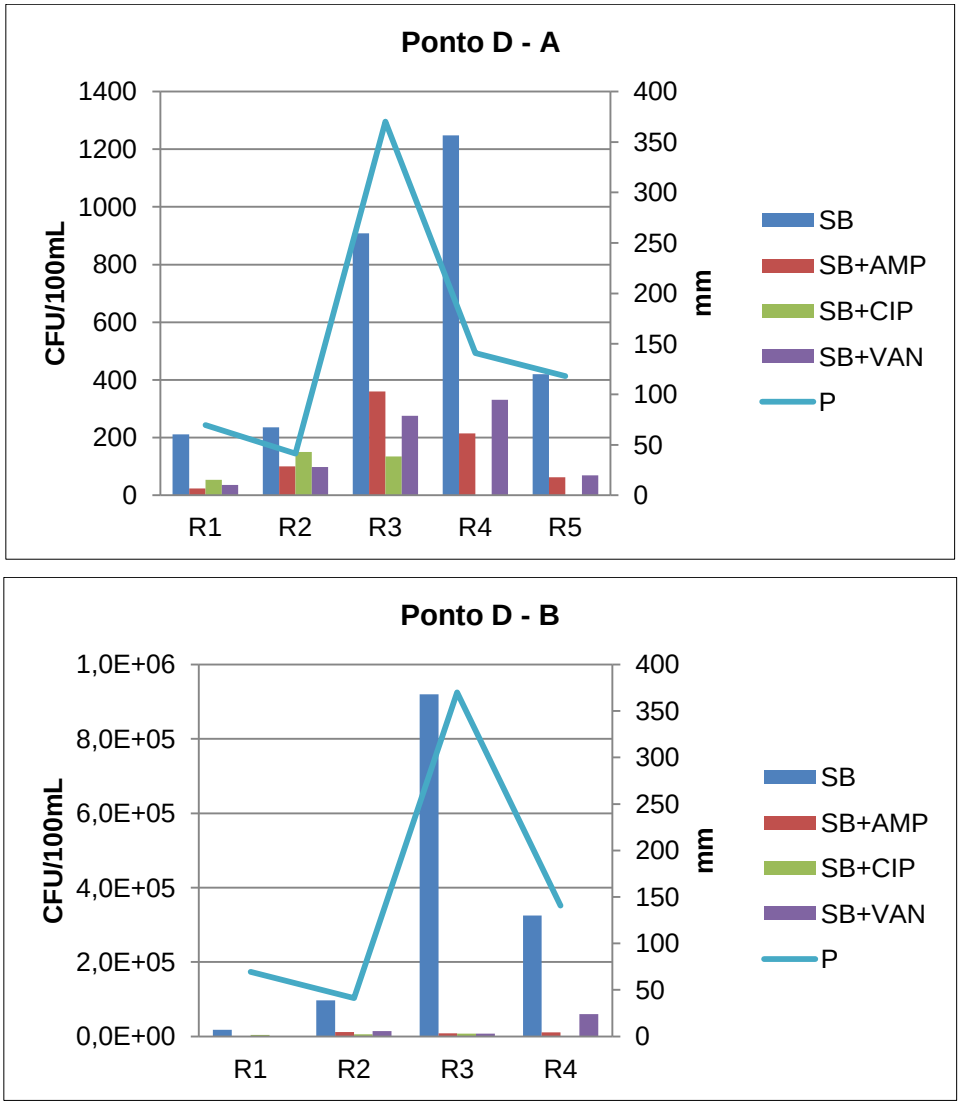


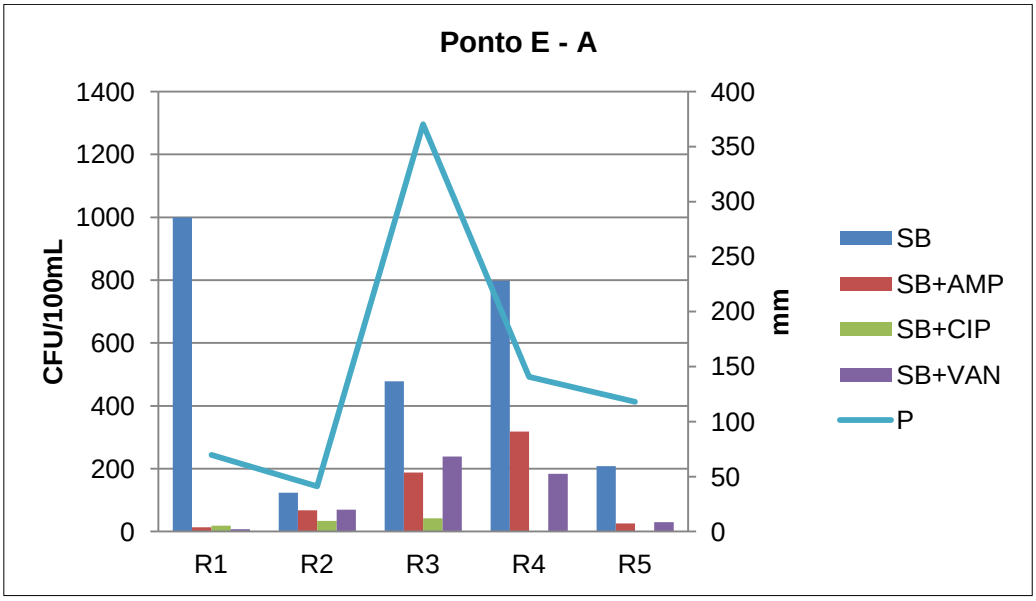
Figura 43: Variação da distribuição das contagens de *Enterococcus* spp. no ponto D ao longo das 5 recolhas. O gráfico A corresponde à coluna de água e o B ao biofilme

O ponto D foi designado para as *E. coli* como um ponto problemático, podendo ser também designado de problemático ao analisar as contagens de *Enterococcus* spp. detetadas (**fig. 43**).

Começando por analisar as contagens na coluna de água, o que se verificou é que as contagens para além de serem muito mais elevadas, também eram relevantes em todos os meios suplementados. Apesar de não coincidir completamente com a progressão sazonal da pluviosidade, houve efetivamente um aumento muito grande nas contagens de CFUs da recolha 2 para a 3, que pode ter em parte uma explicação na pluviosidade. Tal como na maioria dos pontos, foi na recolha 4 que se verificou o pico de contagens de CFUs totais (1248 CFU/100 mL). Apesar disso, e das contagens mais elevadas de CFUs em meio com VAN terem sido também nesta recolha. Não foram contabilizados CFUs em meio com CIP, nem na recolha 4 nem na 5.. Em geral,

ao longo das primeiras três recolhas houve um aumento da contaminação, visível quer nas contagens totais quer nos meios suplementados com AMP e VAN, com um aumento dos *Enterococcus* spp. totais de 236 CFU/100 mL na recolha 2 para 908 CFU/100 mL na recolha 3. No meio suplementado com CIP, as contagens mais elevados foram na recolha 2, tendo valores próximos dos detetados na recolha 3, 150 e 136 CFU/100 mL respetivamente.

No caso do biofilme a progressão da contaminação teve um padrão coincidente com a progressão da pluviosidade, tendo o pico de contaminação sido detetado na recolha 3. Foram detetados CFUs também nos meios suplementados com antibióticos, apesar de devido à escala necessária para a demonstração das contagens totais, estes não serem bem visíveis. As contagens mais baixas foram sempre no meio suplementado com CIP, sendo que verificaram um total de 4000 CFU/100mL na recolha 1, 6000 CFU/100 mL na recolha 2 e 7000 CFU/100mL na recolha 3, não tendo sido detetados nenhuns na recolha 4, tal como aconteceu também na coluna de água. As contagens de CFUs em SB com VA foram iguais às da CIP na recolha 3, não tendo sido detetados na recolha 1, mas nas recolhas 2 e 4 foram registados 14000 CFU/100 mL e 60000 CFU/100 mL, respetivamente.



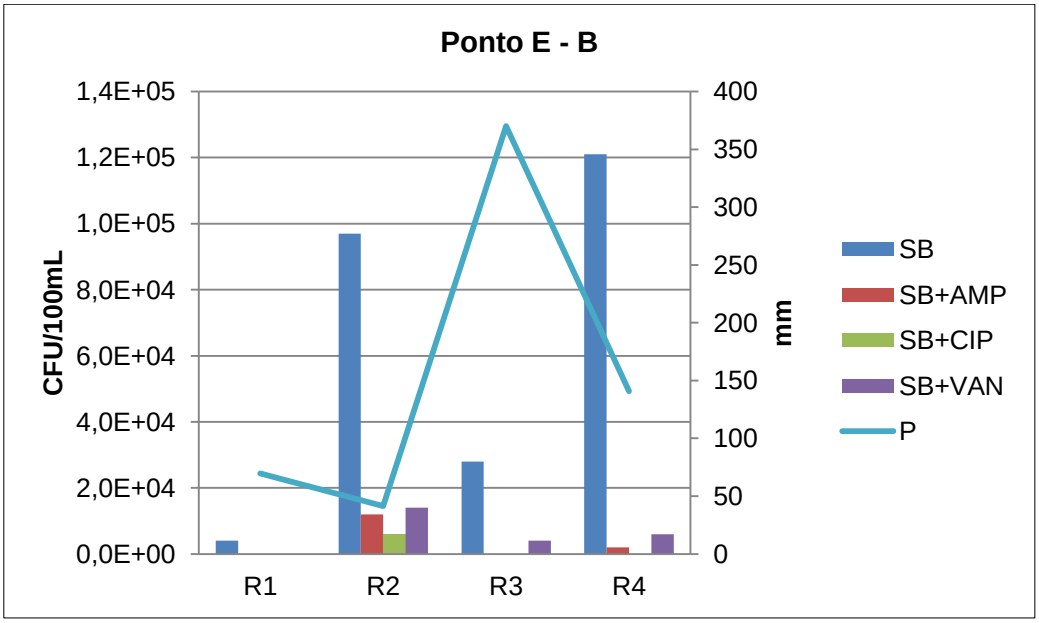


Figura 44: Variação da distribuição das contagens de *Enterococcus* spp. no ponto E ao longo das 5 recolhas. O gráfico A corresponde à coluna de água e o B ao biofilme

Analisando a **figura 44**, verifica-se que, na coluna de água, no ponto E ena recolha 1 houve um pico de contaminação que atingiu os 1000 CFU/100 mL, o valor mais alto de todas a 5 recolhas, sendo que as contagens nos meios suplementados ficaram muito abaixo deste valor, com valores na ordem dos 13 CFU/100 mL para AMP, 19 CFU/100 mL para CIP e 8 CFU/100 mL para VAN. Por sua vez, na recolha 2, houve um decréscimo nas contagens totais para valores abaixo dos 200 CFU/100 mL, enquanto que nos meios suplementados houve um aumento com valores entre os 68 CFU/100 mL para AMP e os 70 CFU/100 mL para VA, e um aumento no meio com CIP para 34 CFU/100mL. Na recolha 3 houve um aumento de CFUs totais e para os meios suplementados com AMP e VA, sendo que o meio em que se contabilizaram menos CFUs foi no meio com CIP, que não ultrapassou ou 42 CFU/100 mL. Na recolha 4, os *Enterococcus* spp. totais atingiram valores perto dos 800 CFU/100 mL, tendo havido um aumento nos CFUs no meio com AMP e uma ligeira diminuição no meio com VAN. No caso do meio suplementado com CIP, não foram contabilizadas nenhuns CFUs, assim como aconteceu na recolha 5. Nessa recolha, à imagem do que aconteceu nos outros pontos, foi a que registou menores contagens de CFUs, com totais a ultrapassar ligeiramente os 200 por 100 mL e nos meios suplementados estarem compreendidos entre os 26 e os 30 CFU/100 mL.

Para o biofilme, os picos foram nas recolhas 2 e 4, sendo que, no geral, as contagens em meios com antibióticos se ficaram pelas recolhas 2, 3 e 4; na recolha 3 apenas se registaram contagens no meio com VA. Em meio com CIP, apenas foram

identificadas colónias na recolha 2, 6000 CFU/100mL, enquanto no meio suplementado com AMP, foram apenas detetadas nas recolhas 2 e 4.

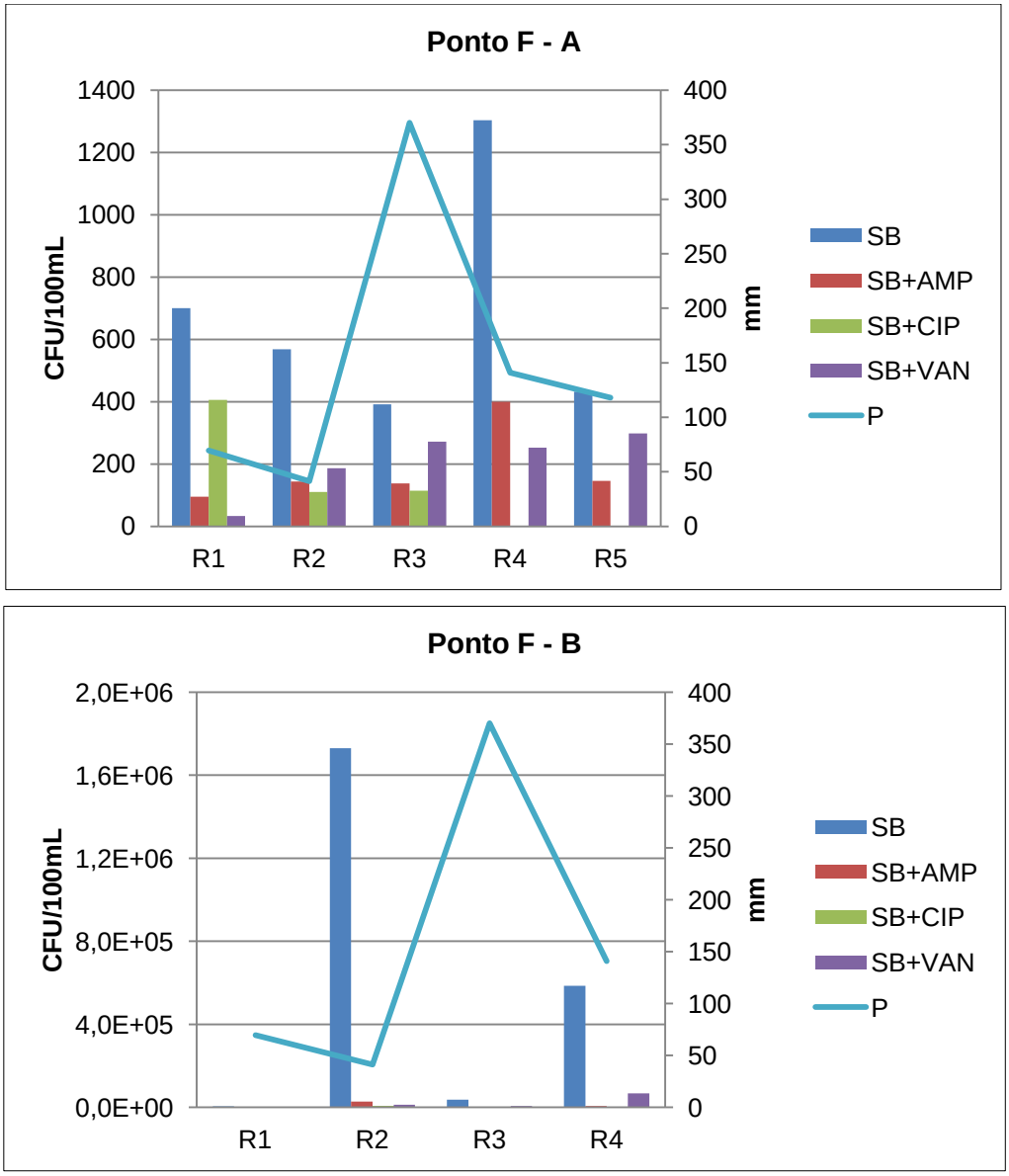


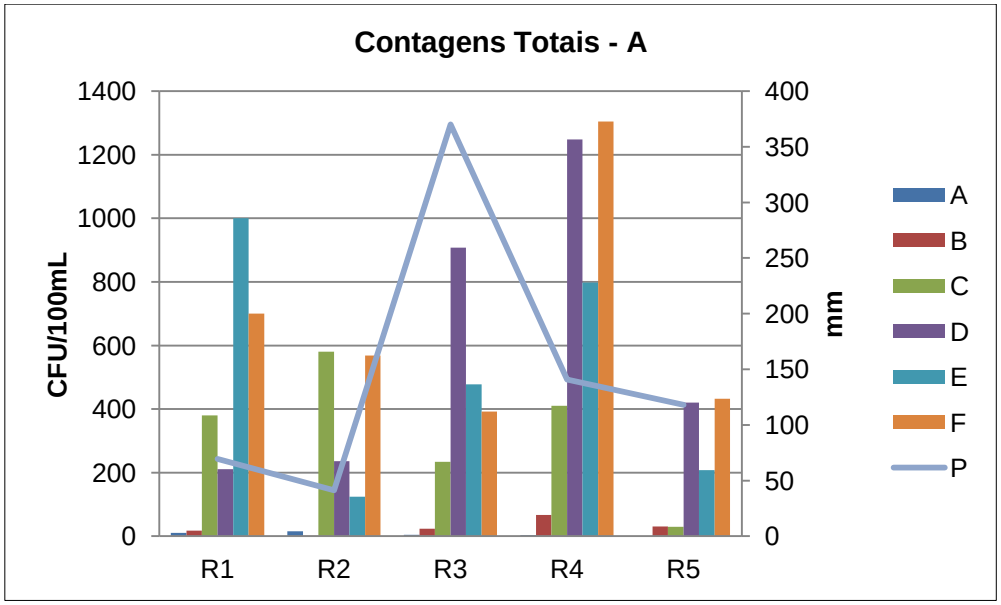
Figura 45: Variação da distribuição das contagens de *Enterococcus* spp. no ponto F ao longo das 5 recolhas. O gráfico A corresponde à coluna de água e o B ao biofilme

No ponto F (**fig. 45**) verificou-se uma diminuição progressiva das contagens totais, na coluna de água, da recolha 1 para a 3 descendo de 700 CFU/100mL para 392 CFU/100mL, respetivamente. O pico das contagens totais foi na recolha 4, com valores superiores a 1300 CFU/100mL. As contagens de CFUs no meio suplementado com AMP não tiveram variações muito expressivas, variando entre 95 CFU/100mL (recolha 1) e 400 CFU/100 mL (recolha 4).Os CFUs em meio suplementado com VA, teve um aumento significativo progressivo nas três primeiras recolhas, sendo que o pico que registou na recolha 3 manteve-se me valores entre os 200 e 300 CFU/100mL

nas recolhas 4 e 5, respetivamente. No caso do meio suplementado com CIP, o máximo de CFUs registou-se na recolha 1, com 405 CFU/100 mL, descendo para 110 CFU/100 mL na recolha 2 e mantendo-se quase inalterado na recolha 3. Nas recolhas 4 e 5 não foram registados CFUs neste meio suplementado, o que não aconteceu no caso do meio suplementado com VA, em que os CFUs se mantiveram da recolha 3 para a 4 e aumentaram na recolha 5.

Analisando para o gráfico de pluviosidade que se encontra sobreposto ao gráfico de barras das contagens, o que se pode constatar é que não houve de facto uma coincidência com a dinâmica deste parâmetro em nenhuma das recolhas.

No caso do biofilme, as contagens de CFUs em meios suplementados são sempre mais baixas que as contagens totais, mas geralmente superiores aos obtidos na coluna de água. Foram registados CFUs em meio suplementado com VAN em todas as 4 recolhas, mas só foram encontrados CFUs em SB+CIP na recolha 2. O pico de CFUs de *Enterococcus* spp. totais foi detetado na recolha 2 tendo o segundo pico na recolha 4, contrariando o padrão da pluviosidade.



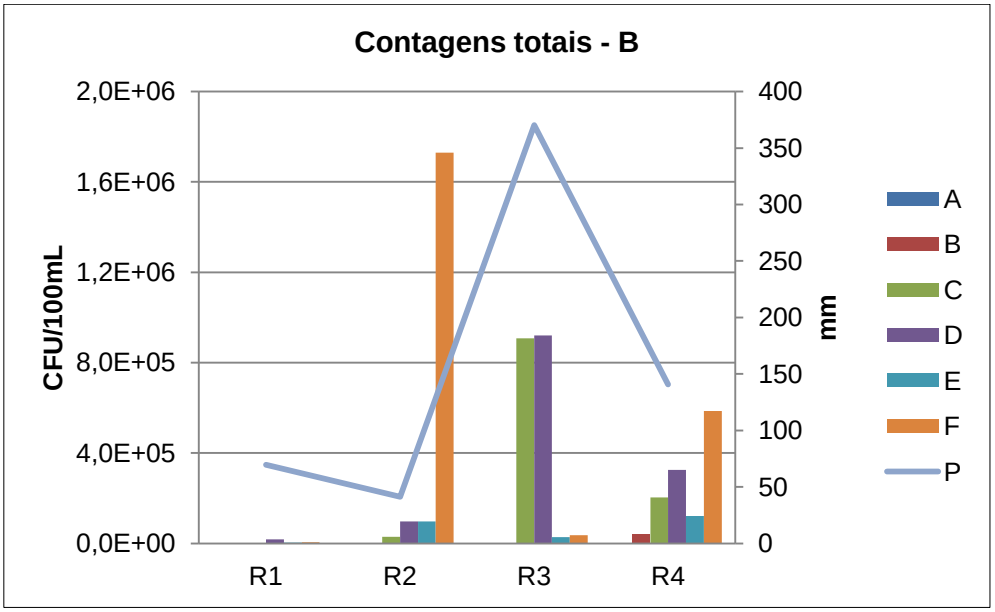


Figura 46: Variação da distribuição das contagens de *Enterococcus* spp. nos 6 pontos ao longo das 5 recolhas. O gráfico A corresponde à coluna de água e o B ao biofilme

A **figura 46** demonstra a progressão de CFUs totais nas 5 recolhas feitas na coluna de água e no biofilme para os 6 pontos estudados.

No geral, o que se pode constatar é que de facto não há uma relação direta entre a pluviosidade e as contagens totais de CFUs. É interessante destacar que os picos de contaminação são diferentes de ponto para ponto, sendo que só coincidem no ponto D e E na recolha 4. Os CFUs contabilizados em A e B foram muito baixos em todas as recolhas, podendo dizer-se que estes dois pontos são pontos de baixa contaminação. Com efeito, é o ponto C que regista um aumento da contaminação, podendo ser descrito como o ponto em que a contaminação de origem fecal começa a ter uma expressividade significativa. As contagens neste ponto oscilam ao longo das 5 recolhas, só descendo dos 200 CFU/100ml na recolha 5, onde regista os valores mais baixos de CFUs. No ponto D, os picos de contaminação foram nas recolhas 3 e 4, nos pontos E e F foram nas recolhas 1 e 4.

O caso do biofilme a progressão foi diferente da colunado de água, além de que os valores encontrados nas amostras de biofilme foram bastante superiores. Na recolha 4 verificou-se um padrão de evolução das contagens interessante ao longo dos pontos, sendo que os valores de CFUs aumentam progressivamente até ao ponto D, descendo no ponto E e voltando a subir no ponto F. As recolhas 2 e 3 mostram que essa progressão não acontece na realidade, uma vez que as contagens de CFUs são baixas em todos os pontos, com exceção do ponto F, que tem um pico de $1{,}73 \times 10^6$ CFU/100ml na recolha 2, e dos pontos C e D que têm valores idênticos de CFUs, muito diferentes das contagens nos outros pontos.

4.3- Contagens de células por FISH

A vantagem das contagens de células por FISH é o facto de poderem ser contabilizadas todas aquelas bactérias que não tiveram a capacidade de crescer em meio de cultura. Sendo que o meio aquático não ser o meio ótimo para este género de bactérias, estas acabam por estar em constante *stress* para sobreviver, o que, em muito dos casos, as torna viáveis mas não cultiváveis, não tendo capacidade de se desenvolver em meio de cultura. Como as contagens totais em biofilme foram feitas por incorporação, esta técnica aumenta o nível de *stress* por se adicionar meio quente, a 50°C, ao substrato onde se encontram as bactérias.

4.3.1- *E. coli*

As contagens de *E. coli* forma realizadas no biofilme nas 4 primeiras recolhas, enquanto as contagens na coluna de água foram feitas apenas a partir da recolha 2, por um problema de otimização de protocolo. As contagens a partir das amostras do biofilme foram diretas, enquanto que as amostras da coluna de água foram sujeitas a um pré-enriquecimento *over-night*, por forma a garantir que era detetada a presença das bactérias pretendidas uma vez que o volume de amostra de água que se usa neste protocolo é muito baixo (10 µL por poço), permitindo, então, neste caso apenas a identificação e não a real quantificação (Almeida *et al.*, 2010). Não obstante, estas contagens permitem ter uma ideia da introdução de contaminação fecal num determinado local numa determinada data.

Para o biofilme vão ser apresentados dois gráficos devido ao facto de a escala necessária para analisar as células/mL no ponto F não permitir ter uma noção da progressão da contaminação ao longo do tempo. Assim sendo, a Fig. 45A mostra a progressão dos 6 pontos e a **figura 45B** mostra essa progressão sem os dados do ponto F.

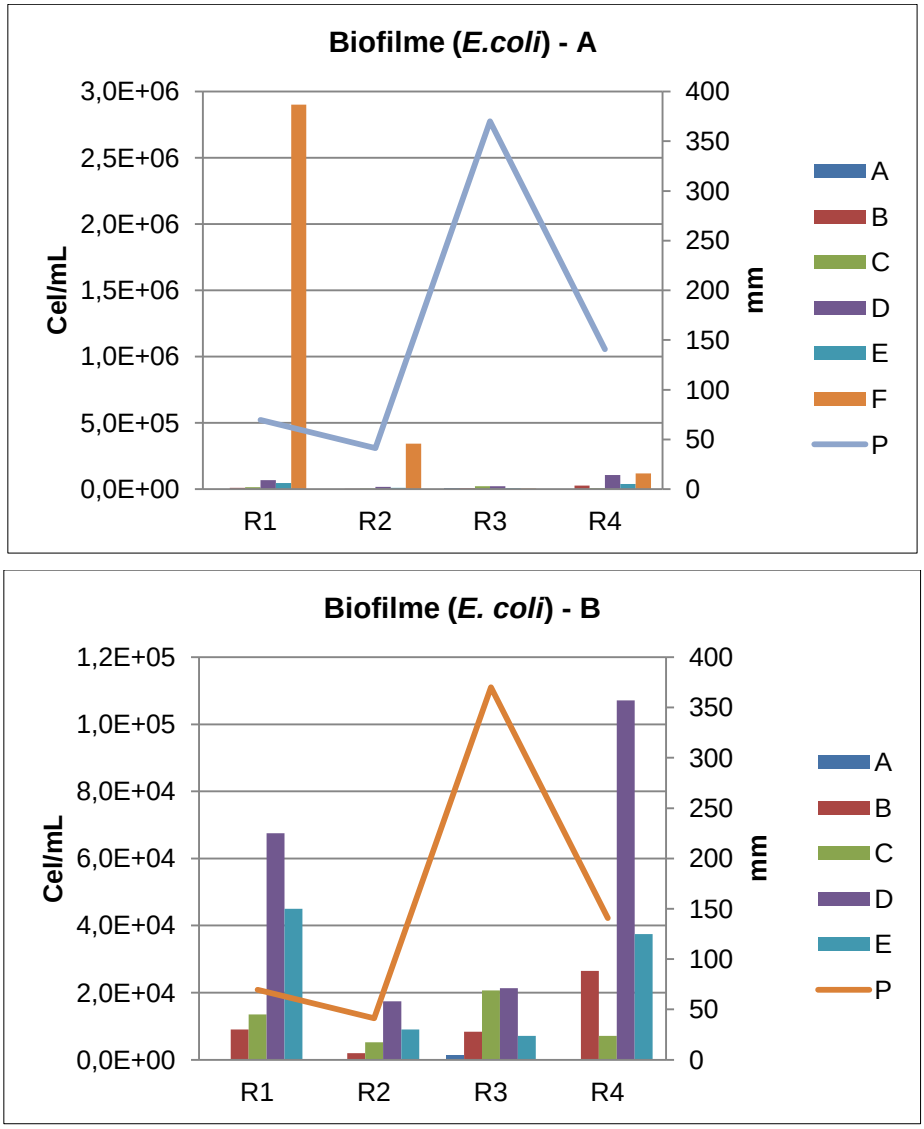


Figura 47: Variação da distribuição das contagens de *E. coli*. por FISH (células/mL) no biofilme. No gráfico A estão presentes os resultados dos 6 pontos e no B estão presentes os dos pontos A, B, C, D e E.

A **figura 47** mostra a discrepância grande entre as contagens no ponto F em relação às outras contagens, sendo que as contagens mais altas de F atingem os $2{,}90x10^{6}$ cel/ml na recolha 1 e nos outros pontos, as contagens mais elevadas são no ponto D na R4 atingindo as $1{,}07x10^{5}$ cel/ml. Com efeito, a exceção da recolha 3, em que o ponto F regista $5{,}16x10^{3}$, abaixo dos $2{,}13x10^{4}$ do ponto D, o ponto F é aquele que regista valores mais elevados de contaminação em todas as recolhas. Ao retirar o ponto F do gráfico, o que se verifica é que de facto, o ponto D é o que regista a maior contaminação em todas as 4 recolhas. Este é mais elevado na recolha 4 seguida da recolha 1. O ponto A tem contagens nulas ou muito baixas em toas as recolhas, sendo que só foram detetados células na recolha 3, na ordem das $1{,}29x10^{3}$ células/ml. O ponto B registou o valor mais elevado de células por ml. Mas uma vez esta progressão não está dento do esperado em nenhuma recolha.

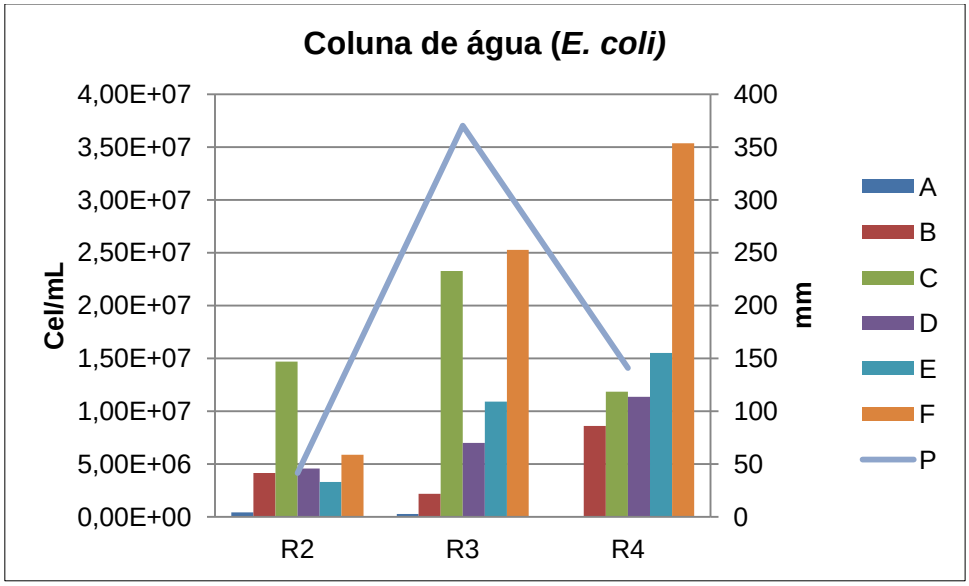


Figura 48: Progressão espácio-temporal das contagens de células na coluna de água nos 6 pontos por FISH

As contagens de *E. coli* por FISH na coluna de água, ressalvando o pré-enriquecimento, estão apresentadas na **figura 48**. O que se pode inferir com estes resultados é onde se detetou maiores contaminações pontuais e onde a contaminação é efetivamente uma realidade, se esta segue um padrão coincidente com a pluviosidade ou não e como se comporta ao longo do tempo.

Olhando para o gráfico que expressa as contagens (células/mL) de *E. coli* e a pluviosidade como pano de fundo, o que se pode verificar é que de facto a pluviosidade pode ter tido um impacto importante, em especial no ponto C e F. O ponto C segue claramente uma tendência idêntica à da pluviosidade, aumentando na recolha 3, em que a pluviosidade teve um pico. O ponto F tem um aumento acentuado da recolha 2 para a 3, continuando a aumentar na recolha 4. No ponto E, há também um aumento crescente ao longo das recolhas. O ponto B, curiosamente mostra uma progressão diferente, com o aumento da pluviosidade houve um decréscimo nas contagens, que voltaram a subir na recolha 4. O ponto A, como esperado tem contagens sempre muito baixas indicando que não tem o impacto de contaminação que os outros pontos apresentam. O ponto D tem um aumento progressivo da contaminação da recolha 2 para recolha 4, podendo a pluviosidade ter influenciado a progressão da recolha 2 para a recolha 3, mas não é possível assegurar tal coisa com os dados de que se dispõe.

Tabela 16: Tabela da progressão espaciotemporal das contagens no biofilme em meio de cultura e em FISH para *E. coli*.

	R1		R2		R3		R4	
	CFU/mL	Cel/mL	CFU/mL	Cel/mL	CFU/mL	Cel/mL	CFU/mL	Cel/mL
A	0	0	0	0	0	1290	0	0
B	2	9010	0	1940	110	8390	190	26500
C	4	13500	90	5160	290	20700	500	7100
D	19	67500	1140	17400	1660	21300	5880	107000
E	11	45000	280	9040	140	7100	620	37400
F	12	2900000	106	342000	110	5160	1480	119000

A **tabela 16** representa os valores de CFU/mL contabilizados no biofilme e as contagens de células/mL nesse mesmo biofilme, para os 6 pontos nas 4 recolhas que este foi analisado. Numa primeira abordagem, o que se verifica é que as contagens de células de *E. coli* por mL são sempre muito superiores às contagens de CFUs em meio de cultura.

O que se verifica, logo à primeira vista, é que no ponto A não foram contabilizados CFUs e apenas na recolha 3 foram contabilizadas células de *E. coli*, todas elas viáveis mas não cultivais. A progressão que se regista pelas contagens de células por FISH no ponto F, em que regista os valores mais elevados nas recolhas 1, 2 e 4, não coincide com a progressão que se regista nas contagens de CFUs por meio de cultura. Neste ponto, apenas na recolha 3 é que as contagens de células/mL são inferiores aos contabilizados nos pontos B, C, D e E, sendo que para todas as outras recolhas, o ponto D registou os valores de cel/mL mais elevados dos 6 pontos.

A recolha 3 é a única que regista contagens de cel/mL em todos pontos. Esta recolha coincidiu com um período de chuvas intensas depois de um grande período de seca, levando a um aumento do caudal e da velocidade da corrente. Nesta recolha, a progressão entre os CFUs e as Cel/mL são mais ou menos coincidentes, sendo que ambos aumentam e diminuem em simultâneo, mas a nível de proporções, o ponto C regista valores, embora inferiores ao ponto D, como sugerem os valores de Cel/mL, superiores aos registados no ponto B, um aumento muito superior àquele que é sugerido pelos CFUs.

No ponto D, com a exceção da recolha 2, a progressão de CFUs acompanha a de células contabilizadas em todas as recolhas.

Em todas as recolhas, houve uma diminuição em ambos os valores do ponto D para o ponto E. No ponto F, registam-se valores mais elevados que no ponto E, sendo a progressão dos CFUs acompanhada pela progressão das células contabilizadas,

mas numa proporção muito maior do que esperado, sendo que atingem valores superiores aos valores registados no ponto D, que foram os pontos onde se registaram os valores mais elevados nas contagens de CFUs.

4.3.2- *Enterococcus spp.*

O princípio para as contagens de *Enterococcus* é o mesmo que para a *E. coli*, tendo as mesmas vantagens e desvantagens. No caso específico destas contagens, foram utilizados marcadores para duas espécies de *Enterococcus* spp. caracteristicamente associados a contaminações fecais, quer de origem humana (*E. faecalis*) quer de origem animal (*E. faecium*). . Embora não seja linear, existem evidências de que na flora intestinal humana *E. faecalis* predomina sobre *E. faecium*, sendo que no caso animal é o contrário (Devriese *et al*., 2006). Por serem estas as espécies principais que se encontram na flora intestinal foram usados sondas rRNA específicas apenas para estas duas espécies.

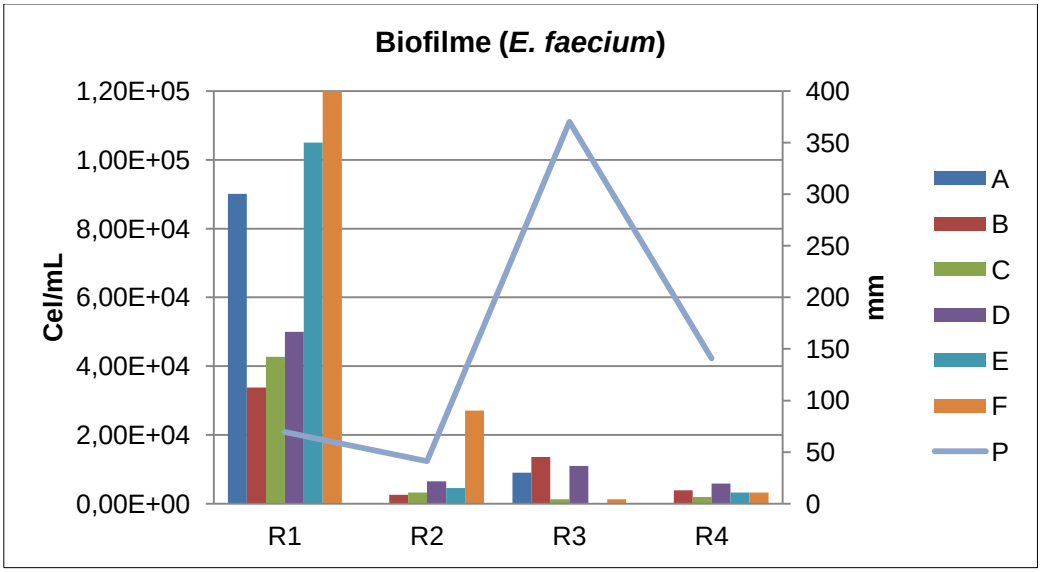


Figura 49: Progressão espácio-temporal das contagens células de *E. faecium* no biofilme nos 6 pontos

Tal como se verificou nas contagens de células viáveis de *E. coli*, nas amostras de biofilme, o valor de células /mL no ponto F na recolha 1 teve de ficar acima da escala escolhida, de forma a ser possível analisar as progressões nos outros pontos, uma vez que as contagens para o ponto F de *E. faecium* foram elevadas (1.22×10^{6}) (**fig. 49**).

No geral, as contagens mais elevadas de *E. faecium* no biofilme em todos os pontos foram na recolha 1, em que o ponto A e E apresentaram valores muito

elevados, algo que não seria de todo esperado no ponto A. A progressão nesta recolha entre os pontos B, C e D foram as esperadas. os valores obtidos nos pontos E e F mostram que houve algum tipo de contaminação acentuada nestes dois pontos nesta recolha. As recolhas 2, 3 e 4 registaram valores entre os 0 e os 6.07×10^4 células/mL, sendo este último valor correspondente ao ponto F na recolha 2. No ponto A, nas recolhas 2 e 4 foram encontradas 0 células de *E. faecium,* assim como no ponto E na recolha 3. Nesta mesma recolha, os valores mais elevados encontraram-se nos pontos A, B e D. apesar de ponto D se esperar encontrar contaminação, o mesmo não seria de esperar no ponto A e B onde se obteve valores de 6.4510^2 e 3.8710^3 células/mL, respetivamente. Na recolha 4, os valores das contagens foram muito próximos nos vários pontos, variando entre 1.94×10^3 células/mL no ponto C e 5.81×10^3 células/mL no ponto D.

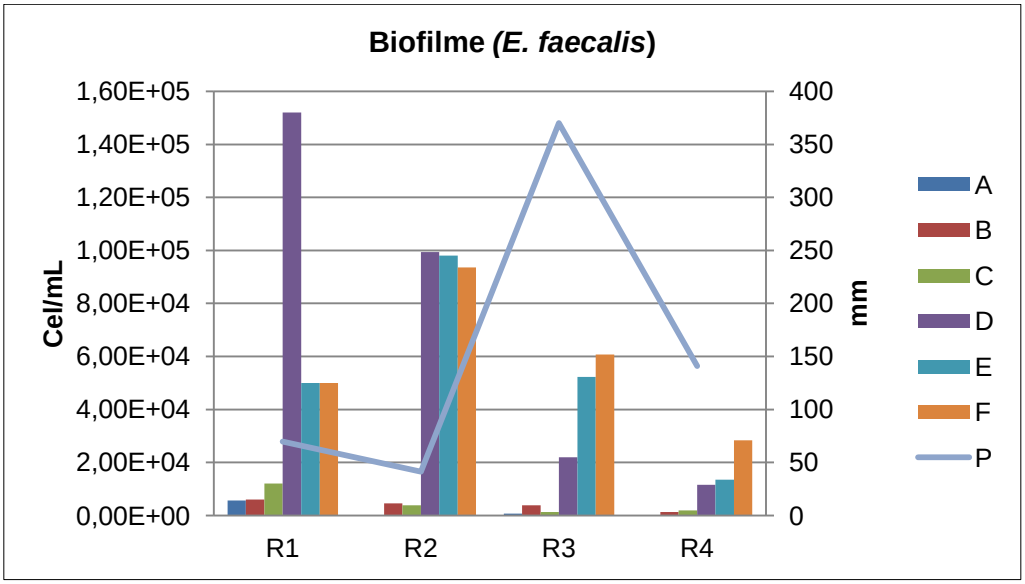


Figura 50: Progressão espácio-temporal das contagens células de *E. faecalis* no biofilme nos 6 pontos

Também relativamente às amostras de biofilme, no caso das contagens de células viáveis de *E. faecalis* houve uma diferença em relação às contagens de *E. faecium*. Na recolha 1, o ponto D apresentou um pico de contaminação muito elevado, o mais alto de todas as contagens, 1.52×10^5 células/mL. No ponto A, apenas foram encontrados *E. faecalis* nas recolhas 1 e 3, apesar de no gráfico não ser percetível divido á escala, com valores os 5.63×10^3 e 6.45×10^2 células/mL, respetivamente; os pontos E e F tiveram o mesmo número de células/mL, 5.00×10^4; os pontos B e C tiveram sempre valores muito baixos em relação aos dos pontos D, E e F. Na recolha 4 obtiveram-se os valores mais baixos dos pontos D, E e F, estando de acordo com o expectável, uma vez que há um aumento de densidade populacional ao longo do

curso do rio. Na recolha 2, os valores mais elevados também se verificaram nos têS últimos pontos (D, E e F). Por fim, na recolha 3 há um aumento notório do ponto C para o D e deste para o E.

De uma maneira geral, no biofilme de *Enterococcus* spp. o que se pode verificar é que os valores de *E. facaelis* encontrados foram superiores aos valores de *E. faecium,* com exceção da recolha 1. Nas recolhas 2 e 4 não foram encontrados *Enterococcus* spp. de nenhuma das duas espécies no ponto A.

Observando os dois gráficos, o que se verifica é que nos ponto A, B e C predominou *E. faecium*, enquanto que nos pontos D, E e F, foi mais abundante *E. faecalis*, com exceção da recolha 1 no ponto E e F em que a maior parte das células contadas eram *E. faecium*.

Tal como para a *E. coli*, para a determinação de *E. faecalis* e *E. faecium* na coluna de água foram apenas analisadas as amostras obtidas nas recolhas 2, 3 e 4, e o protocolo exigia um pré-enriquecimento que levou a que as contagens não pudessem ser comparadas diretamente em termos quantitativos com as contagens em meio de cultura na coluna de água. Assim sendo, o que se pode inferir destas contagens é precisamente se houve um aumento ou não e onde é que houve uma introdução destas duas espécies de *Enterococcus* na coluna de água. As contagens de *Enterococcus* spp. na coluna de água, mesmo após enriquecimento, foi inferior às contagens de *E. coli*.

Na **figura 51** o que se expressa são as contagens de células viáveis de *E. faecalis* e *E. faecium* na coluna de água, tendo como pano de fundo a pluviosidade registada nessas datas. O que se pode inferir através de uma primeira observação, é que a pluviosidade não foi uma condicionante para a evolução da contaminação, sendo que no caso dos *E. faecium* se detetaram os valores de células/ml mais baixos, tendo aumentado em quase todos os pontos na recolha 4. Esta recolha foi de facto a recolha em que se detetaram valores mais elevados de contaminação em quase todos os pontos analisados com exceção do ponto A. Os valores de *E. faecium* detetados foram, na generalidade mais elevados que os de *E. faecalis*. O ponto que contabilizou maior número de células/mL foi o ponto E para *E. faecium*, na ordem nos 8.00×10^6 e o ponto F *para E. faecalis* com valores na ordem dos 1.65×10^6.

Analisando os dois gráficos, o ponto F teve um valor na recolha 4 idêntico para *E. faecalis* e *E. faecium*, apresentando para *E. faecium* $1{,}92\text{x}10^6$ e para *E. faecalis* $1{,}65\text{x}10^6$. Na recolha 3, não se detetaram quaisquer células de *E. faecium* nos pontos A e C, e *E. faecalis* nos pontos A, B, E e D.

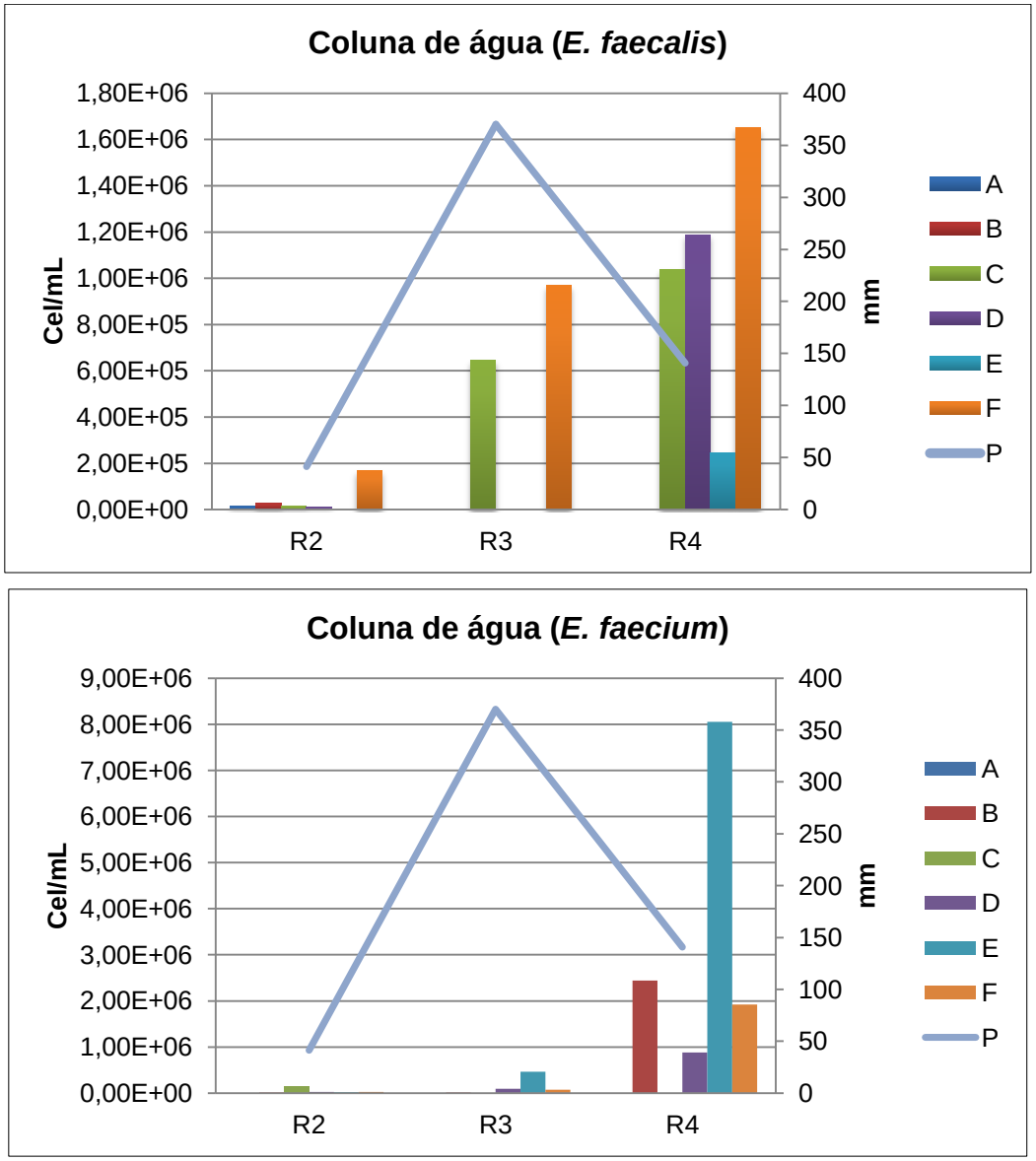


Figura 51: **P**rogressão espácio-temporal de contagens células/mL na coluna de água para *E. faecalis* e *E. faecium*.

4.4- Análise e estudo das resistências aos antimicrobianos

Dos isolados retirados das diferentes placas com meios suplementados, foram realizados ao todo 229 antibiogramas para *E. coli* e 176 para *Enterococcus* spp..

De uma forma geral, e confirmando o que se começou por supor aquando da análise das contagens nas placas dos meios suplementadas com antibióticos, nem todos os isolados retirados destes meios, quando sujeitos a testes de difusão por disco, apresentaram resistência ao antibiótico em questão. Naturalmente, estes meios são uma boa forma de pré-seleção de isolados com perfis de resistências importantes, sendo até grande parte deles MDR, mas nem sempre há garantia de que todos os

isolados que se retiram são efetivamente resistentes ao antibiótico que foi incorporado no meio.

O número de antibiogramas efetuados e analisados em cada uma das recolhas não foi sempre o mesmo, sendo que na recolha 1 se analisaram 65 antibiogramas, na recolha 2 52, na recolha 3 65 e na recolha 4 50. Embora se tenha tirado o mesmo número de isolados de cada meio, houve casos de falsos positivos, ou seja, não vieram a ser posteriormente identificados como E. coli ou Enterococcus spp., não tendo sido portanto antibiogramas (ABG). Em certos casos, para os mais duvidosos, recorreu-se a galerias de testes bioquímicos como o Rapid One (*E. coli*) e Rapid Strep (*Enterococcus* spp.).

4.4.1- Análise do perfil de resistências e filogrupos de *E. coli*

As resistências mais comuns que se encontraram entre todos os isolados de E. coli para os quais se realizou ABG foram à TE (tetraciclina) e à AMP (ampicilina). O conjunto de resistências mais comummente encontrado em *E. coli* foi AMP TE SXT C. Nos isolados que se analisaram, as resistências à AMP e à TE eram muito abundantes, sendo que algumas apenas apresentavam resistências ao TE. A conjugação de AMP TE e SXT foi muitas vezes encontrada em vários pontos a em todas as recolhas que foram feitas. Por sua vez, a resistência ao C (cloranfenicol) não se verificou em tão grande número.

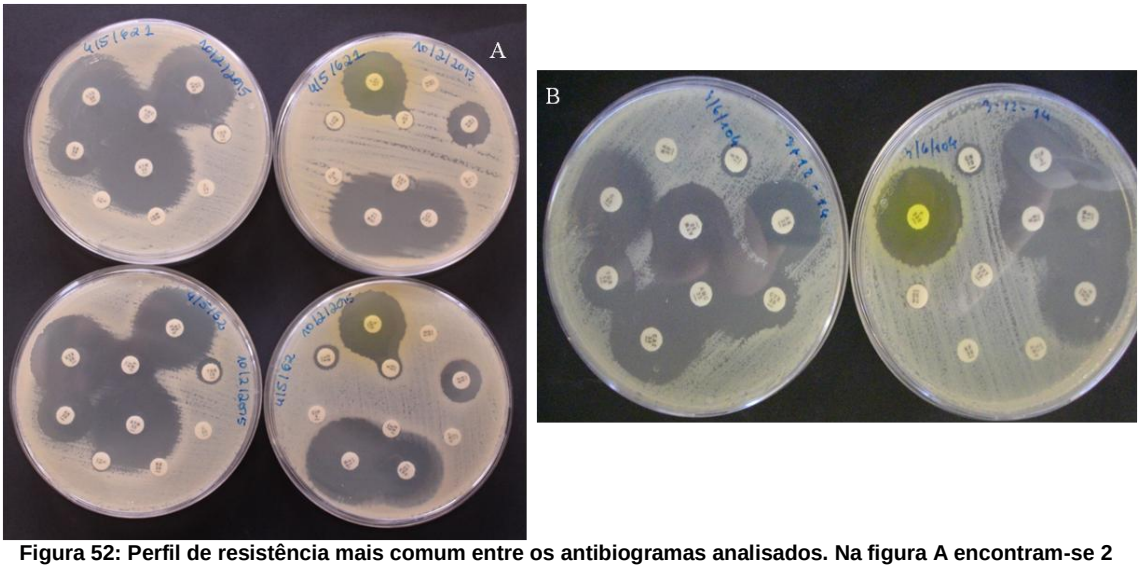


Figura 52: Perfil de resistência mais comum entre os antibiogramas analisados. Na figura A encontram-se 2 antibiogramas com resistência a AMP TE SXT e C e na B apenas ao AMP TE e SXT. Em alguns casos encontram-se resistências a outros antibióticos, mas este perfil base é muito comum.

Foram observados alguns tipos de sinergias a antagonismos quando se observaram os antibiogramas, sendo que alguns apresentavam halos enviesados, que podiam apresentar-se mais pequenos quando na proximidade de alguns antibióticos, como exemplo a resposta antagónica entre AMP e FOX, ou maiores quando na proximidade de outro, como a resposta sinergística observada entre AMP e K.

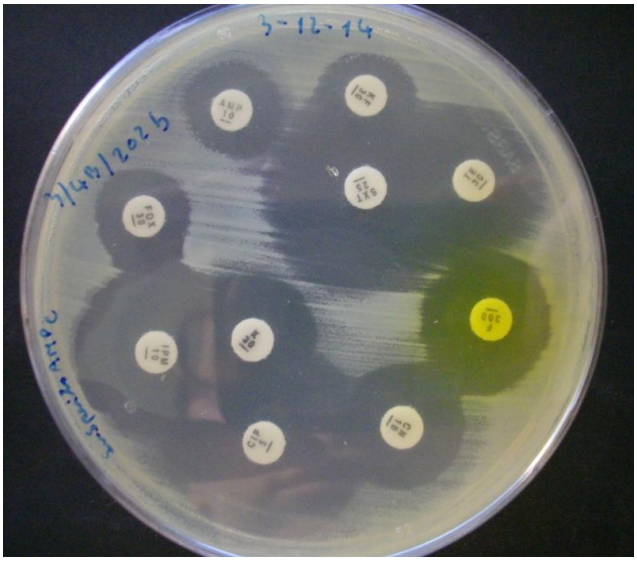


Figura 53: Tipos de sinergia e antagonismo encontrados várias vezes nos antibiogramas analisados.

Quando era observada uma *E. coli* com uma sinergia típica entre os beta-lactamicos, CTX, CAZ, ATM e AMC, em que em vez de se formar um círculo perfeito em torno de cada um dos discos, se formava uma espécie de sombra na interceção dos dois halos ou mesmo entre os dois discos, esse fenótipo era caracterizado como sendo indicativo da produção de beta-lactamases de longo espectro (ESBL), e eram guardadas para análises posteriores. Estes isolados caracterizados como produtores de ESBL, foram encontrados em todas as recolhas, em quase todos os pontos menos no ponto A, perto da nascente. No ponto B, apenas forma encontradas 6 isolados de E. coli produtoras de ESBL na primeira recolha (5 retiradas de meio suplementado com CTX e outra de meio suplementado com CIP).

Ao todo obteve-se 67 isolados com este fenótipo, sendo que as resistências associadas a estes não eram de todo iguais, com algumas exceções. Alguns desses isolados obtidos do mesmo ponto e da mesma origem, planctónicos ou biofilme, apresentavam o mesmo perfil de resistências aos antimicrobianos, daí que desses tenha sido escolhido apenas um para os estudos seguintes.

Figura 54: Perfil característico de uma ESBL (*extend spectrum β-lactamase*).

Assim sendo, de todas as *E.coli* que se analisaram, 149 foram recolhidas para serem analisadas geneticamente e chegar ao seu filogrupo. Destas 149, a maioria era MDR, 1 era XDR e 1 (**tab. 18**).

O gráfico que se segue (**fig. 55**) mostra a distribuição das MDR pelos 6 pontos nas 4 recolhas efetuadas.

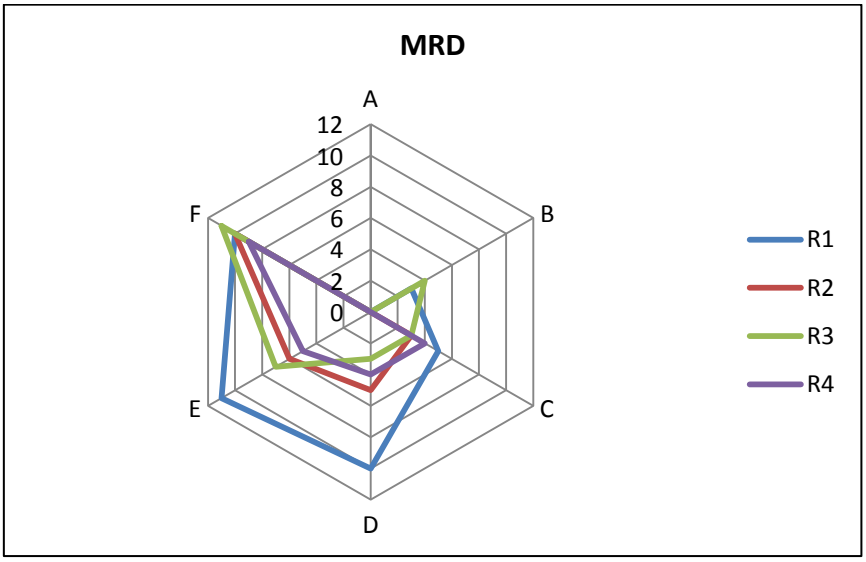


Figura 55: Distribuição da totalidade das *E. coli* MDR (multidrug resistant) obtidas nas 4 recolhas efetuadas nos 6 pontos estudados.

Os isolados MDR analisados, foram originários quer da coluna de água quer do biofilme. A respetiva distribuição de acordo com a origem pode ser observada na **figura 56**.

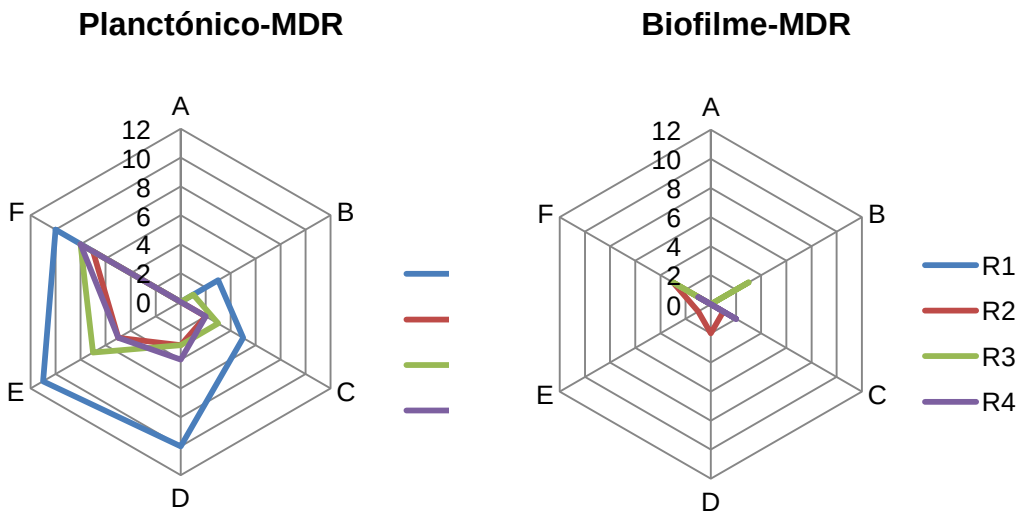


Figura 56: Distribuição dos isolados de *E. coli* MDR por fonte de origem e em cada ponto nas diferentes recolhas.

Observando a **figura 56**, o que se verifica é que o maior número de isolados multirresistências foi obtido na coluna de água.

Observando o panorama geral, o que se verifica é que os pontos D, E e F são aqueles que apresentam uma maior incidência de *E. coli* MDR em todas as recolhas efetuadas, sendo que o ponto C pode ser visto como o ponto onde se inicia a introdução/aparecimento destas estirpes no rio, apesar de terem sido encontrados isolados de *E. coli* MDR no ponto B mas não com uma evidencia e regularidade tão visível como no ponto C. O facto de estas serem encontradas no ponto B é preocupante e o facto de este ter sido esporádico, ou seja, só se verificou na recolha1 e na recolha 3. Com já referido a cima, foram encontradas uma XDR e uma PDR no ponto D na recolha 4, ambas resistentes ao IMP. Devido a todas as resistências detetadas nestes isolados, confirmou-se se seriam efetivamente *E. coli* recorrendo à galeria de testes bioquímicos Rapid One.

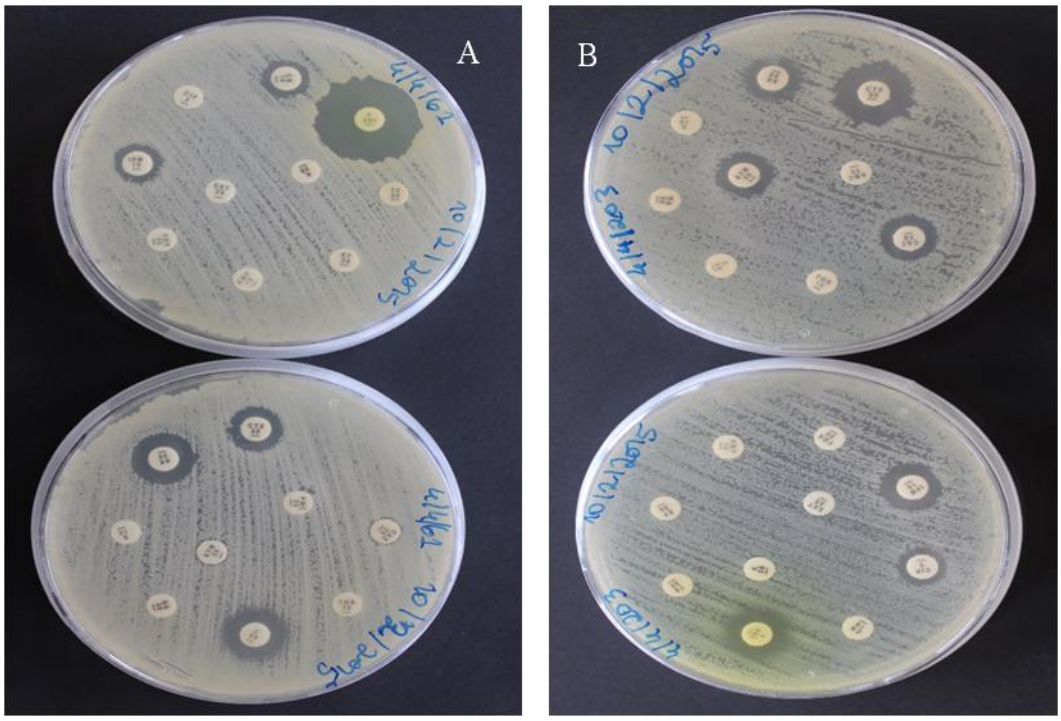


Figura 57: Antibiogramas dos isolados de XDR (A- 4/4/61) e PDR (B- 4/4/203).

No caso do 4/4/203, o Rapid One confirmou todos os outros testes bioquímicos que se tinham feito, mas o Rapid do isolado 4/4/61identificou-o como sendo *Shigella* sp., o que levantou dúvidas a cerca da sua identificação. Foram encontrados mais 2 isolados, também no ponto D, que foram caracterizados como MDR e que não sendo resistentes ao IMP, apresentavam no entanto um halo com um diâmetro considerado intermédio. Estes 3 isolados foram sujeitos a 5 testes bioquímicos, apresentados na Tabela 17, para testar se eram efetivamente *E. coli*.

Tabela 17: Testes bioquímicos realizados para identificação de *E. coli*.

Isolados / Testes	4/4/61	4/4/203	4/4/202	4/4/201	ATCC
Citrato	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
ODC	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
LDC	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
Mobilidade	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
Indol	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo

Testou-se então um antibiótico não testado normalmente para os outros isolados, colistina (CO - 10μg). O protocolo para o teste de sensibilidade por difusão em disco é diferente do utilizado para os outros antibióticos, seguindo o protocolo sugerido por Boyen e colaboradores (2010). Todos os isolados deram sensibilidade a este antibiótico, sendo que no caso do isolado 4/4/203 foi o único antibiótico a que este isolado apresentou sensibilidade.

Por haver dúvidas se realmente eram *E. coli*, fez-se um PCR quadruplex para determinação do filogrupo de *E. coli* e de facto confirmou-se que todos os quatro isolados em questão eram *E. coli*, sendo que a 4/4/61 pertencia ao filogrupo A, o 4/4/203 e o 4/4/201 pertencem ao filogrupo E, o 4/4/202 pertence ao filgrupo F.

Desta forma confirmou-se que estes quatro isolados eram efetivamente *E. coli* e que pertenciam a um filogrupos não muito típicos. Voltou a tentar-se recuperar mais isolados a partir da água que restou mas não se voltou a isolar mais nenhum com estas características. De realçar que três destes quatro isolados, os identificados com a ordem de grandeza 200, proveio de meio suplementado com IMP e que o outro isolado resistentes ao IMP provêm de meio suplementado com CIP, marcado com a ordem de grandeza de 60.

Na Tabela 18, apresentam-se todos os MDR, XDR e PDR que foram identificados nas 4 recolhas e nos 6 pontos analisados, assim como o filogrupo e se são ESBL ou não. Através das cores é possível ter uma noção de que meios foram isolados os MDR mais significativos.

Tabela 18: Perfis de resistência mais relevantes das 149 estirpes de *E.coli* que foram utilizadas para o estudo genético. *MDR: Multidrug resistant; **XDR: Extensively drug-resistant ***PDR: Pandrug-resistant; ESBL: Extended spectrum β-lactamase; Pl: Planctónico; Bi: Biofilme

		Distribuição por pontos/origem													
		A		**B**		**C**		**D**		**E**		**F**			
Recolha	**Perfis de resistência**	**Pl**	**Bi**	**Pl**	**Bi**	**Pl**	**Bi**	**Pl**	**Bi**	**Pl**	**Bi**	**Pl**	**Bi**	**ESBL**	**Filogrupo**
4	AMP FOX IPM CIP CN F TE KF K SXT CAZ CTX AK S NA C TOB AK S NA C TOB AMC ATM***													Não	**E**
4	AMP FOX IMP CIP CN TE KF K SXT CAZ CTX AK S NA TOB AMC ATM**													Não	**A**
4	AMP FOX CIP CN TE KF K SXT CAZ CTX S NA C TOB AMC*													Não	**F**
4	AMP FOX CIP CN KF K SXT CAZ S NA TOB AMC ATM*													Não	**E**
4	AMP CIP CN TE KF K SXT CTX S NA TOB ATM*													Sim	**A**
1	AMP CIP CN TE S NA C TOB SXT K*													Sim	**A**
1	AMP CIP TE CTX ATM KF NA TOB SXT K*													Sim	**A**
2	AMP CIP TE CTX CAZ KF NA TOB SXT K*													Sim	**A**
3	AMP CIP CN TE KF CTX NA C TOB ATM*													Sim	**F**
4	AMP CIP CN TE K SXT S NA C TOB*													Não	**A ou C**
4	AMP CIP CN TE K SXT S NA C TOB*													Não	**A**
1	AMP CIP CN TE AMC KF S NA TOB*													Sim	**B1**
1	AMP FOX CIP CN TE AMC KF S NA*													Sim	**B1**
2	AMP CIP CN TE KF NA TOB SXT K*													Não	**A**

2	AMP FOX CIP TE ATM CAZ AMC KF NA*													Sim	**A**
2	AMP FOX CIP TE ATM CAZ AMC KF NA*													Não	**A**
3	AMP CIP TE KF SXT CTX S NA C*													Sim	**B1**
3	AMP CN TE KF SXT CTX S NA TOB*													Sim	**B2**
1	AMP CIP CN TE S NA SXT K*													Não	**B1**
1	AMP CIP TE S NA C SXT K*													Sim	**B1**
1	AMP CIP TE S NA C SXT K*													Não	**A**
2	AMP FOX CIP TE ATM AMC KF NA*													Não	**A**
3	AMP CIP TE K SXT S NA C*													Sim	**B1**
3	AMP CIP TE KF CTX S NA AMC*													Sim	**B1**
3	AMP CIP TE KF SXT S NA C*													Não	**A**
4	AMP CIP TE KF SXT CTX NA TOB*													Sim	**A**
4	AMP CIP TE KF SXT CTX S NA*													Sim	**A**
1	AMP CIP TE CTX KF S NA C SXT K*													Sim	**A**
1	AMP CIP TE KF NA SXT*													Não	**B1**
1	AMP CIP TE KF S NA SXT*			2+1										Sim	**A**
1	AMP CIP TE S NA C SXT*													Sim	**B1**
1	AMP F TE CTX KF C SXT*													Sim	**A**
1/2	AMP CIP TE S NA C SXT*								2					Não	**A/F**
2	AMP FOX F TE AMC KF C*													Não	**A**
2	AMP TE CTX ATM AK S SXT*													Sim	**A**

3	AMP CIP TE KF CTX S NA*											2		Sim	**B1/A**
3	AMP CN TE KF SXT S NA*													Sim	**B2**
4	AMP CIP TE KF SXT S NA*													Sim	**A ou C**
4	AMP TE KF SXT CTX S NA*													Sim	**B1/A**
4	AMP CIP KF CTX S NA C*													Sim	**A ou C**
1	AMP CIP TE KF NA *													Sim	**B1**
1	AMP CIP TE KF NA SXT*													Sim	**B1**
1	AMP CIP TE NA SXT K*					1+1								Não	**B1/A**
1	AMP CIP TE S NA SXT*													Sim	**B1**
1	AMP CIP TE S NA SXT*													Não	**A**
1	AMP FOX TE AMC KF NA*											2		Sim	**B1/A**
1	AMP FOX TE AMC KF S*													Sim	**A**
2	AMP TE CTX KF S C*													Sim	**A**
2	AMP TE CTX KF S SXT*								2					Sim	**A**
3	AMP CIP TE SXT S NA*				1+2									Não	**B1/A**
3	AMP CIP TE SXT S NA*													Sim	**A**
3	AMP FOX KF CAZ CTX AMC*													Não	**B1**
3/4	AMP TE KF SXT CTX S*									2				Sim	**B1/A**
1	AMP CIP TE KF AK S NA*													Sim	**A**
2	AMC CIP TE NA SXT*													Não	**A**
2	AMP CIP CTX KF NA*													Não	**F**

2	AMP CIP TE NA SXT*													Não	**A**
2	AMP TE CTX ATM KF*													Sim	**A**
3	AMP CIP F SXT NA*													Não	**B1**
4	AMP CIP KF S NA*													Sim	**A**
4	AMP CIP TE S NA*													Não	**A**
4	AMP FOX KF SXT AMC*													Sim	**A**
4	AMP FOX TE KF AMC*													Sim	**A**
4	AMP FOX TE KF AMC*													Não	**A**
4	AMP TE SXT S C*													Não	**A**
1/2/4	AMP CIP TE NA*									3				Não	**A/B1**
1	AMP CTX KF NA*													Sim	**F**
1	AMP FOX AMC KF*													Sim	**A**
1	AMP TE KF NA*							2						Sim	**F**
1	AMP TE NA SXT*													Sim	**B1**
1	CIP TE NA SXT*													Sim	**A**
1/2	AMP CIP NA SXT*											2		Não	**A**
2	AMP FOX AMC KF*													Não	**F**
2	AMP TE CTX KF*													Não	**A**
2	AMP TE S SXT*													Não	**A**
2/3/4	AMP TE CTX KF*									2				Sim	**A**
3	AMP TE KF S*													Não	**B1**

3	CIP SXT NA C*													Não	**B1**
4	AMP TE KF NA*													Não	**B2**
1	AMP CTX KF*									2				Sim	**F**
1/2	CIP TE NA*							2+1						Não	**A**
2	AMP CTX KF*													Não	**D**
2	TE KF S*												2	Não	**A**
3	AMP TE S*													Não	**B1**

TBX+CIP
TBX+CTX
TBX+CIP e TBX+CTX
TBX
TBX e TBX+CIP
TBX+IMP

De todos os 149 isolados analisados e caracterizados quanto a resistências pelo antibiograma, 113 deles foram escolhidos estando apresentados na **tabela 18**, sendo que têm como característica comum ser MDR. Os restantes que não estão presentes na tabela ou não apresentavam resistências nenhumas ou apenas uma ou duas, não encaixando na definição de MDR. Estes isolados foram recolhidos para se poder ter uma noção da distribuição dos filogrupos nos diferentes pontos de recolha para recolha. O facto de muitos terem perfis iguais e serem originários de pontos diferentes e de recolhas diferentes também foi tido em conta.

Ao olhar para a tabela, o que se pode observar é que as resistências que se sobressaem são as à AMP, à CIP e à S (estreptomicina). Sendo que, por ponto, e isolados do meio TBX+CTX, seria de esperar um maior número de perfis resistentes principalmente ao CTX, mas o facto de parte destes 5 por ponto em alguns casos se reduzir a apenas 1 ou 3, embora tenha havido casos em que se isolaram os 5 e eram os 5 *E. coli* e resistentes ao CTX, levou a uma diminuição no número de isolados resistentes a este antibiótico. Muitos destes isolados eram ESBL, resistente à CIP, mas só alguns eram resistentes ao CTX.

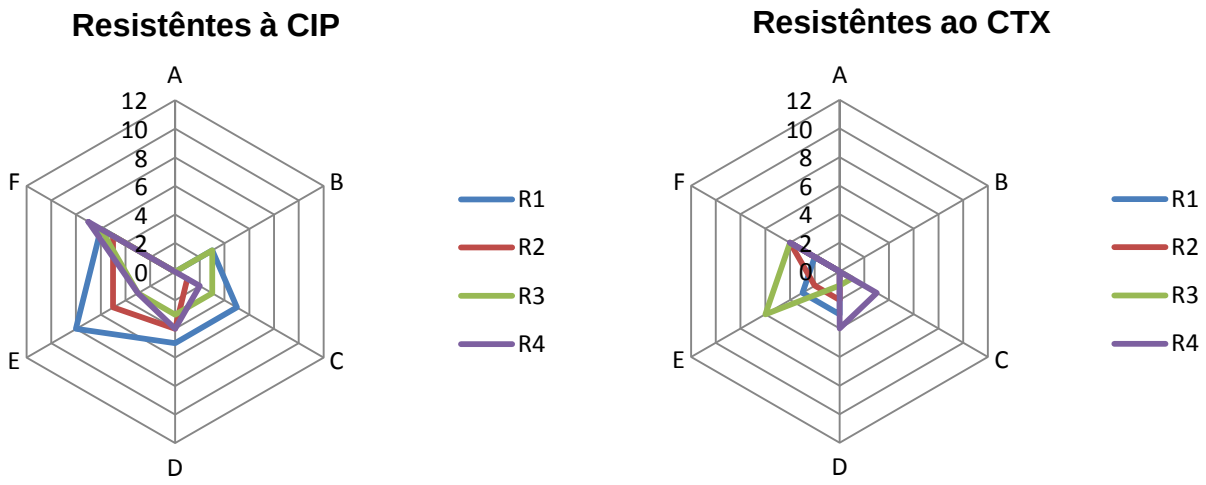


Figura 58: Distribuição das resistências à CIP e ao CTX, dos 115 isolados analisados na tabela, por pontos nas diferentes recolhas efetuadas de Junho de 2014 a Fevereiro de 2015.

A **figura 58** mostra a distribuição das resistências à CIP e ao CTX. Efetivamente, as resistências à CIP são muito mais que as resistências ao CTX, em todas as recolhas, excetuando na recolha 3 no ponto E. Tal como o esperado, no ponto A não há resistências a registar, assim como no ponto 2 apenas se detetam na recolha 1 e 3. Num panorama geral pode-se dizer que o ponto C representa o ponto a partir do qual são introduzidas as MDR em todas as recolhas, exceto nas recolhas 1 e 3.

A pré-seleção que se faz utilizando os meios suplementados é a indicada para selecionar as estirpes MDR e produtoras de ESBL. Se se analisar todas as *E. coli*

produtoras de ESBL, verifica-se que a grande maioria delas foram retiradas do meio suplementado com CTX, sendo que nem todas apresentam resistência a este antibiótico. De facto, na tabela é possível verificar que há perfis de resistências iguais em diferentes isolados em que um é produtor de ESBL e outro não. O que se verifica é que, na sua grande maioria as *E. coli* produtoras de ESBL são resistentes a pelo menos um dos β-lactâmicos.

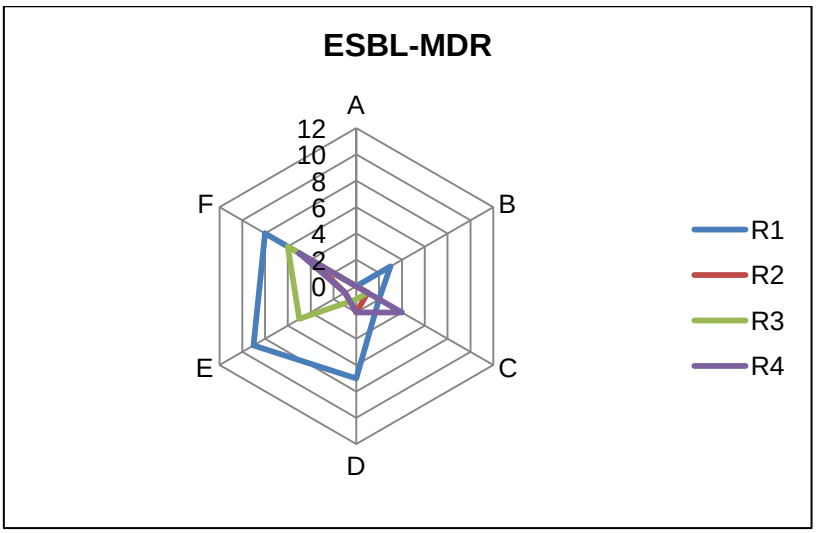


Figura 59: Distribuição das E. coli produtoras de ESBL pelos 6 pontos nas 4 recolhas

Olhando agora para os filogrupos e associando-os às resistências, verifica-se que grande parte dos isolados eram dos filogrupos A ou B1, os mais comuns de se encontrar em contexto ambiental, uma vez que são filogrupos que caracterizam *E. coli* comensais, típicas da flora gastrointestinal, coincidentes com contaminações de origem fecal. São os mais comuns de se encontrar em contaminações em rio, uma vez que o meio aquático não é o seu meio de eleição, isolados pertencentes a estes filogrupos são aqueles descritos que melhor se adaptam a diferentes ecossistemas. Assim sendo, o facto de o isolado PDR ser resistente a todos os antibióticos e pertencer ao filogrupo E, um filogrupo filogeneticamente próximo dos filogrupos característicos de *E. coli* patogénicas, ou seja, produtoras de toxinas, poderá ser uma forma de poder supor a origem desta estirpe, assim como das duas intermédias, que pertenciam ao filogrupo E e outra ao F. Estes filogrupos ainda não estão muito estudados, pelo que não se sabe qual a sua incidência e a sua capacidade patogénica, mas estão descritos como filogeneticamente próximos dos filogrupos D e B2, considerados patogénicos. Por não serem comensais e geralmente estarem associados a infeções mais graves e muitas vezes com origem hospitalar, abordaram-se os hospitais da zona estudada do Vale do Ave, que afirmaram nunca ter tido casos de infeções por *E. coli* resistente ao IMP. Por sua vez, através de análises feitas a algumas estirpes que foram

fornecidas pelo Hospital de Vila Nova de Famalicão, a incidência de *E. coli* ESBL era relativamente grande e com uma tendência crescente (dados não apresentados).

Quatro das estirpes aparecem com uma indicação no filogrupo como A ou C, todas elas da recolha 4. Não foi possível chegar ao seu filogrupo, sendo que quando se fez o quadruplex-PCR para determinar o filogrupo, apresentaram um perfil característico do filogrupo A ou C, mas quando se fez o PCR para o filogrupo C, ao analisar a eletroforese, não foi possível determinar se pertencia a este filogrupo ou não.

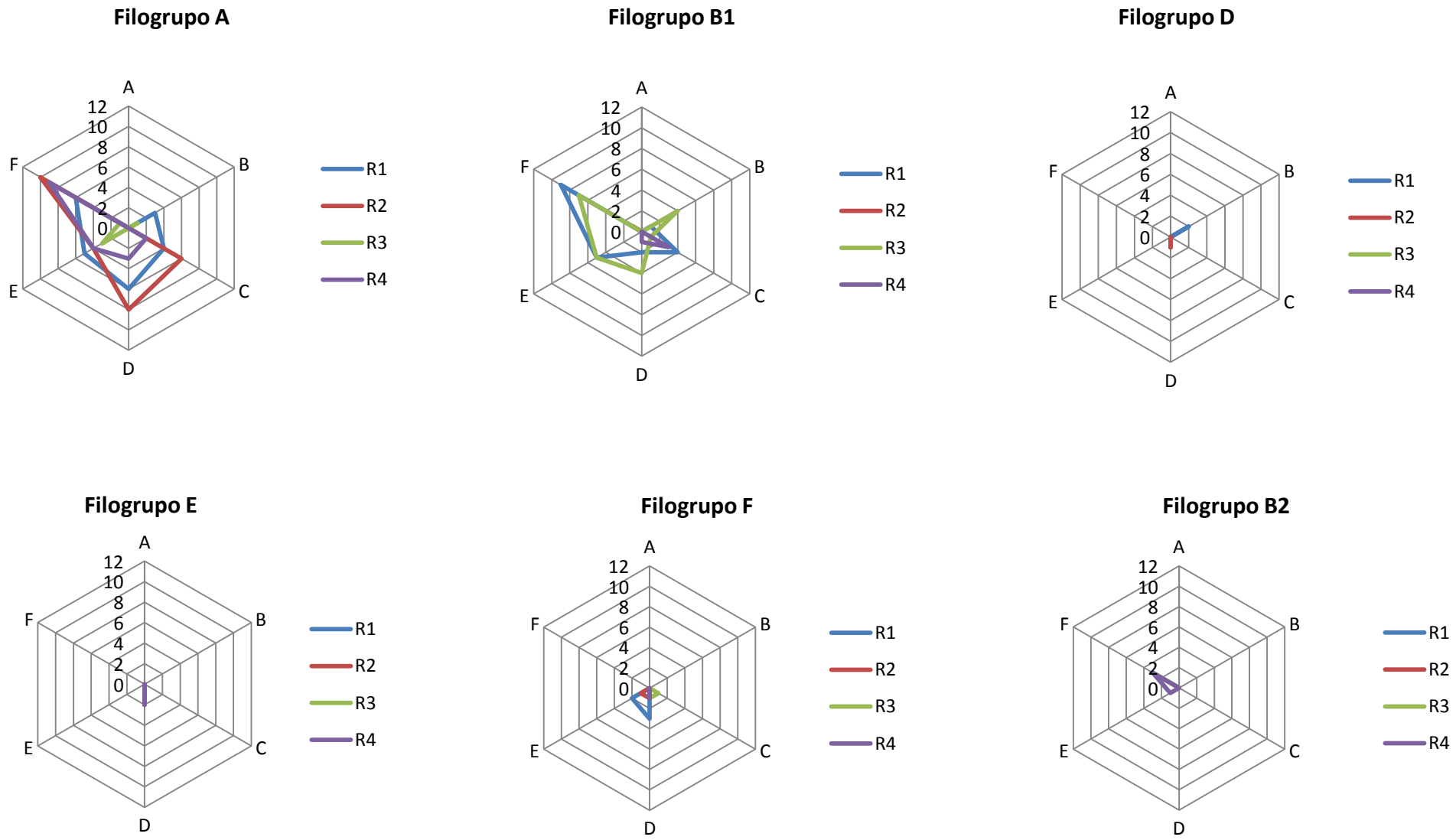


Figura 60: Distribuição dos filogrupos de *E. coli* dos 149 isolados nos 6 pontos estudados durante as 4 recolhas.

4.4.2 - Análise do perfil de resistência e identificação de *Enterococcus* spp.

No que toca aos *Enterococcus* spp., o número de isolados que efetivamente eram resistentes foi muito menor, assim como foi menor o número de isolados selecionados para estudo dos antibiogramas.

Os *Enterococccus* spp. têm como característica crescerem mais lentamente e formarem colónias muito mais pequenas e mais translucidas que as *E. coli*. São também mais difíceis de isolar. No total, foram feitos 176 antibiogramas de *Enterococcus* spp.. Partindo do princípio que todos os isolados com características fenotípicas típicas seriam efetivamente *Enterococcus* spp., era suposto ter, tal como nas *E. coli*, 3 isolados por ponto e a partir de SB+CIP, 27 por recolha, e 5 isolados por ponto de SB+VAN, 30 por recolha. De facto, o que se verificou é que na verdade, nem todos os isolados, especialmente os que foram recolhidos de SB+VAN, não eram de facto *Enterococcus* spp., tendo sido verificados casos em que eram *Leuconostoc* spp. e *Lactococcus* spp..

Destes 176, foram encontrados alguns MDR, numa incidência muito menor que em E. coli, sendo que alguns não MDR tinham resistências raras e foram também estudados. A resistência que se verificou em maior abundância foi o RD (rifampicina) sendo seguido AZM (azitromicina). A AMP, uma resistência pouco comum em *Enterococcus* spp. foi menos encontrada, sendo que mesmo assim foram identificados 29 isolados resistentes à ampicilina. Nestes 176, apenas 23 eram resistentes a vancomicina. Dos isolados retirados da mesma placa de meio e que apresentavam o mesmo perfil de resistências só um foi guardado para os estudos seguintes. Já os que tinham um perfil igual mas de pontos diferentes foram todos estudados. Do total dos 176 isolados apenas 27 eram resistentes ao QD, sendo que nem todos se vieram posteriormente a confirmar sere *E. faecalis* (espécie intrinsecamente resistente a este antibiótico). Resistências à nitroforantoina (F) e ao cloranfnicol (C) estão descritas como sendo raras, coisa que foi efetivamente verificada na análise destes isolados.

Após análise dos antibiogramas, passou-se a um estudo genético dos isolados que foram selecionados para identificação para se poder tirar mais conclusões como, por exemplo, se as resistências encontradas poderiam ser associadas com as suas características genotípicas (como o caso da resistência intrínseca dos *E. faecalis* à QD).

Sendo que não eram todos MDR, e seguindo o mesmo critério de seleção que se usou para as *E. coli*, foram analisados e estudados não só os que apresentavam um perfil MDR, mas também os que mostravam resistências a antibióticos importantes no tratamento de infeções (VA e TE) e alguns sem resistências relevantes mas que fossem um espelho da principal espécie presente neste ponto e recolha.

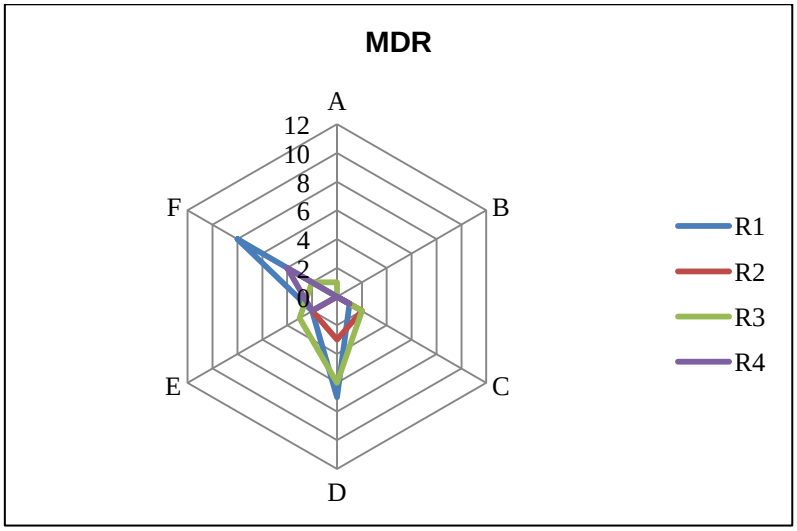


Figura 61: Distribuição dos Enterococcus spp. MDR pelos 6 pontos analisados, nas 4 recolhas efetuadas.

O que se verificou foi um menor número de *Enterococcus* spp. MDR que *E. coli* MDR, o que seria de esperar que foram analisados menos isolados. Mesmo assim, a incidência de MDR foi maior e, mais uma vez, os pontos D e F foram aqueles com maior número de isolados com estas características, sendo que o ponto E não apresenta a mesma tendência que no caso das *E. coli*. Tal como se verificou nas contagens, quer para *Enterococcus* spp. quer para *E. coli*, os pontos D e F, de uma forma geral, correspondem a dois "ponto problema", em que a incidência de contaminação e a presença de isoladas MDR é grande e preocupante.

O ponto C continua a poder ser referido como um ponto de viragem sendo que é a partir deste ponto que aparecem os primeiros *Enterococcus* spp. MDR. Excecionalmente, na recolha 3, aparecem MDR no ponto A, só voltando a aparecer no ponto C. Sendo o ponto A um ponto pristino, este acontecimento é dificilmente explicável.

Tal como nas *E. coli*, os *Enterococcus* spp. MDR também eram originários quer da coluna de água quer do biofilme (**fig. 62**).

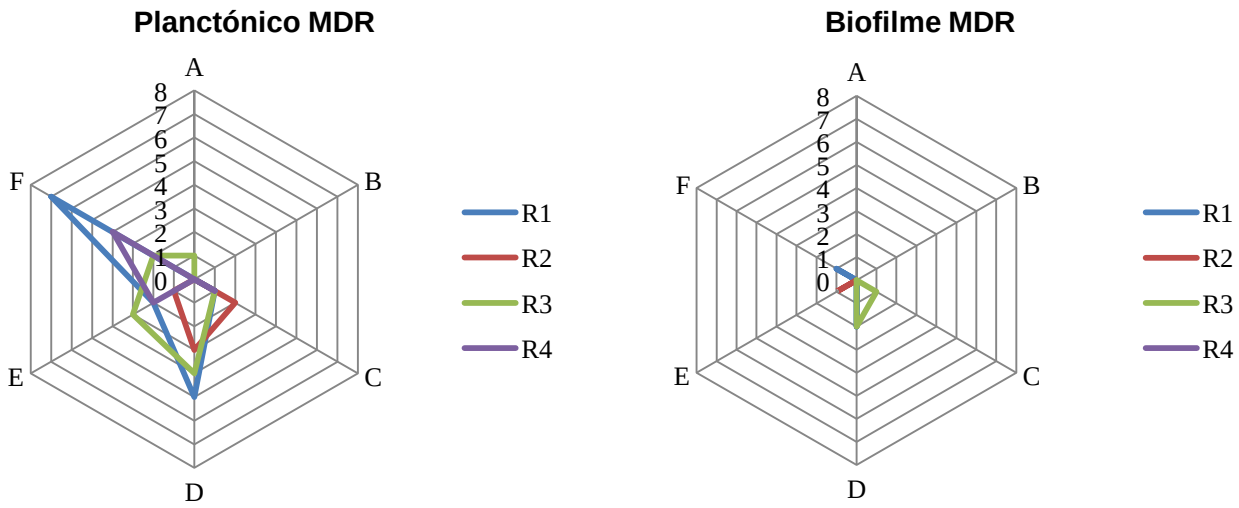


Figura 62: Distribuição dos Enterococcus spp. MDR isolados da coluna de água e do biofilme, em cada ponto por recolha.

Mais uma vez, o número de isolados MDR na coluna de água é superior do biofilme, o que está dentro do esperado. Uma nota que é importante realçar é que a maior parte dos isolados retirados de meios suplementados no biofilme, não eram efetivamente resistentes a esse antibiótico, muitos deles não sendo resistentes a nenhum antibiótico. Foi também no biofilme que se encontrou o maior número de falsos *Enterococcus*, sendo que muitos foram descartados logo que testados em Litsky. Foi dos meios SB+CIP e SB+VA que foram retirados o maior número de não *Enterococcus* spp..

Tabela 19: Perfis de resistência mais relevantes das 59 estirpes de *Enterococcus* sp. que foram carcaterizdas genéticamente. *MDR: multidrug-resistant; Pl: Planctónico; Bi: Biofilme

			Distribuição por ponto											
			A		**B**		**C**		**D**		**E**		**F**	
Recolha	**Perfis de resistência**	**Espécies**	**Pl**	**Bi**	**Pl**	**Bi**	**Pl**	**Bi**	**Pl**	**Bi**	**Pl**	**Bi**	**Pl**	**Bi**
1	AMP TE RD E DO CN CIP TEC VA AZM*	*E. feacalis*												
1	AMP RD E CN LZD CIP VA AZM*	*E. faecium*												
1	TE RD E DO CN CIP C AZM*	*E. faecalis*												
3	AMP TE RD E CIP TEC VA AZM*	*E. faecalis*												
3	TE RD E DO CN CIP AZM*	*E. faecalis*												
1	TE RD DO CIP AZM*	*E. faecium*												
1/3	AMP TE RD E DO CIP AZM*	*E. faecium*												
3	TE E DO CN CIP C AZM*	*E. faecalis*												
1	TE RD E DO CIP AZM*	*E. faecalis*												
1	TE RD E DO CN CIP*	*E. faecalis*												
2	TE RD E CIP C AZM*	*E. faecalis*												
3	AMP TE DO CN CIP AZM*	*E. faecium*												
3	TE E DO CIP AZM*	*E. faecalis*												
3	TE E DO CN AZM*	*E. faecalis*												
3	TE E DO CN CIP AZM*	*E. faecalis*												
4	TE RD E VA AZM*	*E. faecalis*												
4	AMP TE RD E CIP AZM*	*E. faecium/faecalis*											2	

1	AMP RD E CIP AZM*	*E. faecium/faecalis*							1+1		2			
1	TE DO CIP TEC VA*	*E. faecium*												
1	AMP TE E DO CIP*	*E. faecalis*												
1	TE E DO CIP AZM*	*E. faecalis*												
2/3	AMP RD E CIP AZM*	*E. faecalis/faecium/hirae*												
3	TE E DO AZM*	*E. faecalis*												
4	TE RD E AZM*	*E. faecalis*												
1	AMP RD E CIP*	*E. faecium/faecalis*												
1	TE DO TEC VA	*E. faecalis*												
1	TE RD DO CIP*	*E. faecium*												
2	TE E CIP AZM*	*E. faecalis*												
3	TE E DO CIP*	*E. faecalis*												
4	AMP TE RD AZM*	*E. faecium*												
1	AMP RD E*	*E. faecium*												
2	TE CIP AZM*	*E. faecium*												
1/2	CIP TEC VA	*E. durans/mundtii/faecium/faecalis*							1+1		2+1			
2	TE CIP VA*	*E. durans*												
2	TE RD AZM*	*E. faecium*												
3	RD CIP AZM*	*E. faecalis*												
3	TEC F VA	*E. faecalis*												

1	F VA	*E. faecium*												
1	TEC VA	*E. faecalis*												
2	CIP VA	*E. mundtii*												
4	TEC F	*E. faecium*												

SB+CIP
SB+VAN
SB+CIP e SB+VAN
SB
SB e SB+CIP

Na **tabela 19** estão representados os isolados de *Enterococcus* spp. que foram selecionados após a análise de antibiogramas, como a cima referido. Assim sendo, nesta tabela estão representados 40 perfis de 59 dos 86 isolados analisados.

Analisando a **tabela 19**, verifica-se que, mais uma vez a suplementação dos meios com antibiótico, não é uma garantia de que o que se retira destes meios e resistente a esse antibiótico. Grande parte dos isolados resistentes à CIP e à VA (**fig. 63**) não provieram dos meios suplementados com esses antibióticos, sendo que muitos dos isolados, que eram *Enterococcus* spp., não eram resistentes a qualquer antibiótico.

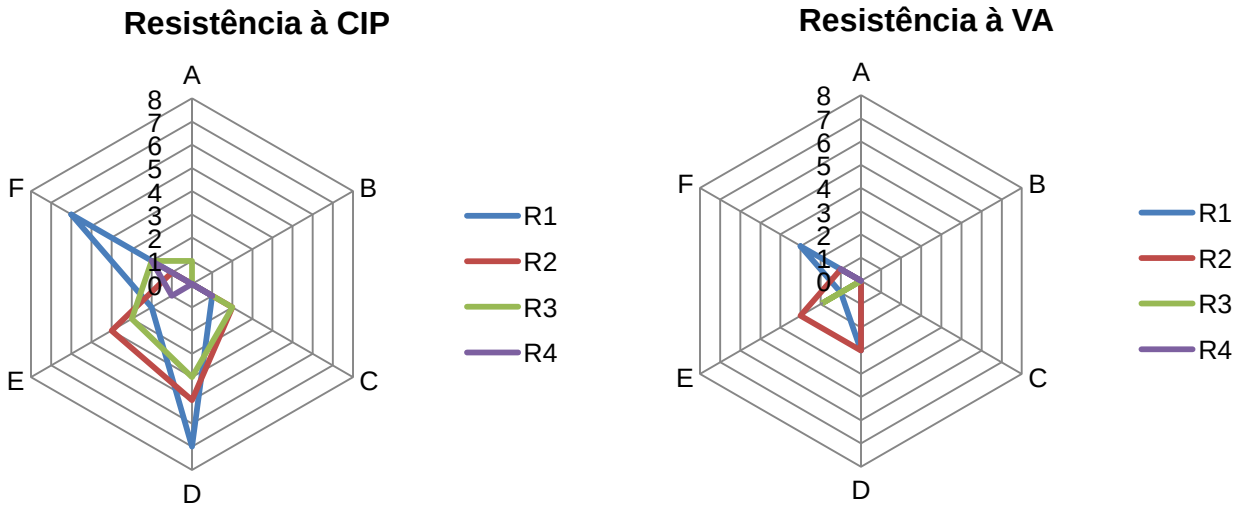


Figura 63: Distribuição dos 86 isolados com resistências à CIP e à VAN pelos diferentes pontos estudados nas diferentes recolhas efetuadas.

Olhando para a origem destas estirpes multirresistentes, observa-se que as resistentes aos dois antibióticos, provieram sobretudo nos pontos D, E e F, sendo portanto a partir do ponto C o ponto de viragem. No caso dos isolados resistentes à VA, no ponto C não há resistências verificadas, só nos 3 últimos pontos, e na recolha 4 apenas se verificou um isolado VAr no ponto F. A recolha 4, no geral, foi a que apresentou mais isolados MDR, tanto *E. coli* como *Enterococcus* spp., e foi onde apareceram alguns dos mais importantes. Por sua vez, na recolha 1, houve uma grande abundância de MDR em Enterococcus spp., tendo sido onde se verificou maior número de resistentes à CIP e à VA.

Olhando para os 13 isolados não MDR presentes na tabela, temos que 6 isolados, 4 com origem em SB+VA e 2 com origem em SB+CIP têm o mesmo perfil, CIP TEC VA. Este perfil não representa um MDR, uma vez que TEC e VA são da mesma categoria, mas são resistentes a 3 antibióticos importantes. Estão presentes também, dois perfis que não sendo MDR são relevantes, os resistentes a nitroforantoina (F). Desta forma, apresentam-se os perfis F VA, TEC F VA e TEC F, que apresentam resistência a mais de um antibiótico relevante. A resistência à F é extremamente rara em *Enterococcus* spp..

Analisando as espécies de *Enterococcus* spp. identificadas nas 4 recolhas, verifica-se que as espécies que se encontram em maior abundância são os *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* (**fig. 64**). Apenas na recolha 2 temos uma variabilidade nas espécies identificadas, em que surgem pela primeira vez espécies como *Enterococcus mundtii*, *Enterococcus hirea* e *Enterococcus durans*, sendo que na sua maioria têm o perfil não MDR, CIP TEC VA. Olhando apenas para os VAr, verifica-se que são, na sua maioria *E. faecalis*, seguido dos *E. faecium* e dos *E. durans*.

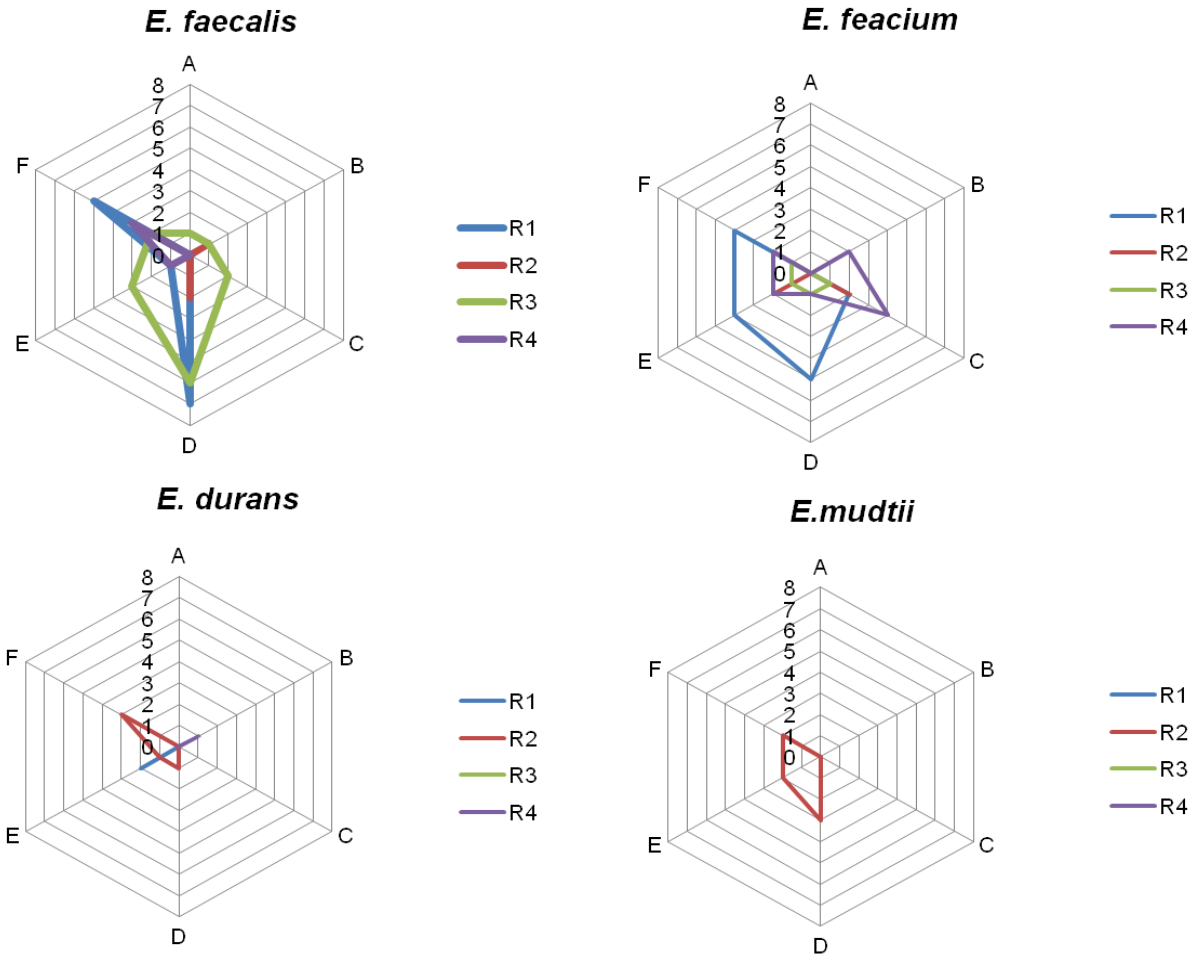


Figura 64: Distribuição por espécie dos 86 isolados de *Enterococcus* spp. longo dos 6 pontos e nas 4 recolhas efetuadas.

5 - Análise da variação das comunidades bacterianas no biofilme

Para o estudo das comunidades bacterianas no biofilme fez-se um PCR-DGGE que permitiu ter uma ideia do perfil de comunidades em cada local ao longo do curso do rio e como estas variavam ao longo do tempo (**fig. 65**).

As bandas assinaladas na **figura 65** foram excisadas e enviadas para sequenciação, por se repetirem em mais de uma amostra ou então por se mostrarem únicas.

Figura 65: DGGE *fingerprinting* das amostras de biofilme dos seis pontos em três recolhas. Os números indicam as bandas excisadas e sequenciadas.

A classificação RDP das bandas excisadas é observável na **tabela 21**. As bandas pertencem maioritariamente à classe Cyanobacteria, o que não é de estranhar dado estes microrganismos serem abundantes nos meios aquáticos de água-doce.

Tabela 20: Classificação RDP das bandas excisadas do gel DGGE.

Banda	Classe	% Confidência	Família	% Confidência	Género	% Confidência
1	Chloroplast	100	Chloroplast	100	Bacillariophyta	100
2	Cyanobacteria	94	I	40	GpI	40
3	Cyanobacteria	100	XIII	100	GpXIII	100
4	Clostridia	3	Thermoanaerobacteraceae	2	Desulfovirgula	2
5	Cyanobacteria	92	XIII	80	GpIII	80
6	"Nitrospira"	100	"Nitrospiraceae"	100	Nitrospira	100

.

Com o auxílio do *software* BioNumerics (Applied Maths), construiu-se o dendograma tendo em conta o índice de similaridade de Jaccard (**fig. 66**) e calcularam-se alguns índices de diversidade, uniformidade e abundância, tais como: índice de Pielou, Maragalef, Shanonn-Wiener e Simpson (**tabela 22**).

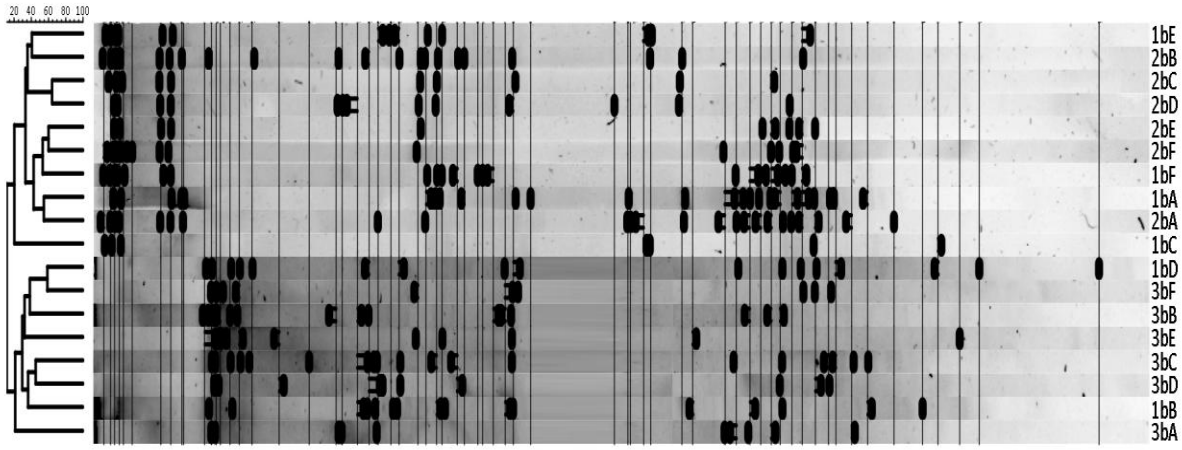


Figura 66: Dendograma obtido após PCR-DGGE das amostras de biofilme dos seis pontos em três recolhas por aplicação do índice de Jaccard.

Como se pode ver no dendograma, os perfis de bandas correspondentes às amostras da recolha 3 são bastante distintos das amostras das outras duas recolhas, com exceção das

amostras da recolha 1 nos pontos B e D (1bB e 1bD) que estão também mais relacionados com as mostras da recolha 3. Assumindo que cada banda representa uma unidade taxonómica operacional (OTU), o ponto A nas duas primeiras recolhas apresentam uma maior similaridade entre elas e maior número de OTUs relativamente à recolha 3. O ponto C na recolha 1 foi o que apresentou menor número de OTUs e menor similaridade com as outras amostras.

Tabela 21: Índices de diversidade, uniformidade e abundância param o *fingerprinting* obtido por PCR-DGGE

			Índices			
ID	**Data**	**Locais de amostragem**	**Shannon -Wiener**	**Simpson**	**Pielou**	**Margalef**
1bA	**16-06-2014**	**1- Ponte de Parada, Vieira do Minho**	1,3323	0,0533	0.9308	3,4182
1bB	**16-06-2014**	**2- Praia da Rola, Fafe**	1,1915	0,0687	0.9683	2,4451
1bC	**16-06-2014**	**3- Caldas das Taipas, Guimarães**	0,6647	0,2832	0.7865	0,9736
1bD	**16-06-2014**	**4- Azenha Velha, Riba D'Ave**	1,1994	0,0655	0.9748	2,6024
1bE	**16-06-2014**	**5- Parque urbano da Rabada, Santo Tirso**	1,0644	0,0953	0.9287	2,0057
1bF	**16-06-2014**	**6- Ponte da Lagoncinha, Lousado**	1,2505	0,0634	0.9457	3,0309
2bA	**01-09-2014**	**1- Ponte de Parada, Vieira do Minho**	1,3032	0,054	0.9442	3,4263
2bB	**01-09-2014**	**2- Praia da Rola, Fafe**	1,294	0,0577	0.9375	3,3718
2bC	**01-09-2014**	**3- Caldas das Taipas, Guimarães**	0,9182	0,1334	0.9182	1,4726
2bD	**01-09-2014**	**4- Azenha Velha, Riba D'Ave**	0,9426	0,1477	0.8462	1,8755
2bE	**01-09-2014**	**5- Parque urbano da Rabada, Santo Tirso**	0,9298	0,1324	0.9298	1,3782
2bF	**01-09-2014**	**6- Ponte da Lagoncinha, Lousado**	1,0714	0,0955	0.9348	1,9733
3bA	**18-11-2014**	**1- Ponte de Parada, Vieira do Minho**	0,9597	0,1168	0.9597	1,4763
3bB	**18-11-2014**	**2- Praia da Rola, Fafe**	1,1157	0,084	0.9486	2,0664
3bC	**18-11-2014**	**3- Caldas das Taipas, Guimarães**	1,182	0,0775	0.9244	2,7141
3bD	**18-11-2014**	**4- Azenha Velha, Riba D'Ave**	0,9497	0,1208	0.9497	1,4634
3bE	**18-11-2014**	**5- Parque urbano da Rabada, Santo Tirso**	0,9083	0,1391	0.8722	1,5649
3bF	**18-11-2014**	**6- Ponte da Lagoncinha, Lousado**	0,8918	0,1481	0.8918	1,4997

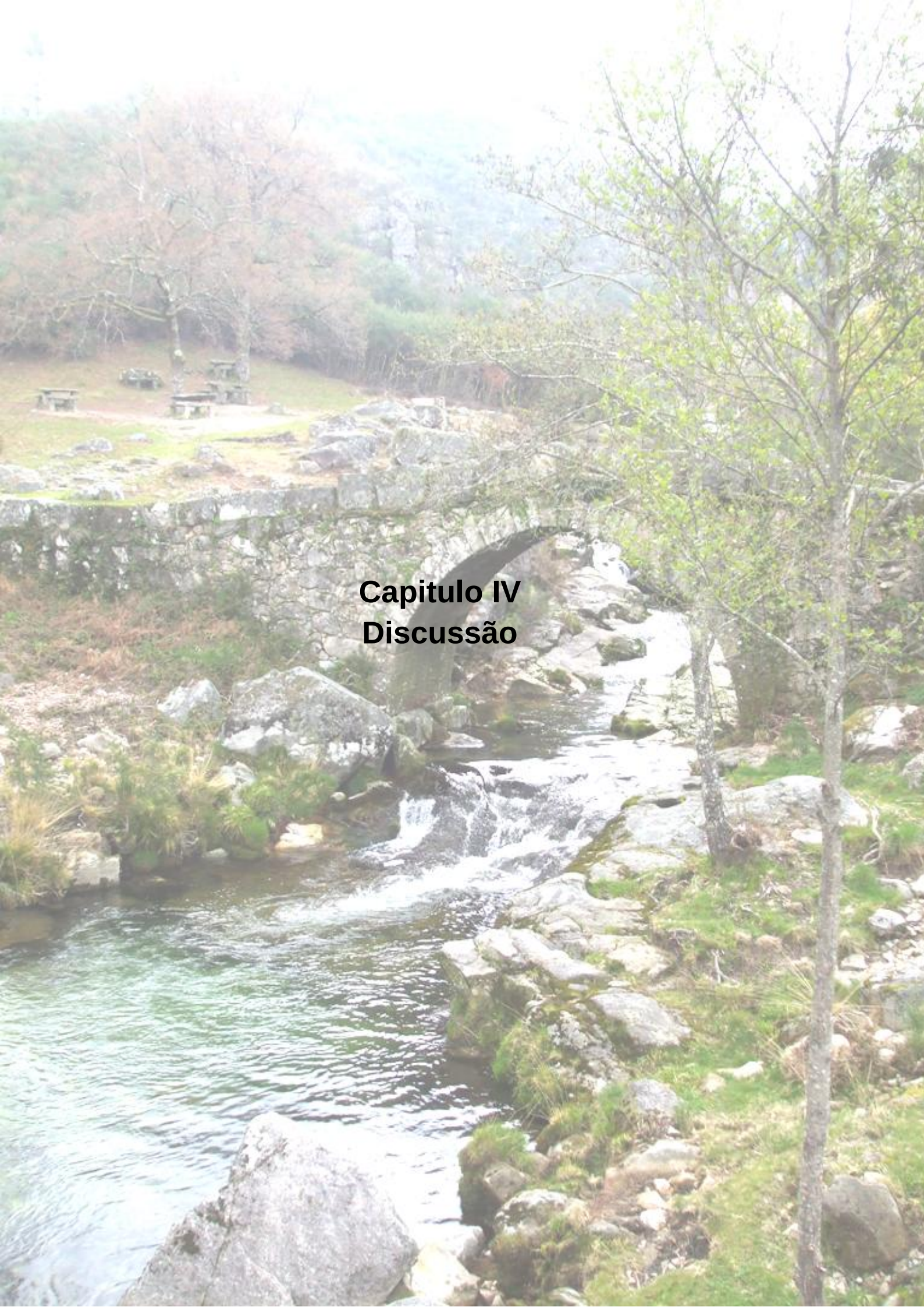
Os índices de Shannon-Wiener e Simpson são dois índices de diversidade que se interpretam de forma contrária, ou seja, o índice de Shannon quanto mais alto, maior a diversidade, enquanto o de Simpson varia entre 0 e 1, sendo que estuda a probabilidade de

que dois indivíduos escolhidos ao acaso serem membros do mesmo grupos, quanto mais perto de 0 for o valor do índice, maior a diversidade da comunidade em estudo.

Posto isto, o que se pode verificar (**tabela 21**), olhando para o índice de Shannon-Wiener, os valores mais elevados são 1.33 no biofilme do ponto A na recolha 1 e 1.30 no ponto A na recolha 2. Na recolha 3, o índice de diversidade no ponto A desce ligeiramente abaixo de 1. O valor mais baixo de diversidade é no ponto C na recolha 1 e 2, sendo que todos os outros estão bem mais próximos de 1 ou ligeiramente acima de 1. Na recolha 3, as comunidades bacterianas do biofilme do ponto C apresentam a maior diversidade segundo o índice de Shannon. No caso do índice de Simpson, sendo este índice mais sensível a variações ao longo do tempo (Ravera, 2001), a indicação que dá acerca da diversidade é idêntica à de Shannon.

O índice de Pielou é um dos índices de uniformidade existentes, e que indica qual o nível de uniformidade de uma comunidade, sendo que quanto mais próximo de 1 se encontrar, maior a uniformidade de uma comunidade. O que se verificou, é que a menor uniformidade das comunidades foram calculados em 1bC, com 0.79, em 2bD, com 0.85, em 3bE, com 0.87, e em 3bF, com 0.89. Apesar de nenhum atingir o valor máximo, encontravam-se em todos os outros encontrava-se acima de 0.90.

O índice de Margalef é um dos índices de abundância de espécies, sendo que quanto mais elevado for, maior é a abundância de espécies na comunidade (Gamito, 2010). Assim sendo, este índice segue uma progressão muito idêntica ao de Shannon, sendo que os valores mais elevados na recolha 1 e 2 foram verificados no ponto A enquanto que na recolha 3 o valor mais elevado foi no ponto C, seguido pelo ponto B. O ponto C foi aquele que apresentou menor abundância de espécies nas recolhas 1 e 2, tal como também se verificou nos outros índices.



Capitulo IV
Discussão

Discussão

Para analisar o estado de um curso de água é importante ter em conta todos estes parâmetros que têm um papel importante na avaliação do ecossistema de uma massa de água.

O rio Ave tem sido ao longo dos anos alvo de vários tipos de incumprimentos em relação às diretivas impostas para a monitorização da qualidade da água (Costa, 2008).

Com as progressivas campanhas de sensibilização e de despoluição do rio Ave levadas a cabo por instituições como a TRATAVE, responsável pela tutela das ETARs do Vale do Ave (TRATAVE, 2013), a qualidade física e química da água foi melhorando, sendo que o principal problema atual do rio é a nível de contaminação microbiológica, como demonstrado nos nossos resultados, e da degradação das margens.

A qualidade de um curso de água deve ser inferida após avaliação dos vários tipos de parâmetros, sendo que se um deles caracterizar o rio com uma qualidade inferior aos outros, essa qualidade inferior prevalece sobre as outras (INAG, 2009). Os critérios usados para avaliar a qualidade da água do rio estão presentes em anexo.

4.1 – Qualidade do rio em termos físico-químicos

.

Verificando os parâmetros que se analisaram neste trabalho, de acordo com o INAG (INAG, 2009) para rios do Norte, parâmetros como pH, a taxa de Oxigénio, o Oxigénio Dissolvido, Amónia e Nitratos encontram-se dentro dos limites que condicionam o “bom estado ecológico”. Por sua vez, os níveis de fósforo e os nitritos foram os únicos parâmetros que se encontrou acima dos níveis máximos, fazendo desse modo descer a qualidade do rio para “razoável”, estando, em média, em todos os pontos amostrados durante um ano de análise acima dos 0.10 mg/L (**tab. 22 e 23 em Anexo II**).

Apesar de todos os parâmetros, à exceção do fósforo e nitritos, estarem dentro dos valores máximos recomendáveis, estes sofreram varias oscilações ao longo do tempo. Estas oscilações ao longo do tempo podem ter como explicação descargas pontuais que alteram momentaneamente a qualidade da água naquele ponto específico. Para o caso do fósforo, o facto de a média anual ser acima dos valores máximos recomendados têm como justificação descargas contínuas de efluentes industrias e urbanos, assim como outras descargas não identificadas, levando a que haja um constante *in put* de fósforo no curso de água, levando à perda da qualidade.

4.2 – Análise das comunidades de macroinvertebrados

Para discutir os dados que se obtiveram, é importante ter em mente a importância da hidromorfologia, o habitat, a qualidade da água e do sedimento e da disponibilidade de alimento (Marques *et al.*, 1999).

O ponto A, como mostram os resultados, foi o ponto que registou melhor qualidade da água, quer a nível da diversidade e uniformidade da comunidade quer a nível de diversidade de grupos tróficos. Este estado da comunidade pode ser explicado com recurso a características envolventes à massa de água estudada. Este ponto era aquele que se encontrava mais próximo da nascente, numa zona onde à volta há poucas povoações, possuindo um regime de rápidos pouco profundos, lentos profundos, algumas zonas de poças e de rápidos profundos, apesar de esta profundidade não ser muito acentuada neste local. Esta heterogeneidade de regimes de corrente favorece uma maior diversidade na comunidade de macroinvertebrados, aumentando a diversidade de grupos funcionais que lá se instalam (Al-Shami *et al.*, 2011).

No ponto B, verifica-se o início da degradação da comunidade de macroinvertebrados, com a perda de ordens de indicadores de boa qualidade, com uma diminuição da diversidade e uniformidade da comunidade. Este facto pode ser explicado por alterações que foram feitas no rio e nas margens, ao converter este local numa pequena praia fluvial, criando acesos e convertendo as margens. Esta alteração antrópica das margens, como a devastação do corredor ripário da margem direita substituindo-o por gravilha para permitir o acesso, pode explicar o impacto verificado na comunidade, uma vez que muitos dos invertebrados se alimentam de folhas caducas em decomposição, por exemplo, sendo importante a existência de uma canópia que permita as folhas caírem no leito do rio (Townsend *et al.*, 1997). Esta mudança levou à perda da barreira contra erosão da margem, que funcionava também como filtro à entrada de nutrientes para o curso do rio, permitindo a entrada de lixiviados e escorrimentos para o curso do rio (Callisto *et al.*, 2001). Em Maio de 2015, na última recolha, verificou-se um aumento exponencial no número de famílias e de indivíduos. Nesta data, verificou-se que a margem esquerda do local onde se realizavam as recolhas, tinha sido “limpa” de toda a vegetação, sendo que parte desta foi deixada ou nas margens, ou no rio. Este aumento de disponibilidade de matéria orgânica pode ser uma das explicações para este aumento.

A importância do tipo de sedimento e do impacto da alteração das margens foi bem visível no ponto C. Como foi descrito, este ponto apresentava um sedimento fino e lamacento, com um corredor ripário pobre e com infraestruturas a conter as margens direita

e esquerda. Apenas apresentava um regime de corrente, lento profundo, levando a uma diminuição da comunidade.

O ponto D, como já referido, apresentava uma qualidade de habitat boa e um corredor rico de árvores autóctones, sem infraestruturas nem intervenções nas margens, com sedimento arenoso, com zonas de vegetação aquática e zonas com juncos. Todos estes fatores eram favoráveis a que a comunidade deste local fosse abundante e com uma diversidade elevada, como descrito por Chung *et al.*(2012). Foram identificadas algumas famílias consideradas sensíveis à poluição, como *Ephemerellidae* e *Leptophlebidae*, levando a supor que estas famílias são mais condicionadas pela qualidade do habitat e dinâmicas das correntes, assim com a existência de *Corbicula* e Gastrópodes se deve à corrente forte e substrato diverso. O facto de a água apresentar uma cor acastanhada e odor, demonstra bem o papel importante das condições do habitat na manutenção de uma comunidade, como defendido por Suárez e colaboradores (2002). Em contrapartida, no ponto E a panorâmica das populações é diferente, sendo notória a intolerância de muitas ordens ou famílias de macroinvertebrados a alterações antropogénicas das margens e a locais com apenas um tipo de regime de corrente. Embora tenha sido reabilitada uma parte do corredor ripário, as margens tiveram de ser consolidadas com blocos de cimento para não haver deslizamentos e poderem suportar as infraestruturas criadas no âmbito do passeio pedonal. Devido a um sedimento lamacento e muito fino e com um regime de corrente de lento profundo, apenas foram identificados invertebrados bentónicos com capacidade de resistir a alterações das margens, sendo capazes de se fixar neste tipo de substrato, como Díptera, Amphipoda (*Gammaridae*) e Oligochaeta.

O ponto F voltou a ter um aumento na diversidade da comunidade, havendo uma justificação idêntica à referida para o ponto D, a heterogeneidade dos regimes de corrente existente, variação de sedimento e corredor ripário abundante. Em relação às alterações das margens, este ponto apresenta mais alterações que o ponto D. Tal como para o ponto D, foram identificadas algumas famílias descritas como sensíveis a poluição. Sendo o ponto F um dos pontos com baixa qualidade da água, a presença dessas famílias poderá indicar que elas talvez sejam mais tolerantes à perda da qualidade da água que à perda da qualidade do habitat e da diversidade hidromorfológica da corrente.

Tal como proposto por Bonada *et al.* (2007), fatores como a sazonalidade, têm um impacto grande na representação de macroinvertebrados ao longo do tempo. Uma vez que estas comunidades são essencialmente representadas por famílias de insetos, cuja sua fase aquática é apenas a larvar a fase adulta é aérea, e muitas vezes muito curta, na época em que estes atingem a fase adulta, a concentração de indivíduos que são identificados é menor, sendo que no outono, a relação entre mortalidade/eclosão e natalidade é menor,

sendo mais os que eclodem ou morrem que os que nascem, levando a uma diminuição de certas famílias de insetos que são considerados indicadores de boa qualidade. A explicação para as diferenças nas comunidades entre a primavera e o outono, em todos os pontos, pode ser encontrada nos relatos de Ravera (2001), que defende que a sazonalidade tem um impacto nas comunidades de macroinvertebrados, uma vez que grande parte deles são insetos, que têm um ciclo de vida em que apenas a fase larvar é aquática. Outro fator condicionante são as dinâmicas hidromorfológicas da corrente do rio, que pode ser alterado com o aumento dos efluentes integrados no rio, com o aumento da pluviosidade, ou com alterações feitas no leito do rio pelo homem. Outra explicação para as alterações entre a primavera e o outono, é a dinâmica hidromorfológica do rio (Azrina *et al.*, 2006), uma vez que no outono, a corrente era mais forte e ouve períodos de inundações das margens, o que alterou muitas variáveis, como os sólidos suspensos na água, a disponibilidade de matéria orgânica e a velocidade da corrente, fazendo que muitos indivíduos perdessem o seu substrato de fixação e se abrigassem em locais menos típicos de se fixar, onde não foram encontrados, não tendo sido contabilizados.

Têm sido feitos estudos para tentar perceber se os macroinvertebrados poderão ser bons indicadores da eutrofização de uma massa de água, não se tendo no entanto chegado a um consenso, pois os resultados desses estudos foram contraditórios. Smith *et al*. (2007) propõe um índice biótico de nutrientes, em que caracteriza espécies de macroinvertebrados com diferentes níveis de tolerância a nutrientes, como os nitratos e o fósforo, analisando a resposta da comunidade em diversos locais com concentrações diferentes destes nutrientes e atribuindo-lhes um valor de tolerância. Por sua vez Friberg *et al.* (2010) defende que não há uma resposta significativa para a concentração de nitratos, mas que a resposta negativa de uma comunidade a um meio eutrofizado, não se deve aos nutrientes, mas sim à consequente depleção de oxigénio, avaliada através da medição dos valores de CBO5 e verificando que os invertebrados bentónicos respondem diretamente ao aumento ou diminuição deste parâmetro, sendo que o aumento dos *Chironomidae* é diretamente proporcional ao aumento das concentrações de CBO5 e Tricópteros, como os *Serocostomatidae* e *Glossosomatidae*, diminuem com o aumento do CBO5. Segundo este autor, a espécie mais sensível a este parâmetro, e que pode ser usada para caracterização de locais de boa qualidade é a *Leuctra* sp., espécie de Plecópteros da família dos *Leuctricidae*. De facto, o único local nas três recolhas onde foram encontrados indivíduos da espécie *Leuctra* sp. foi no ponto A, onde os valores de CBO5 eram efetivamente os mais baixos entre os pontos analisados, assim como *Sericostomatidae* também só foram identificados no ponto A. Apesar disso, os *Chironomidae* não seguem essa relação com os valores de CBO5, como proposto. Apesar de contestado, o índice biótico de nutrientes

proposto por Smith (2007) tem sido usado noutros trabalhos como um meio de utilização de macroinvertebrados como indicadores de eutrofização da água (Paisley *et al.*, 2011).

A espécie invasora de amêijoa asiática, *Corbicula fulminata*, foi identificada neste nosso estudo. Não há relatos da presença de *Corbicula fulminata* no rio Ave desde 2011 (Gabriel, 2011). Esta espécie tem tido recentemente uma expansão global e rápida, uma vez que tem vantagens no seu ciclo de vida em relação a muitos dos bivalves autóctones, como o facto de a sua oogénese ser contínua e a espermatogénese episódica, sendo estimulada quer com o aumento da temperatura na primavera quer com o decréscimo da temperatura no outono, o que lhe confere uma grande vantagem reprodutiva, além disso tem também uma grande capacidade de tolerância a diversas variáveis ambientais e capacidade de baixar a sua velocidade metabólica quando há falta de alimento. Por não ter capacidade de se fixar, esta vive no sedimento, habitando em zonas com lodo areia e cascalho, podendo emergir quando há um aumento do alimento. Neste estudo, esta amêijoa foi detetada em todas as recolhas no ponto D, sendo que no outono foi também detetada nos pontos C, D, E e F, mas apenas na ordem dos 2 a 3 indivíduos. Na última recolha, Maio de 2015, foram identificados 120 indivíduos. Todos estes locais possuem zonas com lodo e sedimento fino, o que proporciona então um habitat ótimo para a *Corbicula fulminata*.

Outra espécie invasora encontrada foi o lagostim vermelho, *Procambarus clarkii.* Esta espécie, também conhecida como lagostim do Louisiana, é uma espécie originária do continente Americano que tem vindo a aparecer um pouco por todo o mundo. A vantagem desta espécie sobre as autóctones é o seu regime alimentar omnívoro, que apesar de ser maioritariamente centrado em macrófitas, também se alimenta de larvas de Tricópteros e *Chironomidae* (Correia *et al.*, 2005). Para além de se alimentar de alguns macroinvertebrados, também favorece espécies de macrófitas invasoras sobre as autóctones, alimentando-se preferencialmente das autóctones. Apesar de terem sido identificados poucos indivíduos, em Maio de 2015 (recolha 5) no ponto B (n = 3) e no ponto D (n = 3), e em Novembro de 2014 (recolha 3) no ponto D (n = 1) e no ponto E (n = 1), não deixa de ser uma razão para monitorizar a população destes invasores, sendo que, tanto o *Procambrus clarkii* como a *Corbicula fulminata*, têm um impacto na dinâmica de todo o ecossistema, alterando comunidades de macroinvertebrados que podem alterar comunidades de peixes.

4.3 – Qualidade do rio em termos microbiológicos

Para avaliar a qualidade da água com base nos indicadores microbiológicos, usou-se como referência os valores máximos admissíveis para água doce superficial destinada à produção para consumo, para rega, utilização balnear e exploração aquícola, estipulados no

Decreto Lei nº 236/98 de 1998, ainda em vigor. Os resultados da análise dos indicadores de contaminação fecal obtidos neste estudo, onde estes registam um aumento progressivo ao longo do curso do rio, ajudam a explicar e talvez justificar um dos motivos pelos quais atualmente não há nenhuma captação de água para produção de água de consumo a partir do rio Ave, como em tempos aconteceu. Este decreto de lei estipula os limites máximos aceitáveis de coliformes fecais e estreptococos fecais (termo recentemente substituído por enterecocos intestinais), e recomenda tipos de tratamento aconselhados para reabilitar estas águas para o consumo humano.

Os valores máximos aceitáveis de estreptococos fecais (*Enterococcus* spp.) e coliformes fecais para a água ser considerada de boa qualidade, que apenas deva ser sujeita a filtração, são de 20 CFU/100 mL (**tabelas no Anexo II**). Para os dois indicadores de contaminação fecal, *E. coli* e *Enterococcus* spp., quantificados e analisando os CFUs que foram contabilizados, verificou-se que apenas o ponto A tinha uma qualidade de água boa, com valores dentro dos aceitáveis, assim como o ponto B, que implicava apenas um tratamento de físico e de desinfeção. Em todos os outros pontos a qualidade foi muito inferior, uma vez que os valores encontrados estão muito acima dos aceitáveis acima referidos para consumo humano. A água desses pontos para estar própria para consumo humano precisará de um tratamento mais complexo, como tratamento físico, químico e desinfeção, principalmente nos pontos D, E F. Para a utilização desta água para irrigação de campos agrícolas, os limites máximos aceitáveis são de 100 CFU/100 mL, sendo que mais uma vez, os pontos C, D, E F se verificaram impróprios para este tipo de utilização.

4.3.1 – Variação dos microrganismos totais na coluna de água e no biofilme do rio Ave

Analisando os valores de CFUs de microrganismos totais, os mais elevados foram nos pontos D, E F, quer na coluna de água quer no biofilme. Seria de esperar que no biofilme os valores de microrganismos totais fossem superiores aos encontrados na coluna de água, o que de facto se verificou como demonstrado pelos resultados obtidos. Pode-se também concluir que a variação dos CFUs dos microrganismos totais ao longo do tempo não seguiu, como esperado, um padrão sazonal, uma vez que a pluviosidade (e estação outonal) não levou a um aumento dos CFUs contabilizados.

Os microrganismos têm um papel extremamente importante no ecossistema aquático, enquanto produtores primários e portanto o maior ou menor número desses microrganismos pode revelar algumas características desse mesmo ecossistema. Quando maior o número de microrganismos totais, maior será a degradação da matéria orgânica que por sua vez faz diminuir a concentração do oxigénio dissolvido e aumentar os designados

nutrientes limitantes, levando a uma eutrofização das massas de água (Canosa & Pinilla, 1999) assim como ao aumento do CBO_5, alterações essas que têm também um impacto nas comunidades de macroinvertebrados.

No caso dos rios, devido a uma constante renovação da água, a eutrofização poderia ser mais dificilmente alcançada, no entanto, é já uma realidade em muitos rios, principalmente nos países mais industrializados e urbanizados, onde o *in put* de matéria orgânica no meio aquático é grande (Muhid *et al.*, 2013). Esta eutrofização diminui a qualidade de água e altera as comunidades que constituem os ecossistemas, quer a nível de fauna como de flora.

4.3.2 – CFUs por meio de cultura e células por FISH de indicadores de contaminação fecal

No que diz respeito à deteção e quantificação de *E. coli*, os números (CFU/100 mL) contabilizados revelam um aumento da contaminação fecal ao longo do troço do rio, que pode ter várias origens, como entradas de efluentes não tratados, efluentes agrícolas ou de ETARs (Martins, 2014). Este incremento da contaminação não é inesperado, uma vez que a densidade populacional circundante aumenta conforme se progride no rio, assim como a atividade agrícola dá lugar à atividade industrial. Este tipo de progressão é bem visível ao comparar os resultados obtidos nos três primeiros pontos de amostragem.

O ponto A apresenta valores de *E. coli* (CFU/100 mL) em todas as recolhas muito baixos, sendo que o maior número registado foi na recolha 2, com 9 CFU/100 mL. Este ponto, com base nestes resultados, pode ser considerado um ponto de referência, pristino, em que não há contaminação de tipo fecal, como seria de esperar. Conforme se vai afastando da nascente, esta realidade começa a mudar. O ponto B está situado após duas barragens que desviam parte do curso do rio para algumas mini-hídricas e moinhos, sendo portanto o primeiro ponto a ter uma interferência antropogénica considerável. Apesar de continuarem a ser contabilizados valores baixos de CFUs neste ponto, na recolha 4 estes valores atingem os 109 CFU/100 mL, o que demonstra que se inicia a deterioração da qualidade da água. O ponto C pode ser visto como um ponto de viragem, pois é o ponto onde a contaminação por *E. coli* se faz sentir consideravelmente, sendo que se situa já no concelho de Guimarães, onde a densidade populacional é elevada e é nas suas redondezas que surgem as primeiras indústrias têxteis da região.

Ratajczak e colaboradores (2010) demonstra que a variação da contaminação por *E. coli* tem uma relação intima com as variações hidrológicas de uma massa de água, como as chuvas e a entrada de lixiviados e arrastos do meio circundante desse mesmo curso de água. Tal relação não se verificou na análise dos nossos resultados. O pico de pluviosidade

durante o período de tempo estudado aconteceu antes da recolha 3, no mês de Novembro de 2014, no entanto o pico de contaminação por *E. coli* não se verificou nessa recolha; uma relação dependente também não se verificou aquando do pico mais seco (na recolha 2, Junho de 2014). No ponto C, o pico de contaminação verificou-se na segunda recolha, com um tempo seco. Este pico de contaminação pode apenas ser explicado por uma descarga esporádica que possa ter acontecido nessa data.

Se o ponto C é considerado o ponto de viragem, o ponto D poderá ser considerado um "ponto problema", entre outras razões, devido ao acentuado aumento de contaminação por *E. coli* notado neste ponto em relação ao ponto anterior, o ponto C, ao longo das recolhas. Este é o único ponto cuja progressão pode ser explicada pelas variações hidrológicas, pois o pico de contaminação verificou-se na recolha 3, correspondente ao pico de pluviosidade. Este ponto tem na envolvência uma grande densidade populacional e um grande foco industrial.

O ponto E situa-se após a entrada de um dos efluentes mais problemáticos do rio Ave, visto que tem as suas margens alteradas devido à presença de fábricas têxteis, o rio Vizela. Isso pode explicar alguns picos de contaminação que nada têm a ver com a progressão hidrológica

O ponto F, não seguindo também uma relação hidrológica, tem um aumento de contaminação ao longo das 5 recolhas, não numa progressão linear, mas com um aumento brusco da recolha 2 para a 3, a partir da qual e até à recolha 5 o aumento é progressivo mas pouco acentuado.

Em síntese, o perfil de contaminação por *E. coli* nos pontos C, E e F, pode ser explicado pelo crescente aumento da industrialização, alteração das margens, existência de explorações agrícolas e pecuárias, ETARs e centros hospitalares nas redondezas, que levam a um aumento dos efluentes do rio na envolvência destes pontos.

Outro indicador de contaminação fecal estudado foi os *Enterococcus* spp.. Os *Enterococcus* spp. (comensais da flora intestinal de humanos e animais) constituem outro indicador de contaminação fecal que tendencialmente segue a variação da *E. coli* (Larsen et al., 2012).

Porém, os resultados obtidos neste estudo mostram uma progressão diferente destes dois tipos de indicadores fecais. De facto, os valores de *E. coli* foram quase sempre superiores, o que em parte poderá reforçar a ideia defendida (Larsen *et al.,* 2012) da predominância de *E. coli*, sobre os *Enterococcus* spp. na flora gastrointestinal. Enquanto para a *E. coli*, a progressão no ponto D podia ser explicada com o perfil da pluviosidade, nos *Enterococcus* spp. tal não se verificou em nenhum ponto, levando a sugerir que as *E. coli* são mais influenciadas pela pluviosidade que os *Enterococcus* spp..

Tal como para a *E. coli*, o ponto C pode ser considerado o ponto de viragem, a partir do qual há um aumento mais pronunciado do número de *Enterococcus* spp. e o ponto D o ponto problema, sendo que a explicação para o variação dos enterecocos nos restantes pontos é a mesma que no caso da *E. coli*.

Comparando as contagens de CFUs obtidas na coluna de água com as do biofilme, em primeiro lugar salta à vista que as do biofilme são geralmente bastante superiores em relação às da coluna de água, o que está de acordo com o reportado noutros estudos (Akiyama & Savin, 2010). Em segundo lugar, nota-se que, ao contrário do que aconteceu na coluna de água, foram detetados mais *Enterococcus* spp. no biofilme que *E. coli*, o que pode ser explicável pela grande mobilidade das *E. coli* e da mobilidade reduzida ou mesmo nula características das espécies de *Enterococcus* spp., que por essa razão se depositam no sedimento e integram o biofilme formado na superfície das rochas.

A utilização dos meios suplementados, não pode ser feita com o objetivo linear de contabilizar o número de CFUs de isolados resistentes ao respetivo antibiótico que foi suplementado ao meio de cultura, podendo apenas dar uma ideia da presença de isolados resistentes numa determinada amostra, que terão de ser testados para confirmação da presença da resistência através do teste de difusão por disco. Precisamente verificou-se que nem todos os isolados recolhidos dos meios suplementados demonstraram ser efetivamente resistentes ao antibiótico correspondente ao suplementado no meio de onde foram retirados. Os meios suplementados são, no entanto, importantes e úteis para selecionar isolados com resistências a antibióticos relevantes. Tal como neste trabalho, vários outros investigadores (Mesa et al., 2006) também têm utilizado meios suplementados com CTX para isolar *E. coli* produtora de ESBL. Tendo sido, tal como nós, bem-sucedidos, pois neste nosso trabalho a maior parte dos isolados recolhidos de TBX+CTX revelaram ser *E. coli* produtoras de ESBL. Por sua vez, para isolar *Enterococcus* spp. resistentes à vancomicina, é recomendável usar SB suplementado com este mesmo antibiótico (Novais *et al*., 2005), sendo de facto bastante seletivo como confirmaram os nossos resultados. Obviamente há limitações, e por vezes encontram-se falsos positivos, o que pode ser justificado por vários fatores como componentes químicos que se encontram na amostra, a água do rio, que podem degradar componentes do meio, nomeadamente o antibiótico que a este foi suplementado, o facto de amostra ser complexa e de os meios, apesar de seletivos, não impedem o crescimento de outros géneros de bactérias, podendo algumas delas ser intrinsecamente resistentes a esses antibióticos e degradar esse mesmo antibiótico permitindo às sensíveis crescer. Este fenómeno foi observado para TBX+IMP, em que pelas contagens haveriam centenas de isolados de *E. coli* por 100 mL nos pontos C, D, E e F, mas quando se procedeu à identificação bioquímica alguns não eram *E. coli* ou se eram, não tinham resistência ao IMP,

sendo que apenas 3 retiradas se verificaram ser efetivamente resistentes ao IMP ou com resistência intermédia.

No biofilme, ao comparar as contagens de *E. coli* feitas pela técnica de FISH com as contagens de CFUs totais por meio de culturas no biofilme, o que sobressai é que os valores obtidos nas primeiras são relativamente superiores. O ponto D é de facto aquele que apresenta maior contaminação, mostrando os valores mais elevados de CFU/mL de todas as recolhas e em relação a todos os restantes pontos; os valores de Cel/mL também foram dos mais elevados neste ponto. Mais foi no ponto F, na recolha 1, onde se obteve o valor de Cel/mL mais elevado de toda esta análise (2.9×10^{6}). No caso dos *Enterococcus* spp., se se fizer a mesma comparação, verifica-se que as contagens por FISH (e que enumeram independentemente apenas duas espécies, *E. faecalis* e *E. faecium*) são bem mais elevadas, na ordem de 10^{6} células por mL enquanto que em cultura os CFU/mL estão na ordem d 10^{4}. Apesar disso, as contagens mais elevadas obtidas em ambos os métodos foram encontradas no ponto F; o valor mais elevado de células de *E. faecium*/mL foi obtido na recolha 1 e de CFU/mL de *Enterococcus* spp. na recolha 2. Curiosamente, no ponto F e na recolha 1, em que foram detetadas 1.22×10^{6} Cel/mL de *E. faecium*, pelo método de cultura só foram quantificados 5.00×10^{1} CFU/100mL de *Enterococcus* spp.. Genericamente, as contagens por FISH foram muito mais elevadas que as contagens em meio de cultura, nos locais onde não foram contabilizados CFUs, foram detetados quase sempre *E. faecalis* ou *E. faecium* por FISH. No entanto, é interessante constatar que onde não foram detetados nem *E. faecalis* nem *E. faecium* por FISH foram contabilizados enterococos em meio de cultura, como aconteceu no ponto A, o que pode sugerir que as espécies de *Enterococcus* lá presentes não eram nem *E. faecalis* nem *E. faecium*. Estes resultados também põem em evidência que protocolos de FISH além de mais rápidos também permitem ultrapassar algumas desvantagens dos métodos de cultura, uma vez que permitem uma análise quantitativa específica e não são influenciados pela presença de compostos inibitórios. O facto do método molecular permitir quantificar as células viáveis mas não cultiváveis, pode explicar a razão pelo qual os valores obtidos por FISH foram bastante superiores aos obtidos pelo método de cultura.

4.3.3 – Perfil de resistências a antibióticos e caracterização genética do filogrupo de *E.coli* e identificação das espécies de *Enterococcus*

A emergência e disseminação da resistência antimicrobiana é atualmente um problema global e extensível a praticamente todas as bactérias, representando uma séria ameaça para a saúde pública. As bactérias resistentes encontradas nos ecossistemas aquáticos têm muitas vezes origens em efluentes de estações de tratamento, não por falhas

no tratamento dos efluentes industriais, urbanos e hospitalares que entram nos tanques das ETARs, mas pela sua incapacidade de eliminar eficazmente todas as bactérias pelos processos normais de desinfeção, muitas das que persistem carregam resistências aos antibióticos que depois disseminam e transferem a outras bactérias (Guo *et al.*, 2013). As ETARs também não têm capacidade de eliminar os antibióticos, que assim são lançados no rio e aí constituem uma pressão seletiva sobre a comunidade bacteriana.

Os indicadores de contaminação fecal, *Enterococcus* spp. e *E. coli*, têm uma grande capacidade de adquirir resistências, sendo que estirpes resistentes desses dois indicadores microbiológicos são amplamente encontradas nos cursos de água superficiais (Łuczkiewicz et al., 2010). Sendo bactérias entéricas, típicas da flora gastrointestinal humana e animal, não são naturalmente patogénicas, mas tem vindo a verificar uma crescente incidência de infeções hospitalares causadas por estes agentes e portanto começam a revelar-se peptógenos oportunistas (Wisplinghoff *et al*., 2004) e que levam a uma preocupação acrescida devido às resistências que possam carregar

Foram detetados isolados com resistências relevantes e isolados multirresistentes (MDR) tanto para *E. coli* como *Enterococcus* spp., tanto na coluna de água como no biofilme. Os isolados resistentes encontrados no biofilme constituem uma preocupação adicional, pois demonstram que esse biofilme pode ser um reservatório de resistências; as bactérias resistentes aos antibióticos estão aí "protegidas" até serem deslocadas ou por enxurradas ou por qualquer motivo que revolva o sedimento. Assim sendo, estes isolados estão em contacto com todo e qualquer efluente que entre no rio. Aí no rio, estas bactérias podem portanto adquirir e/ou transferir resistências como forma de sobrevivência às condições envolventes e aos poluentes que existem na água. Essa transferência horizontal de genes de resistência é um fenómeno comum nas bactérias (da Costa *et al*., 2013). Por esta razão, a análise dos isolados do biofilme do rio é importante.

O facto de se terem encontrado isolados com resistências a antibióticos que são usados como último recurso a nível clínico, assim como grande heterogeneidade de perfis de MDR, tanto para *Enterococcus* spp. como para *E. coli,* a abundância e incidência destes isolados é muito relevante para perceber quais os locais mais críticos do rio que representam um risco para a saúde pública.

Para as *E. coli*, o conjunto de resistências AMP TE SXT e C é já relativamente comum, devido a um uso alargado destes antibióticos no tratamento de infeções hospitalares.

Quanto à distribuição das resistências nos pontos analisados para *E. coli*, os pontos D, E e F são os pontos onde houve maior incidência de MDR. Pode-se considerar o ponto D um ponto problema, não por ter mais isolados com maior número de resistências, pois esse

seria o ponto F, mas por apresentar os perfis de resistência mais relevantes. Segundo Czekalski e colaboradores (2012) as ETARs podem ser uma das principais fontes de introdução de bactérias multirresistentes no meio aquático que recebe os esses efluentes tratados, uma vez que é nos tanques de tratamento das ETARs, com a junção de efluentes hospitalares, industriais e urbanos que estas bactérias vão adquirir as resistências, não só por estar estarem em contacto com antibióticos (que estão presentes nesse meio), mas também por estarem muito próximas o que propicia a transferência horizontal dos genes de resistência. Este facto poderá explicar a incidência dos isolados multirresistentes nestes pontos (D, E e F), que estão nas imediações das principais ETARs do Vale do Ave.

Em 2010, já tinha sido encontrado um isolado de *E. coli* resistente ao IMP no rio Ave, no ponto E, pelo nosso grupo de trabalho (Poirel *et al*., 2012). Agora, em Fevereiro de 2015, voltou-se a isolar mais duas *E. coli* resistentes e outras duas com resistência intermédia a este antibiótico, mas não no mesmo ponto, mas sim mais a montante deste ponto, no designado ponto D. De entre esses dois isolados resistentes ao imipenem, um pertencia ao filogrupo A (o qual tipicamente engloba estirpes comensais), o outro pertencia ao filogrupo E, que segundo Clermont e colaboradores (2013), é filogeneticamente próxima de filogrupos virulentos e potencialmente patogénicos, como o B2 e D. No que diz respeito aos filogrupos, Figueira e colaboradores (2011) relata que estirpes multirresistentes pertencentes aos filogrupos A e B1 são comuns nos ecossistemas aquáticos, premissa que é reiterada com os dados que se obteve neste trabalho. Defende também que estirpes de filogrupos patogénicos, como B2 e D, não são comummente encontradas em meio aquático, apesar do que, ao comparar os efluentes que entram na ETARs com os que saem para o curso de água, o que se verifica é que nos últimos prevalecem estirpes desses filogrupos em detrimento dos comensais, pois estes são mais facilmente eliminados pelos processos de desinfeção dos efluentes que saem das ETARs que os B2 ou D, que sendo patogénicos têm características que lhes permitem persistirem face a ambientes ou condições desfavoráveis. Este facto pode explicar o porquê de serem encontrados estes filogrupos nestes três pontos, embora em número pequeno.

No caso dos *Enterococcus* spp., as duas espécies predominantemente identificadas por PCR, foram *E. faecalis* e *E. faecium*, e que normalmente também são reportados como os mais comuns de se encontrar em casos de contaminação fecal de águas superficiais. No estudo de Rathnayake *et al*. (2011), verificaram que a resistência à gentamicina era mais frequentemente associada a *E. faecalis* e resistência à ciprofloxacina a *E. faecium*, algo que também se notou nos nossos resultados. Noutro estudo (Macedo *et al.*, 2011) verificaram que as resistências à ciprofloxacina, eritromicina e tetraciclina eram frequentemente encontradas em simultâneo, o que mais uma vez se justifica pelo facto destes antibióticos

serem muito usados quer na medicina humana quer na veterinária. A resistência simultânea à CIP, E e TE também constitui um perfil de resistências bastante comum entre os isolados de *Enterococcus* spp. estudados no nosso trabalho. No caso dos isolados resistentes à vancomicina, uma grande parte deles era *E. faecalis*. Apesar de nem todos os resistentes a vancomicina serem MDR, os que apresentam resistência a este antibiótico, na maioria dos casos também apresentaram resistência a teicoplanina, dois antibióticos usados no tratamento de infeções hospitalares causadas por *Enterococcus*. A resistência simultânea à vancomicina e a teicoplanina indicia que serão *Enterococcus vanA*. Essa confirmação terá no entanto de ser feita por via molecular, algo que futuramente se poderá fazer.

Tendo em conta os perfis de resistências obtidos e a incidência de resistências a antibióticos de uso exclusivo clínico, impeliu-nos a procurar saber junto dos hospitais daquela região), se teriam tido naquela altura (mas em datas anteriores às respetivas recolhas) casos de infeções por estes géneros de bactérias com perfis de resistência semelhantes. Segundo foi dado a entender pelos hospitais contactados, na altura da recolha 4, não houve nenhum caso de infeção por *E. coli* resistente aos carbapenemos, e sublinharam que *Enterococcus* spp. resistentes à vancomicina têm sido raramente detetados na zona do médio Ave, a zona envolvente aos pontos mais críticos. Sendo que no caso do hospital de Vila Nova de Famalicão foram apenas detetados três casos de infeções por *Enterococcus* resistentes a vancomicina no ano de 2014, e um detetado em Maio de 2015 e cerca de 30 casos de infeções por *E. coli* produtoras de ESBL no ano de 2014 e até Maio de 2015 já tinham sido detetados cerca de 18 infeções por este agente infecioso (dados não apresentados).

Watkinson e colaboradores (2007) demonstraram a incapacidade das ETARs de remover completamente os antibióticos dos efluentes tratados que são descarregados para os cursos de água, sendo que são detetadas concentrações muito baixas de antibióticos no ecossistema aquático, na ordem das ng/L, mas que o permanente contacto das bactérias desse meio com essas baixas concentrações de antibiótico, sendo que não é suficiente para as destruir, favorecer o desenvolvimento de resistência por parte das bactérias. Esta pode ser uma das hipóteses para a existência destas estirpes no ecossistema aquático, sendo que a outra hipótese seria a da existência de um químico que mimetizasse o impacto da antibiótico nas bactérias, levando-as a desenvolver resistências a esses antibióticos.

4.4 – Dinâmica de populações microbianas no biofilme

As comunidades de bactérias em água doce são substancialmente diferentes entre a coluna de água e o biofilme (Beier *et al*., 2008). No caso do biofilme, as comunidades

bacteriológicas que o constituem são a chave basal a nível trófico do um ecossistema aquático, podendo ser indicadores de impactos no ecossistema (Lear *et al.*, 2008). Segundo os resultados obtidos por PCR-DGGE, verificou-se que havia uma similaridade das comunidades bacterianas entre os mesmos pontos na recolha 1 e 2, sendo que formavam um *cluster* de similaridade à parte, disto das outras duas. Este facto poderá ter uma explicação na sazonalidade, uma vez que a recolha 3, no mês de Novembro de 2014, coincidiu com a altura do pico de pluviosidade, seguindo a variação temporal cíclica sugerida por Lear *et al.* (2008), em que o aumento consequente do caudal do rio e da velocidade da corrente, faz com que a sedimento já revolvido ressuspendendo o sedimento e alterando a composição das comunidades microbianas prevalentes no biofilme. Através da análise dos índices que avaliam a diversidade das comunidades, o que se verificou foi que os pontos com menor diversidade nas comunidades bacterianas pertenciam às recolhas 2 e 3 e eram essencialmente os pontos D, E e F. Este facto pode ser explicado pelas grandes alterações a nível de disponibilidade de oxigénio e de nutrientes destes 3 pontos, assim como oscilações de temperatura, uma vez que a temperatura foi de cerca de 22 °C e desceu na recolha 3 para valores entre os 13 e os 14°C, sendo que, com a diminuição da temperatura, o metabolismo das bactérias diminui e há uma diminuição de muitas famílias que são menos termotolerantes (Araya *et al*., 2003). Das 6 bandas excisadas, que se repetiam em mais do que um ponto, 3 delas correspondiam a cianobactérias, o que seriam de esperar uma vez que as cianobactérias são uma das famílias bacterianas mais abundantes em cursos de água doce, e como o nível de nutrientes é superior no sedimento que na coluna de água, seria de esperar de as encontrar bem representadas no biofilme (Lyautey *et al*., 2005).

4.5 – Relação das populações de macroinvertebrados e microbiológicas

Uma vez que os macroinvertebrados apresentam uma grande tipologia alimentar, apresentando diferentes estratégias para a captação de alimento, será provável que a proporção das populações microbianas determine a distribuição das tipologias alimentares dos macroinvertebrados.

Vários estudos têm sido feitos no que toca à relação entre bactérioplancton e invertebrados filtradores marinhos, tendo-se concluído que, enquanto algumas bactérias servem de alimento para os invertebrados, outras encontram-se no interior dos seus tecidos sem terem sido digeridas, encontrando-se viáveis e proliferando no interior do hospedeiro, criando uma espécie de simbiose (Licciano *et al.*, 2007; Stabili *et al.*, 2006; Schöttner *et al.*, 2013). No caso da água doce, estudos foram feitos com detritívoros, relacionando-os com microrganismos para ver se estes de facto representavam uma fonte de alimento para estes

invertebrados (Kim *et al.*, 2008; Baker & Bradnam, 1976), concluindo-se que de facto podem ser.

Para tentar perceber se haverá uma relação direta e visível entre indicadores de contaminação fecal e grupos alimentares, selecionaram-se aqueles que se alimentam de partículas finas, essencialmente raspadores, que se alimentam do sedimento e do biofilme, e coletores, que se alimentam de partículas finas em suspensão. Os grupos funcionais que se selecionaram foram; os retalhadores detritívoros (SD), coletores filtradores (CF), coletores detritívoros (CS), raspadores minerais (RM), raspadores orgânicos (RO) e limnívoros (L). Sendo que se assume que para estes grupos funcionais as bactérias representam um fonte de alimento, apesar de que para detritívoros não se trata da sua fonte de alimento principal, incorporando-as por estas se encontrarem no sedimento, assim como para os raspadores minerais (Baker & Bradnam, 1976), o que se pretende analisar de facto é se há na realidade uma relação direta entre a presença de indicadores de contaminação fecal e algum deste grupos funcionais (**figuras 69, 70 e 71 no Anexo I**).

No geral, apenas nos pontos A, B e C se pode verificar a predominância de um dos grupos funcionais, representando metade ou mais de metade de uma população. No ponto A, são os raspadores orgânicos (RO) que são mais abundantes, assim como famílias sensíveis à poluição de Ephemeropteras, como *Habrophledidae*, e famílias da ordem dos Heteróptera, que foram encontrados essencialmente neste ponto (Jesus, 2001). Foi na primavera que houve maior incidência de RO tendo um total de 72% na primeira recolha de primavera e 52% na segunda recolha de primavera, diminuindo para valores de 6% no outono. Sendo os raspadores orgânicos indivíduos que se alimentam de sedimento e são típicos de locais pouco profundos, com corrente pouco forte e implica uma retenção da matéria orgânica no sedimento (Gamito *et al*., 2009), com o aumento da corrente no outono, devido a chuvas mais intensas, a matéria orgânica pode ter sido ressuspendida, levando a uma diminuição dos raspadores orgânicos e um consequente aumento dos coletores filtradores. Neste ponto, a incidência destes grupos funcionais não tem a ver com contaminação, uma vez que esta não é registada, apesar de que, para *Enterococcus* no biofilme há um decréscimo acentuado da primavera para o Outono. Se se olhar para a variação dos microrganismos totais, este tem uma dinâmica idêntica à progressão dos RO. No ponto B, o grupo funcional dominante é o dos coletores filtradores, primavera e no outono com uma incidência acima dos 60% descendo para 30% na última recolha. Sendo estes indivíduos típicos de locais com correntes e pouco profundas, é normal serem encontrados neste local, em que há uma grande heterogeneidade de regimes de corrente (Chung *et al*., 2012). Na última recolha, este decréscimo deve-se a um aumento de coletores detritívoros e raspadores orgânicos. Esta variação na última recolha pode ter diferentes

explicações, como já referido, a limpeza que foi feita sobre as margens do rio deixou muitos detritos de vegetação dentro da corrente, levando a um aumento da matéria orgânica disponível, levando a um aumento de detritívoros. Esta diminuição progressiva de coletores filtradores não acompanha a dinâmica da contaminação e progressão de microrganismos ao longo do tempo neste ponto. O decréscimo de 6% de coletores filtradores da primeira recolha de primavera para a de outono, não segue o aumento da contaminação, quer por microrganismos totais quer pelos indicadores de contaminação fecal. No ponto C, o grupo funcional alimentar mais abundante é também o dos coletores filtradores. Tal não seria de prever, uma vez que é uma zona de lentos profundos, mas o que se verifica é que esta dominância só é verificada na recolha de Outono, em que a corrente era mais forte, apesar de não se poder designar de rápido, voltando a diminuir na última primavera, onde a corrente diminuiu de velocidade. Esta incidência deve-se ao elevado número de *Chironomidae* identificados neste ponto, em relação ao total da comunidade encontrada, principalmente *Chironomini*. Não podendo afirmar que este aumento se deveu a um aumento da contaminação, pode-se constatar que de facto, na coluna de água, donde se alimentam os coletores filtradores (Chung *et al*., 2012), houve um aumento tanto de microrganismos totais como de indicadores de contaminação fecal. A partir do ponto D, a dinâmica de dominância dos grupos funcionais parece ser diferente. A incidência de GFA nestes três pontos (D, E e F) não ultrapassam os 46% nestes pontos, sendo que há uma distribuição que se pode considerar abundante entre raspadores e coletores, sejam eles orgânicos detritívoros ou filtradores. De facto, se se olhar apenas para os coletores, que se alimentam de matéria particulada em suspensão, e os raspadores, que se alimentam do biofilme (Gamito & Furtado, 2009), há efetivamente uma dominância nesses pontos. No ponto D, por exemplo, os raspadores são mais abundantes nas recolhas de primavera, cedendo o seu domínio ao coletores no outono. Esta variação parece estar intimamente ligada às alterações hidromorfológicas, uma vez que com o aumento do corrente, os grupos de invertebrados que se alimentam de partículas em suspensão, são favorecidos em detrimento dos raspadores que se alimentam de matéria depositada, sendo que com o aumento da corrente, estes sedimentos podem ser revolvidos (Chung *et al*., 2012). Quanto à dinâmica dos microrganismos totais e indicadores de contaminação fecal, de facto o número de coletores aumenta com número de microrganismos totais e com a contaminação na coluna de água, mas no biofilme, sedimento donde se alimentam os raspadores, como o aumento da contaminação, notou-se uma diminuição de raspadores, não se podendo afirma que estes estão intimamente ligados à contaminação. No ponto E, os coletores são dominantes na primeira recolha de primavera e na recolha de outono, cedendo essa dominância aos raspadores na última primavera. A dinâmica da contaminação neste ponto

também é diferente, sendo que é detetado um decréscimo de contaminação, quer por microrganismos totais quer por indicadores de contaminação fecal ao longo do tempo na coluna de água, mas um aumento no biofilme. Assim sendo, pode-se supor que de facto, a relação entre coletores e raspadores segue uma dinâmica de abundância de microrganismos disponíveis, quer na coluna de água quer no biofilme. O contrário pode ser apontado para o ponto F, uma vez que a contaminação da coluna de água aumenta ao longo do tempo, aumentando o número de coletores, enquanto que os valores de contaminação no biofilme descem e a dinâmica dos raspadores tende a não se alterar muito nas 3 recolhas. Sendo que este local é rico em diferentes tipos de regimes hídricos, a sazonalidade não terá muito impacto, uma vez que os rápidos existem sempre, assim como zonas de lentos baixos ou mais profundos, onde é feita a retenção de matéria orgânica.

A dinâmica dos limnívoros parece não ter muito a ver com as progressão da contaminação microbiana, sendo que esta sofre de facto oscilações ao longo do curso do rio, mas sem um relação direta com a contaminação, podendo sim, ser relacionada com o tipo de sedimento, sendo que são mais abundantes no ponto E, em que o sedimento é fino e lamacento, local onde se instalam, alimentando-se desse sedimento e da matéria orgânica aí depositada (Jesus, 2001).

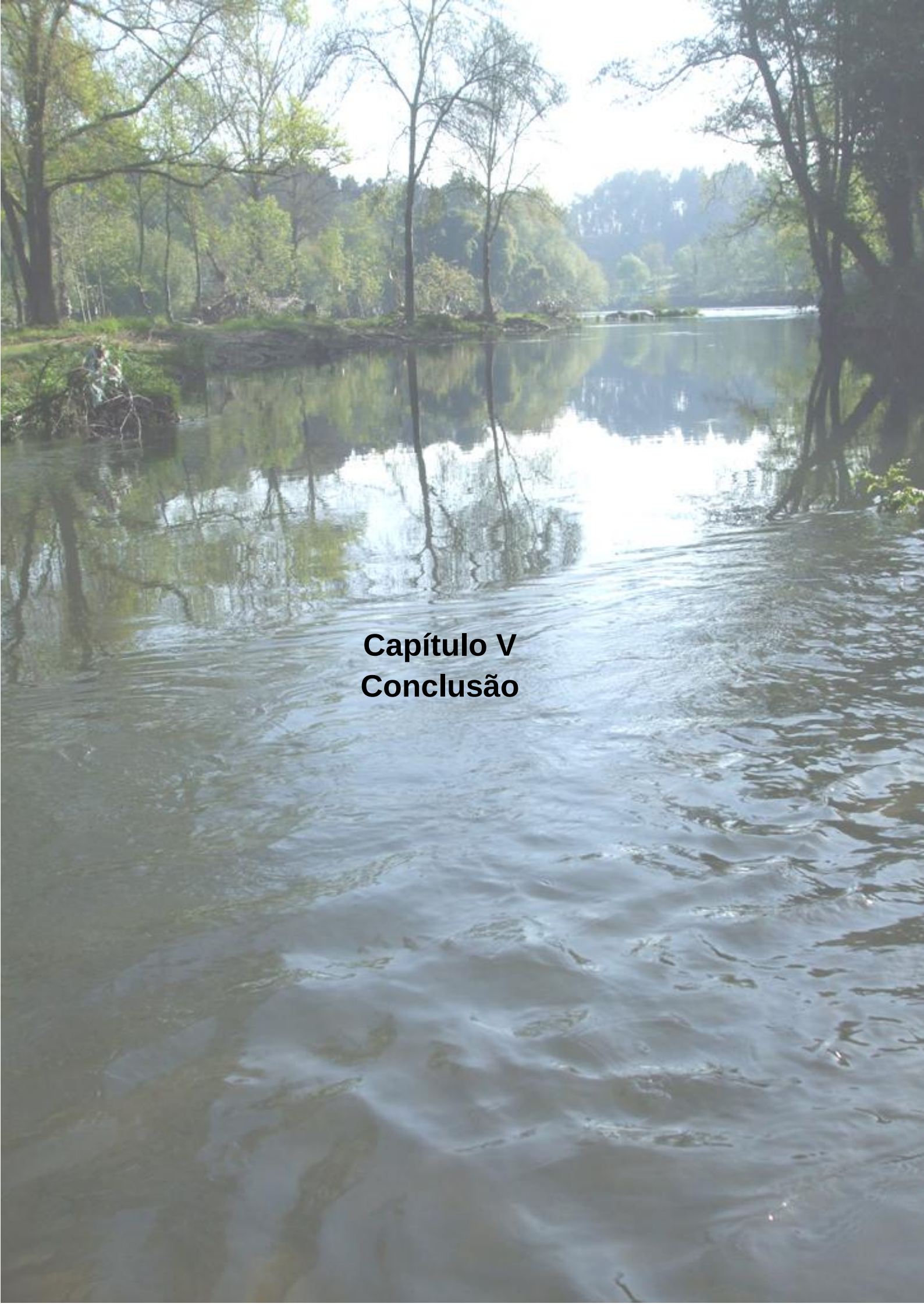
4.6 – Qualidade da água do rio ave, de acordo com diferentes parâmetros

Após o estudo dos vários parâmetros (Físico-químicos, biológicos e microbiológicos) e em conjunto com um grupo de trabalho, do Mestrado de Saúde Pública (A. Martins & Mendes, 2015), utilizando o programa informático Geographic Information Sistem-ArcGIS (Esri, EUA), criou-se um mapa com a distribuição espacial da população, dos potenciais pontos de interesse como a localização das ETARs, as explorações agrícolas, industriais, matadouros, florestas e hospitais. O resultado foi o apresentado na Figura 1, em que está representado também um índice que foi calculado com o recurso a todos os dados obtidos, um Índice de Qualidade da Água (WQI) (Rocha *et al.*, 2015). Neste índice entram os parâmetros físico-químicos, biológicos e microbiológicos, obtendo um valor que variam entre valores abaixo de 25, para uma qualidade muito má, e valores acima de 100, para uma qualidade excelente (**quadros no Anexo V**).

Como seria de supor, a qualidade da água do rio vai descendo conforme se afastam d a nascente, partindo de um valor da categoria “bom”, de 80.76, no ponto A, para valores de 53.47 no ponto F, considerada uma qualidade “média”.

Este mapa permite explicar muitas das oscilações nos parâmetros que foram analisados, demonstrando que o aumento da densidade populacional e industrial são das principais razões para a degradação de um curso de água.

O ponto A é um ponto de montanha, sem qualquer interferência antropogénica, não atingindo valores de excelência, pode ser considerado o ponto pristino deste curso de água. A perda que qualidade do ponto A para o B tem haver essencialmente com as duas barragens que se encontram entre eles, sendo que estudos demonstram que as albufeiras são reservatórios de água onde esta perde qualidade por se encontrar parada, sendo locais propícios para a eutrofização das massas de água. O ponto C, considerado como o ponto de viragem, é o ponto onde se encontra a primeira grande zona densamente povoada, sendo ainda uma zona pouco industrial. Os pontos D, E e F encontram-se no chamado médio Ave, onde se centra a maior parte da indústria desta região, apesar de muitas terem sido recentemente encerradas (Dunck *et al*. 2015). A grande incidência populacional, os grandes centros hospitalares na periferia, a incidência de indústria, matadouros e das ETARs, pode explicar muita da contaminação detetada nestes três últimos pontos.



Capítulo V
Conclusão

Conclusão

Com este trabalho foi possível fazer um retrato da qualidade da água do rio Ave num traçado desde a nascente até ao médio Ave. Este rio teve uma degradação da qualidade da água durante muitos anos sem qualquer tipo de intervenção, levando a que fosse considerado um dos rios mais poluídos de Portugal e da Europa. As intervenções que têm sido feitas para melhorar a sua qualidade têm surtido efeito no melhoramento da qualidade da água, sendo possível caracterizá-la segundo os dados deste trabalho com a qualidade de "razoável", quer a nível físico-químico quer a nível biológico. Apesar disso, os níveis de contaminação fecal detetados e particularmente a presença de isolados multirresistentes em determinados locais do rio, essencialmente na zona do médio Ave, são preocupantes e merecem ser alvo de monitorização e análise mais apertada.

Poucos trabalhos têm sido feitos sobre a qualidade da água e das margens do rio Ave. De facto, quando apareceram as primeiras fábricas têxteis nas margens do rio, a preservação de ecossistemas não era de todo uma política praticada, nos inícios do século XX (da Silva Costa, 2009). O único trabalho que foi realizado no âmbito de análise multiparamétrica da qualidade deste rio data de 2012, no âmbito do Plano de Gestão da Bacia hidrográfica do Cávado, Ave e Leça, sendo que estudos mais recentes apenas analisaram parâmetros físico-químicos e alguns microbiológicos.

Foi possível retirar várias conclusões dos resultados que se obtiveram, tanto a nível biológico como microbiológico.

A nível biológico, foi possível demonstrar que a qualidade do habitat tem um grande impacto sobre as comunidades de macroinvertebrados presentes, condicionando a sua abundância, diversidade e uniformidade, mas também outros fatores são relevantes como a hidromorfologia e tipo de sedimento.

Sabendo que as bactérias representam uma fonte de alimento para muitos macroinvertebrados, tentou-se perceber qual a relação que a contaminação fecal teria na manutenção dos grupos funcionais alimentares das comunidades ao longo do troço do rio, com gradientes de contaminação diferentes. O que se pode concluir foi que pode haver uma correlação entre grupos funcionais alimentares e contaminação fecal, uma vez que os coletores filtradores de uma comunidade aumentam com o aumento da contaminação fecal daquele local, enquanto que os raspadores orgânicos têm uma progressão inversa, diminuindo com o aumento da contaminação, apesar de que em zonas com um habitat com boa qualidade, como os pontos D e F, têm uma incidência significativa. No que diz respeito a variações entre locais, não foi possível tirar conclusões *in situ,* uma vez que existem muitas variáveis que condicionam a existência e abundância desses grupos funcionais alimentares.

No âmbito dos parâmetros microbiológicos, foi possível identificar o ponto A como um ponto pristino, o ponto B como um ponto com um pequeno impacto antropogénico e o ponto C como o ponto de viragem, em que se começa a detetar valores elevados de contaminação fecal, coincidindo com o aumento da densidade populacional. O ponto D é, no panorama geral um ponto onde a contaminação fecal, por *Enterococcus* spp. e por *E. coli,* apresenta valores mais altos, principalmente no biofilme. O facto de haver um decréscimo, embora moderado, da contaminação do ponto D para o ponto E, salvo a exceção na recolha 4, não foi possível ser explicado, podendo ter a ver com a composição química da água, não analisada neste trabalho. O ponto F apresenta de facto um nível de contaminação muito elevado também, sendo que em algumas recolhas foi detetado um valor de contaminação mais elevado que no ponto D, mas no geral os valores de contaminação eram superiores ao ponto E mas inferiores ao ponto D. O ponto D foi designado por "ponto problema", não só por apresentar valores de contaminação elevados, mas devido à incidência de isolados com perfis de resistência alarmantes, nomeadamente *E. coli* resistente a todas as classes de antibióticos, incluindo o imipenem, e também no caso da *E. coli*, da incidência de isolados pertencentes a filogrupos que normalmente englobam *E. coli* patogénicos, como os filogrupos D, E e F. Esta evolução terá tido como principal justificação o aumento da densidade populacional, principalmente no que diz respeito a estes três últimos pontos, assim como a um aumento da atividade industrial e agropecuária ao longo do rio.

Portanto, o ponto D apesar de não ser o que apresenta maior incidência de MDRs é aquele que apresenta isolados com maior relevância devido ao número de resistências e aos antibióticos a que são resistentes. Aí, no ponto D, foram detetados dois isolados de *E. coli* resistentes ao IMP e dois com uma resposta intermédia a este antibiótico, à semelhança de outro isolado identificado mais a jusante deste ponto em 2010, num trabalho de estudo microbiológico das águas do rio Ave, efetuado por este mesmo grupo de trabalho (Bessa et al., 2014), Um dos isolados resistentes ao IMP apresentava resistência a todos os antibióticos analisados, com exceção da colistina. Isto representa sem dúvida um problema grave para o ambiente e para a saúde pública, problema esse que é agravado pelo facto deste isolado resistente a todos os antibióticos não ser uma *E. coli* comensal e pertencer a um filogrupo potencialmente patogénico. Sem se ter conseguido encontrar uma explicação para a deteção destes isolados, pode-se propor diferentes hipóteses;

- Os isolados com estas características foram libertados em massa para a água do rio;
- Tiveram origem em efluentes pecuários ou industriais;
- Os isolados adquiriram estas resistências na água do rio.

Esta ultima hipótese pressupõe que nas águas do rio existissem resíduos de IMP, resíduos de compostos similares a este antibiótico ou mesmo compostos que co-selecionem bactérias com este tipo de resistência.

O cenário de provirem de efluentes hospitalares foi posto de parte, uma vez que, ao serem contactados laboratórios de diagnóstico e os hospitais do Médio Ave, estes asseguraram não terem sido detetados casos de infeções por *E. coli* com este tipo de resistência.

Posto isto, para tirar algum tipo de conclusão, seriam necessários estudos mais aprofundados e direcionados unicamente este local.

Analisando as resistências a antibióticos entre a coluna de água e o biofilme, o que se verifica é que não há uma correlação entre os isolados MDR do biofilme e da coluna de água, sendo que apenas o ponto F apresenta um aumento desses isolados tanto no biofilme como na coluna de água. Independentemente do ponto onde são encontrados, o elevado número de isolados MDRs observados no troço estudado do rio é alarmante e representa um perigo para a saúde pública.

Capítulo VI
Perspetivas

6- Perspetivas

Com este trabalho pretendeu-se obter uma visão atualizada e multiparamétrica da qualidade da água do rio Ave, uma vez que este não tem sido foco de muita atenção pelas entidades públicas.

Em relação à comunidade microbiana, este trabalho fez pela primeira uma abordagem sobre a sua dinâmica no rio, das oscilações da qualidade e da contaminação microbiana e fecal. Após a identificação dos principais problemas do rio e do levantamento dos locais mais problemáticos, o passo seguinte seria fazer uma análise mais aprofundada destes mesmos problemas.

Estudos de incidência e de significância de multirresistências nos diferentes pontos será um dos passos seguintes.

Devido à relevância dos isolados MDR encontrados, seria importante tentar perceber a sua origem, se animal ou humana, utilizando diferentes técnicas moleculares nomeadamente PFGE (*Pulsed-Fiel Gel Electrophoresis*). Moore e colaboradores (2010) constataram, ao analisar isolados de *E. coli* produtoras de ESBL CTX-M, que a grande parte dos isolados tinham origem na comunidade com pouco ou nenhum contacto com meio hospitalar. Ao falar com os hospitais e laboratórios de análises que trabalham para os hospitais, o que se constatou é que tem-se registado uma grande incidência de *E. coli* produtoras de ESBL causadoras de infeções hospitalares, mas em muito menor número em relação àquelas que foram isoladas das amostras de água. Para tentar perceber se estes isolados são filogeneticamente próximos, técnicas PFGE (*Pulsed-Fiel Gel Electrophoresis*) vão permitir saber se estes isolados estão relacionados, sendo que o mesmo se aplica aos *Enterococcus* spp., principalmente aos resistentes à vancomicina. O facto de duas *E. coli* resistentes ao imipenem terem sido encontrados numa filtração de 100 mL de água, implica que estes isolados estariam no rio em grande número, mas o facto é que não foram encontrados mais nenhuns, mesmo após analisar o resto da amostra e fazer nova recolha no mesmo local. Este facto levanta a hipótese deste antibiótico (ou os seus metabolitos ou outros compostos que o mimetizem) se encontrar na água. A deteção e o doseamento de imipenem nesta água (que foi colhida uma semana após o isolamento destas estirpes) está agora em curso por HPLC (*High-Performance Liquid Chromatography*), em colaboração com um grupo de Química da FFUP. No caso de ser detetado, qual será o impacto deste químico no ecossistema? Santos e colaboradores (2013) demonstraram o risco para o ecossistema aquático de alguns antibióticos como, a ciprofloxacina, referindo que este é toxico para algas dáfnias e peixes, sendo extremamente nocivo para as algas. Watkinson e colaboradores (2007) analisaram a capacidade das ETARs em degradar 28 antibióticos, e concluíram que

estes não são completamente degradados, acabando por ser lançados nos cursos da água, em concentrações na ordem dos ng/L, o que pode ter acontecido neste caso.

O estudo da relação dos macroinvertebrados com a contaminação fecal deveria ser feito em ambiente controlado, onde é possível controlar todas as variáveis O que se poderá também fazer futuramente é procurar perceber *in vitro* qual o impacto de *E. coli* pertencentes a filogrupos virulentos e patogénicos nos macroinvertebrados.

Espera-se que este trabalho possa ser a base de estudos mais detalhados e diversos.

Bibliografia

Hawkes, H. A. (1998). Origin and development of the biological monitoring working party score system. *Water Research*, *32*(3), **964–968**

Agência de Recursos Hidricos do Norte. (2000). *Plano da Bacia Hidrgráfica do Rio Ave* (Vol. III). **pp.345**

Agência Portuguesa do Ambiente, Agência de Recursos Hidricos do Norte (2012). Plano de Gestão da Região Hidrográfica do Cávado, Ave e Leça - RH2 (Anexo III - Fichas de Massas de Água) **pp.328**

Agência Portuguesa do Ambiente, A gência de recursos Hidricos do Norte (2012). Plano de Gestão da Região Hidrográfica do Cávado, Ave e Leça - RH2 (Parte 6 - Progarma de medidas) **pp.888**

Agência Portuguesa do Ambiente, Agência de recursos Hidricos do Norte (2015). Plano de Gestão de Região Hidrográfica 2016/2021 **pp.47**

Ainsworth, T., & Fine, M. (2006). Fluorescence in situ hybridization and spectral imaging of coral-associated bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, *72*(4), **3016–3020**

Akiyama, T., & Savin, M. C. (2010). Populations of antibiotic-resistant coliform bacteria change rapidly in a wastewater effluent dominated stream. *Science of the Total Environment*, *408*(24), **6192–6201**

Alba-tercedor, J., & Sánchez-ortega, A. (1986). Un Método Rápido Y Simple Para Evaluar La Calidad Biológica De Las Aguas Corrientes Basado En El De Hellawell (1978). *Limnetica*, *4*(1978), **51–56**

Almeida C, Azevedo NF, Fernandes RM, Keevil CW, Vieira MJ. Fluorescence in situ hybridization method using a peptide nucleic acid probe for identification of Salmonella spp. in a broad spectrum of samples. Appl Environ Microbiol. 2010 Jul; 76 (13): **4476-4485**

Al-Shami, S. a, Md Rawi, C. S., Ahmad, A. H., Abdul Hamid, S., & Mohd Nor, S. A. (2011). Influence of agricultural, industrial, and anthropogenic stresses on the distribution and

diversity of macroinvertebrates in Juru River Basin, Penang, Malaysia. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *74*(5), **1195–1202**

Amador, M. P., Fernandes, R. M., Duarte, I. M., Brito, M. L., Barreto, P., & Prudêncio, M. C. (2011). Assessment of Antibiotic Resistance in Water Systems. *ResearchGate*, **1–6**

Agência Portuguesa do Ambiente, Agência de recursos Hidricos (2012). Plano de Gestão da Região Hidrografica do Cávado, Ave e Leça (Parte 2 - Caracterizaçaõ e diagnóstico da região hidrográfica) **pp.273**

Araya, R., Tani, K., Takagi, T., Yamaguchi, N., & Nasu, M. (2003). Bacterial activity and community composition in stream water and biofilm from an urban river determined by fluorescent in situ hybridization and DGGE analysis. *FEMS Microbiology Ecology*, *43*(1), **111–119**

Aubin, D., & Varone, F. European Water Policy. A path towards an integrated resource management (2002) **pp.28**

Azrina, M. Z., Yap, C. K., Rahim Ismail, A., Ismail, A., & Tan, S. G. (2006). Anthropogenic impacts on the distribution and biodiversity of benthic macroinvertebrates and water quality of the Langat River, Peninsular Malaysia. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *64*(3), **337–347**

Baker, J. H., & Bradnam, L. a. (1976). The role of bacteria in the nutrition of aquatic detritivores. *Oecologia*, *24*(2), **95–104**

Beier, S., Witzel, K.-P., & Marxsen, J. (2008). Bacterial community composition in Central European running waters examined by temperature gradient gel electrophoresis and sequence analysis of 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*, *74*(1), **188–99**

Beisel, J. N., Usseglio-Polatera, P., Bachmann, V., & Moreteau, J. C. (2003). A comparative analysis of evenness index sensitivity. *International Review of Hydrobiology*, *88*(1), **3–15**

Bilotta, G. S., Bilotta, G. S., Brazier, R. E., & Brazier, R. E. (2008). Understanding the influence of suspended solids on water quality and aquatic biota. *Water Research*, *42*(12), **2849–2861**

Blaak, H., Lynch, G., Italiaander, R., Hamidjaja, R. a., Schets, F. M., & de Roda Husman, A. M. (2015). Multidrug-Resistant and Extended Spectrum Beta-Lactamase-Producing Escherichia coli in Dutch Surface Water and Wastewater. *Plos One*, *10*(6), **1-16**

Bonada, N., Rieradevall, M., & Prat, N. (2007). Macroinvertebrate community structure and biological traits related to flow permanence in a Mediterranean river network. *Hydrobiologia*, *589*(1), **91–106**

Boyen, F., Vangroenweghe, F., Butaye, P., De Graef, E., Castryck, F., Heylen, P., … Haesebrouck, F. (2010). Disk prediffusion is a reliable method for testing colistin susceptibility in porcine E. coli strains. *Veterinary Microbiology*, *144*(3-4), **359–362**

Callisto, M., Callisto, M., Moretti, M., Moretti, M., Goulart, M., & Goulart, M. (2001). Macroinvertebrados Bentonicos como ferramenta para avaliar a saúde de riachos. *Revista Brasileira de Recursos Hidricos*, *6*(1), **71–82**

Canosa, A., & Pinilla, G. (1999). Bacteriological eutrophication indicators in four Colombian water bodies (South America). *Lakes & Reservoirs: Research and Management*, (22), **23–27**

Carvalho, E. M. De, & Uieda, V. S. (2004). Colonização por macroinvertebrados bentônicos em substrato natural riacho serra de Itatinga, São Paulo ,Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 21(2), **287–293**

Chon, T.-S., Qu, X., Cho, W.-S., Hwang, H.-J., Tang, H., Liu, Y., … Koh, S.-C. (2013). Evaluation of stream ecosystem health and species association based on multi-taxa (benthic macroinvertebrates, algae, and microorganisms) patterning with different levels of pollution. *Ecological Informatics*, *17*, **58–72**

Chung, N., Bae, M.-J., Li, F., Kwon, Y.-S., Kwon, T.-S., Kim, J.-S., & Park, Y.-S. (2012). Habitat characteristics and trophic structure of benthic macroinvertebrates in a forested headwater stream. *Journal of Asia-Pacific Entomology*. Korean Society of Applied Entomology, Taiwan Entomological Society and Malaysian Plant Protection Society., 15(3), **495-505**

Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E., & Bonacorsi, P. (2000). Rapid and Simple Determination of the Escherichia coli Phylogenetic Group. *Applied and Environmental Microbiology*, *66*(10), **4555–4558**

Clermont, O., Christenson, J. K., Denamur, E., & Gordon, D. M. (2013). The Clermont Escherichia coli phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environmental Microbiology Reports*, *5*(1), **58–65**

CLSI. (2013). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement*. *Clinical and Laboratory Standards Institute* (Vol. 32).

Correia, A. M., Bandeira, N., & Anastácio, P. M. (2005). Predator-prey interactions of Procambarus clarkii with aquatic macroinvertebrates in single and multiple prey systems. *Acta Oecologica*, *28*(3), **337–343**

Costa, F. S. (2008). HIDRO-CONFLITOS NA BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO AVE – UMA ANÁLISE A PARTIR DAS TRANSGRESSÕES COMETIDAS NO PERÍODO 1902-19731 ,**1–15**

Czekalski, N., Berthold, T., Caucci, S., Egli, A., & Bürgmann, H. (2012). Increased levels of multiresistant bacteria and resistance genes after wastewater treatment and their dissemination into lake geneva, Switzerland. *Frontiers in Microbiology*, *3*(March), **1-18**

Czerniawska-Kusza, I. (2005). Comparing modified biological monitoring working party score system and several biological indices based on macroinvertebrates for water-quality assessment. *Limnologica*, *35*(3), **169–176**

Da Costa, P. M., Loureiro, L., & Matos, A. J. F. (2013). Transfer of multidrug-resistant bacteria between intermingled ecological niches: the interface between humans, animals and the environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *10*(1), **278–94**

Da Costa, P. M., Oliveira, M., Bica, A., Vaz-Pires, P., & Bernardo, F. (2007). Antimicrobial resistance in Enterococcus spp. and Escherichia coli isolated from poultry feed and feed ingredients. *Veterinary Microbiology*, *120*(1-2), **122–131**

Da Silva Costa, F. (2009). *A indústria têxtil na bacia hidrográfica do rio Ave: Uma perspetiva segundo as fábricas de fiação e tecidos, numa relação históricamente sustentada pelo dominio público hídrico*. http://repositorium.sdum.uminho.pt/, **1-16**

Decreto Lei n^{o} 236/98. (1998). *Diário Da Republica - I Série -A*, *176*, **3676–3722**

Enayati, M., Sadeghi, J., Nahaei, M., Aghazadeh, M., Pourshafie, M., & Talebi, M. (2015). Virulence and antimicrobial resistance of *Enterococcus faecium* isolated from water samples. *Letters in Applied Microbiology*, (98), **1-16**

European Commission Environment. (2000). *Common Implementation Strategy for the Water Framework Directive (2000 / 60 / EC),Guidance document No 2, Idendification of water bodies*. **pp.148**

EuropeanEnvironment Agency. (2012). Assesment on nutrients in freshwater. Retrieved from http://www.eea.europa.eu/data-and-maps/indicators/nutrients-in-freshwater/nutrients-in-freshwater-assessment-published-3 **pp.13**

European Environmente Agency. (2012). Assesmente of oxygen consuming substances in rivers. http://www.eea.europa.eu/data-and-maps/indicators/oxygen-consuming-substances-in-rivers/oxygen-consuming-substances-in-rivers-7 **pp.12**

Figueira, V., Serra, E., & Manaia, C. M. (2011). Differential patterns of antimicrobial resistance in population subsets of Escherichia coli isolated from waste- and surface waters. *The Science of the Total Environment*, *409*(6), **1017–1023**

Friberg, N., Skriver, J., Larsen, S. E., Pedersen, M. L., & Buffagni, A. (2010). Stream macroinvertebrate occurrence along gradients in organic pollution and eutrophication. *Freshwater Biology*, *55*(7), **1405–1419**

Fontoura, A. P., 1989. As comunidades de macroinvertebrados num sistema hidroeléctrico do Norte de Portugal. Avaliação de impacte ambiental. Dissertação de doutoramento apresentado à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, **pp 346**

Fuchs, B. M., Wallner, G., Beisker, W., Schwippl, I., Ludwig, W., & Amann, R. (1998). Flow cytometric analysis of the in situ accessibility of Escherichia coli 16S rRNA for fluorescently labeled oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology*, *64*(12), **4973–4982**

Gabriel, R. (2011). *Monitorização e Controlo da Amêijoa asiática , Corbicula fluminea (Müller, 1774)*, **pp. 67**

Gamito, S. (2010). Caution is needed when applying Margalef diversity index. *Ecological Indicators*, *10*(2), **550–551**

Gamito, S., & Furtado, R. (2009). Feeding diversity in macroinvertebrate communities: A contribution to estimate the ecological status in shallow waters. *Ecological Indicators*, *9*(5), **1009–1019**

Goodchild, R. G. (1998). EU policies for the reduction of nitrogen in water: The example of the Nitrates Directive. *Environmental Pollution*, *102*(SUPPL. 1), **737–740**

Guo, M. T., Yuan, Q. Bin, & Yang, J. (2013). Microbial selectivity of UV treatment on antibiotic-resistant heterotrophic bacteria in secondary effluents of a municipal wastewater treatment plant. *Water Research*, *47*(16), **6388–6394**

Harding, J. S., & Winterbourn, M. J. (1995, December). Effects of contrasting land use on physico-chemical conditions and benthic assemblages of streams in a Canterbury (South Island, New Zealand) river system. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 29(4), **479-492**

Henri Tachet, Philippe Richoux, M. B. et P. U.-P. (2003). *Invertébrés d'eau douce - Systématique, biologia, écologie.pdf* (CNRS Édito). Paris.

Hogardt, M., Trebesius, K., Geiger, a M., Hornef, M., Rosenecker, J., & Heesemann, J. (2000). Specific and rapid detection by fluorescent in situ hybridization of bacteria in clinical samples obtained from cystic fibrosis patients. *Journal of Clinical Microbiology*, *38*(2), **818–825**

INAG. Critérios para a classificação do estado das massas de água superficiais (2009), **pp. 71**

INAG, I. P. (2008). *Protocolo de amostragem e análise para os MACROINVERTEBRADOS BENTÓNICOS*. *Ministério do Ambiente, Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional, Instituto da Água, I.P,* **pp. 61**

Isidori, M., Lavorgna, M., Nardelli, A., Pascarella, L., & Parrella, A. (2005). Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms. *The Science of the Total Environment*, *346*(1-3), **87–98**

Jackson, C. (2004). Use of a genus-and species-specific multiplex PCR for identification of enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*, *42*(8), **3558–3565**

Jesus, T. (2001). *Centrais hidroelétricas de pequena dimensão: Impacto na dinâmica da comunidade de macroinvertebrados bentónicos e na variação da qualidade da àgua*, **pp. 236**

Jindal, A., Kocherginskaya, S., Mehboob, A., Robert, M., Mackie, R. I., Raskin, L., & Zilles, J. L. (2006). Antimicrobial use and resistance in swine waste treatment systems. *Applied and Environmental Microbiology*, *72*(12), **7813–7820**

Kim, B., Lee, S.-E., Song, M.-Y., Choi, J.-H., Ahn, S.-M., Lee, K.-S., … Koh, S.-C. (2008). Implementation of artificial neural networks (ANNs) to analysis of inter-taxa communities of benthic microorganisms and macroinvertebrates in a polluted stream. *The Science of the Total Environment*, *390*(1), **262–274**

Kjelleberg, S., & Molin, S. (2002). Is there a role for quorum sensing signals in bacterial biofilms? *Current Opinion in Microbiology*, *5*(3), **254–258**

Kümmerer, K. (2009). Antibiotics in the aquatic environment--a review--part I. *Chemosphere*, *75*(4), **417–434**

Larsen, B., Essmann, M. K., Geletta, S., & Duff, B. (2012). Enterococcus in surface waters from the Des Moines River (Iowa) watershed: location, persistence and vancomycin resistance. *International Journal of Environmental Health Research*, 22(4), **305-316**

Lear, G., Anderson, M. J., Smith, J. P., Boxen, K., & Lewis, G. D. (2008). Spatial and temporal heterogeneity of the bacterial communities in stream epilithic biofilms. *FEMS Microbiology Ecology*, *65*(3), **463–473**

Le-Minh, N., Khan, S. J., Drewes, J. E., & Stuetz, R. M. (2010). Fate of antibiotics during municipal water recycling treatment processes. *Water Research*, *44*(15), **4295–4323**

Licciano, M., Terlizzi, A., Giangrande, A., Cavallo, R. A., & Stabili, L. (2007). Filter-feeder macroinvertebrates as key players in culturable bacteria biodiversity control: a case of study with Sabella spallanzanii (Polychaeta: Sabellidae). *Marine Environmental Research*, *64*(4), **504–513**

Łuczkiewicz, a, Jankowska, K., Fudala-Książek, S., & Olańczuk-Neyman, K. (2010). Antimicrobial resistance of fecal indicators in municipal wastewater treatment plant. *Water Research*, *44*(17), **5089–5097**

Lyautey, E., Lacoste, B., Ten-Hage, L., Rols, J.-L., & Garabetian, F. (2005). Analysis of bacterial diversity in river biofilms using 16S rDNA PCR-DGGE: methodological settings and fingerprints interpretation. *Water Research*, *39*(2-3), **380–388**

Macedo, A. S., Freitas, A. R., Abreu, C., Machado, E., Peixe, L., Sousa, J. C., & Novais, C. (2011). Characterization of antibiotic resistant enterococci isolated from untreated waters for human consumption in Portugal. *International Journal of Food Microbiology*, *145*(1), **315–319**

Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., … Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, *18*(3), **268–281**

Mandaville, S. M. (1993). Benthic Macroinvertebrates in Taxa Tolerance Values , Metrics , and Protocols. In *The use of biotic index as an indication of water quality* (Vol. 5, **pp. 85–98)**.

Marques, M., Ferreira, R., & Barbosa, F. (1999). A comunidade de macroinvertebrados aquáticos e características limnológicas das lagoas Carioca e da Barra, Parque Estadual do Rio Doce, MG. *Revista Brasileira de Biologia*, *59*(2), **203–210**

Martins, A., & Mendes, Â. (2015). *Water quality of the Ave River and its determinants : The application of geographic information systems*, **1-7**

Martins da Costa, P., Vaz-Pires, P., & Bernardo, F. (2006). Antimicrobial resistance in Enterococcus spp. isolated in inflow, effluent and sludge from municipal sewage water treatment plants. *Water Research*, *40*(8), **1735–1740**

Martins, N. (2014). Exposição a agentes perturbadores naturais e antropogénicos: consequências na diversidade genética de populações de dafnídeos. *Captar.web.ua.pt*, *1*(1), **67–78**

Mesa, R. J., Blanc, V., Blanch, A. R., Cortés, P., González, J. J., Lavilla, S., … Navarro, F. (2006). Extended-spectrum β-lactamase-producing Enterobacteriaceae in different environments (humans, food, animal farms and sewage). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *58*(1), **211–215**

Moore, J. E., Watabe, M., Millar, B. C., Loughrey, A., McCalmont, M., Goldsmith, C. E., … Rooney, P. J. (2010). Screening of clinical, food, water and animal isolates of Escherichia coli for the presence of blaCTX-M extended spectrum beta-lactamase (ESBL) antibiotic resistance gene loci. *The Ulster Medical Journal*, *79*(2), **85–88**

Muhid, P., Davis, T. W., Bunn, S. E., & Burford, M. a. (2013). Effects of inorganic nutrients in recycled water on freshwater phytoplankton biomass and composition. *Water Research*, *47*(1), **384–394**

Munné, A., Prat, N., Solà, C., Bonada, N., & Rieradevall, M. (2003). A simple field method for assessing the ecological quality of riparian habitat in rivers and streams: QBR index. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, *13*(2), **147–163**

Nedeau, E. J., Merritt, R. W., & Kaufman, M. G. (2003). The effect of an industrial effluent on an urban stream benthic community: water quality vs habitat quality. *Environmental Pollution (Barking, Essex : 1987)*, *123*(1), **1–13**

Ogbeibu, a E., & Oribhabor, B. J. (2002). Ecological impact of river impoundment using benthic macro-invertebrates as indicators. *Water Research*, *36*(10), **2427–2436**

Oliveira, S. V., & Cortes, R. M. V. (2006). Environmental indicators of ecological integrity and their development for running waters in northern Portugal. *Limnetica*, *25*(1-2), **479–498**

Oliver, J. D. (2005). The viable but nonculturable state in bacteria. *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)*, *43 Spec No*(February), **93–100**

Paisley, M. F., Walley, W. J., & Trigg, D. J. (2011). Identification of macro-invertebrate taxa as indicators of nutrient enrichment in rivers. *Ecological Informatics*, *6*(6), **399–406**

Pernthaler, J., Glockner, F., Schonhuber, W., & Amann, R. (2001). Fluorescence in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes. In *Methods in microbiology* (**pp. 207–226**).

Poirel, L., Barbosa-Vasconcelos, A., Simões, R. R., Da Costa, P. M., Liu, W., & Nordmann, P. (2012, March 1). Environmental KPC-producing Escherichia coli isolates in Portugal. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(3), **1662-1663**

Ratajczak, M., Laroche, E., Berthe, T., Clermont, O., Pawlak, B., Denamur, E., & Petit, F. (2010). Influence of hydrological conditions on the Escherichia coli population structure in the water of a creek on a rural watershed. *BMC Microbiology*, *10*:222, **1-10**

Ravera, O. (2001). A comparison between diversity, similarity and biotic indices applied to the macroinvertebrate community of a small stream: The Ravella river (Como Province, Northern Italy). *Aquatic Ecology*, *35*(2), **97–107**

Rocha, F. C., Andrade, E. M., & Lopes, F. B. (2015). Water quality index calculated from biological, physical and chemical attributes. *Environmental Monitoring and Assessment*, *187*(1), **1-15**

Rosa, I. C., Pereira, J. L., Gomes, J., Saraiva, P. M., Gonçalves, F., & Costa, R. (2011). The Asian clam Corbicula fluminea in the European freshwater-dependent industry: A latent threat or a friendly enemy? *Ecological Economics*, *70*(10), **1805–1813**

Saker, M. L., Nogueira, I. C. G., & Vasconcelos, V. M. (2003). Distribution and toxicity of Cylindrospermopsis raciborskii (cyanobacteria) in Portuguese freshwaters. *Limnetica*, *22*(3-4), **129–136**

Sánchez, E., Colmenarejo, M. F., Vicente, J., Rubio, A., García, M. G., Travieso, L., & Borja, R. (2007). Use of the water quality index and dissolved oxygen deficit as simple indicators of watersheds pollution. *Ecological Indicators*, *7*(2), **315–328**

Santos, L. H. M. L. M., Gros, M., Rodriguez-Mozaz, S., Delerue-Matos, C., Pena, A., Barceló, D., & Montenegro, M. C. B. S. M. (2013). Contribution of hospital effluents to the load of pharmaceuticals in urban wastewaters: identification of ecologically relevant pharmaceuticals. *The Science of the Total Environment*, *461-462*, **302–316**

Schauer, M., Massana, R., & Pedrôs-Alio, C. (2000). Spatial differences in bacterioplankton composition along the Catalan coast (NW Mediterranean) assessed by molecular fingerprinting. *FEMS Microbiology Ecology*, *33*(1), **51–59**

Schjørring, S., Struve, C., & Krogfelt, K. a. (2008). Transfer of antimicrobial resistance plasmids from Klebsiella pneumoniae to Escherichia coli in the mouse intestine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *62*(5), **1086–1093**

Schöttner, S., Hoffmann, F., Cárdenas, P., Rapp, H. T., Boetius, A., & Ramette, A. (2013). Relationships between host phylogeny, host type and bacterial community diversity in cold-water coral reef sponges. *PloS One*, *8*(2), **1-11**

Sharma, R. C., & Rawat, J. S. (2009). Monitoring of aquatic macroinvertebrates as bioindicator for assessing the health of wetlands: A case study in the Central Himalayas, India. *Ecological Indicators*, *9*(1), **118–128**

Smil, V. (2000). PHOSPHORUS IN THE ENVIRONMENT: Natural Flows and Human Interferences. *Annual Review of Energy and the Environment*, *25*(1), **53–88**

Smith, A. J., Bode, R. W., & Kleppel, G. S. (2007). A nutrient biotic index (NBI) for use with benthic macroinvertebrate communities. *Ecological Indicators*, *7*(2), **371–386**

Soares, H. M. V. M., Boaventura, R. A. R., Machado, A. A S. C., & Esteves Da Silva, J. C. G. (1999). Sediments as monitors of heavy metal contamination in the Ave river basin (Portugal): Multivariate analysis of data. *Environmental Pollution*, *105*(3), **311–323**

Stabili, L., Licciano, M., Giangrande, A., Fanelli, G., & Cavallo, R. A. (2006). Sabella spallanzanii filter-feeding on bacterial community: ecological implications and applications. *Marine Environmental Research*, *61*(1), **74–92**

Suárez, M. L., Vidal-Abarca, M. R., Del Mar Sánchez-Montoya, M., Alba-Tercedor, J., Álvarez, M., Avilés, J., … Vivas, S. (2002). Las riberas de los ríos mediterráneos y su calidad: El uso del índice QBR. *Limnetica*, *21*(3-4), **135–148**

Townsend, C. R., Arbuckle, C. J., Crowl, T. A., & Scarsbrook, M. R. (1997). The relationship between land use and physicochemistry, food resources and macroinvertebrate communities in tributaries of the Taieri River, New Zealand: a hierarchically scaled approach. *Freshwater Biology*, *37*(1), **177–191**

TRATAVE. Manual de Gestão do Sistema Integrado de Qaulidade Ambeintal (2013), **pp. 17**

Usseglio-Polatera, P., Bournaud, M., Richoux, P., & Tachet, H. (2000). Biological and ecological traits of benthic freshwater macroinvertebrates: relationships and definition of groups with similar traits. *Freshwater Biology*, *43*(2), **175–205**

Van Damme, P. A., Hamel, C., Ayala, A., & Bervoets, L. (2008). Macroinvertebrate community response to acid mine drainage in rivers of the High Andes (Bolivia). *Environmental Pollution (Barking, Essex : 1987)*, *156*(3), **1061–1068**

Watkinson, a J., Murby, E. J., & Costanzo, S. D. (2007). Removal of antibiotics in conventional and advanced wastewater treatment: implications for environmental discharge and wastewater recycling. *Water Research*, *41*(18), **4164–4176**

Wellinghausen, N., Bartel, M., Essig, A., & Poppert, S. (2007). Rapid identification of clinically relevant Enterococcus species by fluorescence in situ hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*, *45*(10), **3424–3426**

Wetzel, R. G., Hatcher, P. G., & Bianchi, T. S. (1995). Natural photolysis by ultraviolet irradiance of recalcitrant dissolved organic matter to simple substrates for rapidbacterial metabolism. *Limnology and Oceanography*, *40*(8), **1369–1380**

Wisplinghoff, H., Bischoff, T., Tallent, S. M., Seifert, H., Wenzel, R. P., & Edmond, M. B. (2004). Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, *39*(3), **309–317**

Yoder, C. O., & Rankin, E. T. (1998). The role of biological indicators in a state water quality management process. *Environmental Monitoring and Assessment*, 51, **61-88**

Zamora-Muñoz, C. (1995). Are biological indices BMPW'and ASPT'and their significance regarding water quality seasonally dependent? Factors explaining their variations. *Water Research*, *29*(I), **285 – 290**

ANEXOS

Anexo I – Gráficos de análise de microrganismos e macroinvertebrados

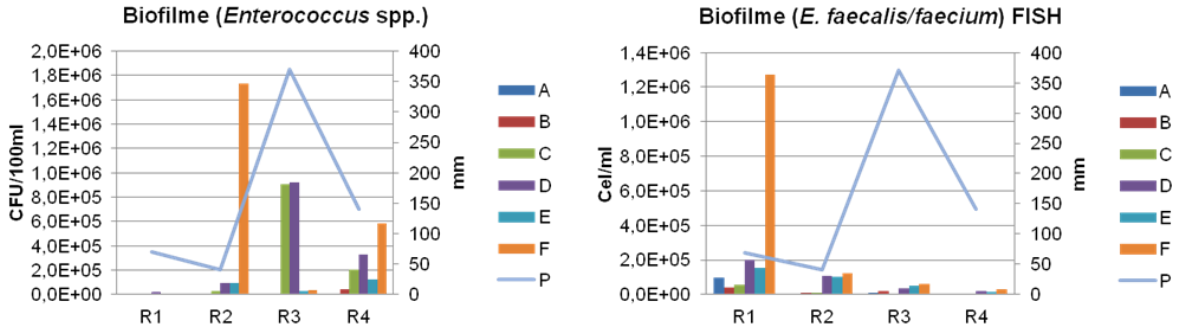


Figura 67: Progressão espácio-temporal de contagens no biofilme e em meio de cultura de *Enterococcus* spp. no biofilme.

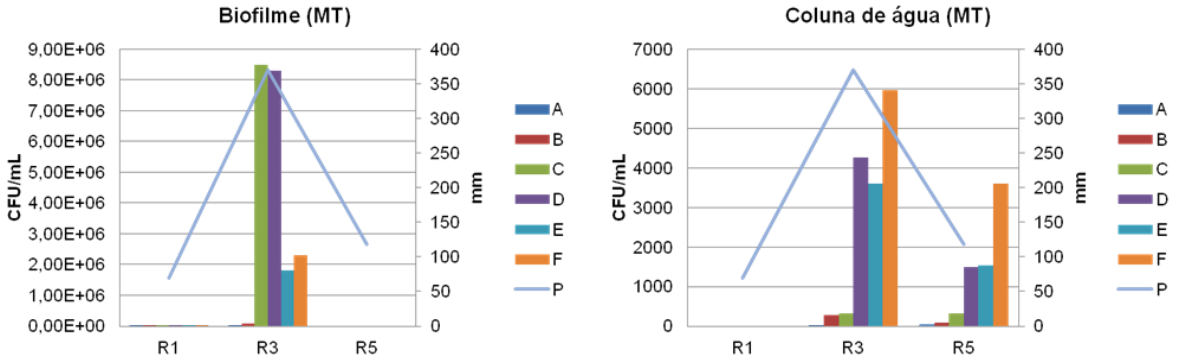


Figura 68: Progressão espácio-temporal das contagens de microrganismos totais na coluna de água e no biofilme.

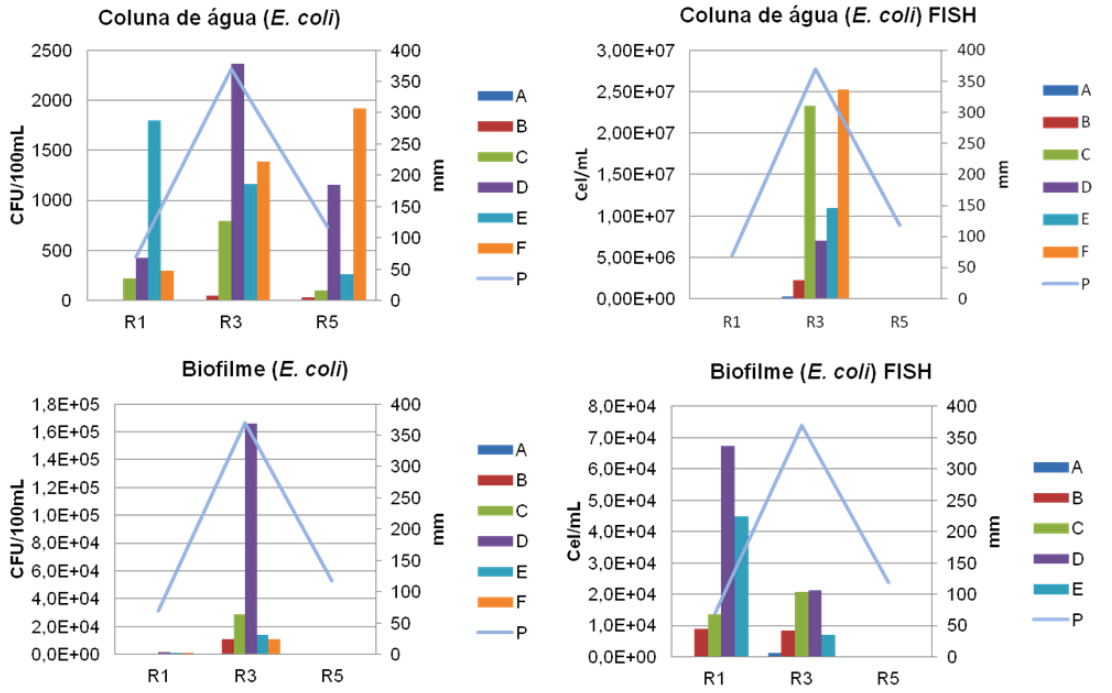


Figura 69:Progressão espácio-temporal das contagens de *E. coli* por meio de cultura e por FISH, na coluna de água e no biofilme.

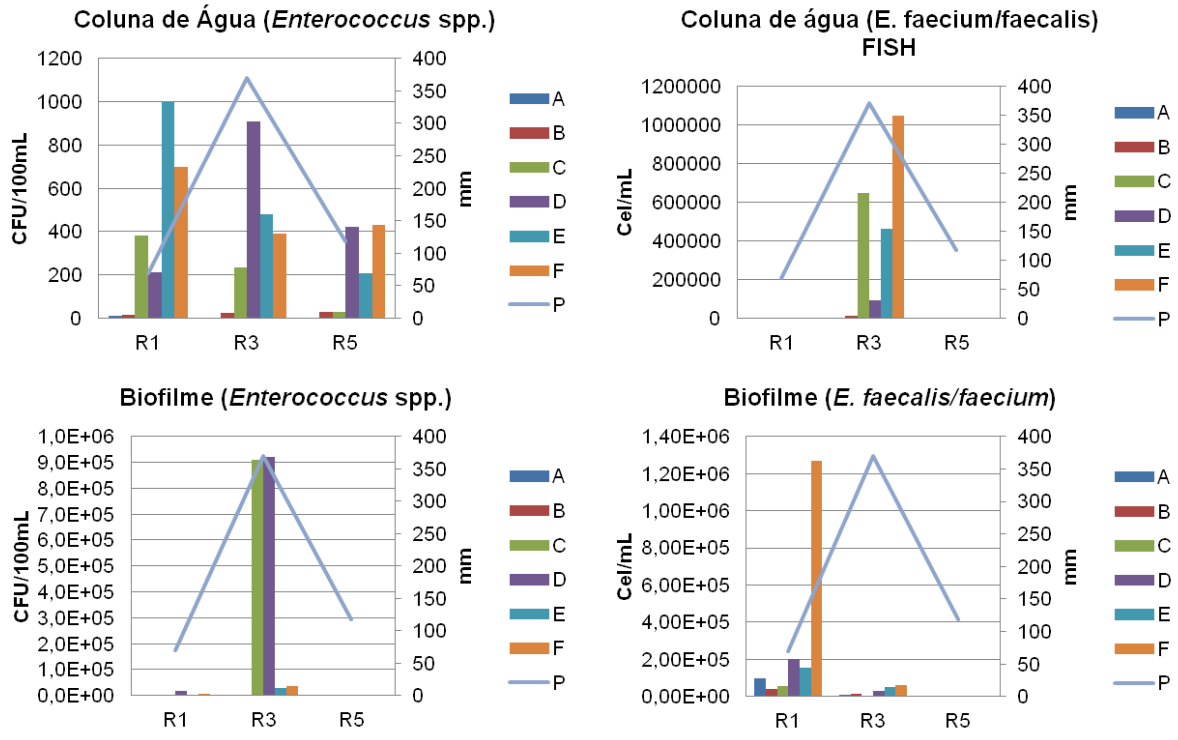


Figura 70: Progressão espácio-temporal de contagens de *Enterococcus* spp. em meio de cultura e FISH, na coluna de água e no biofilme

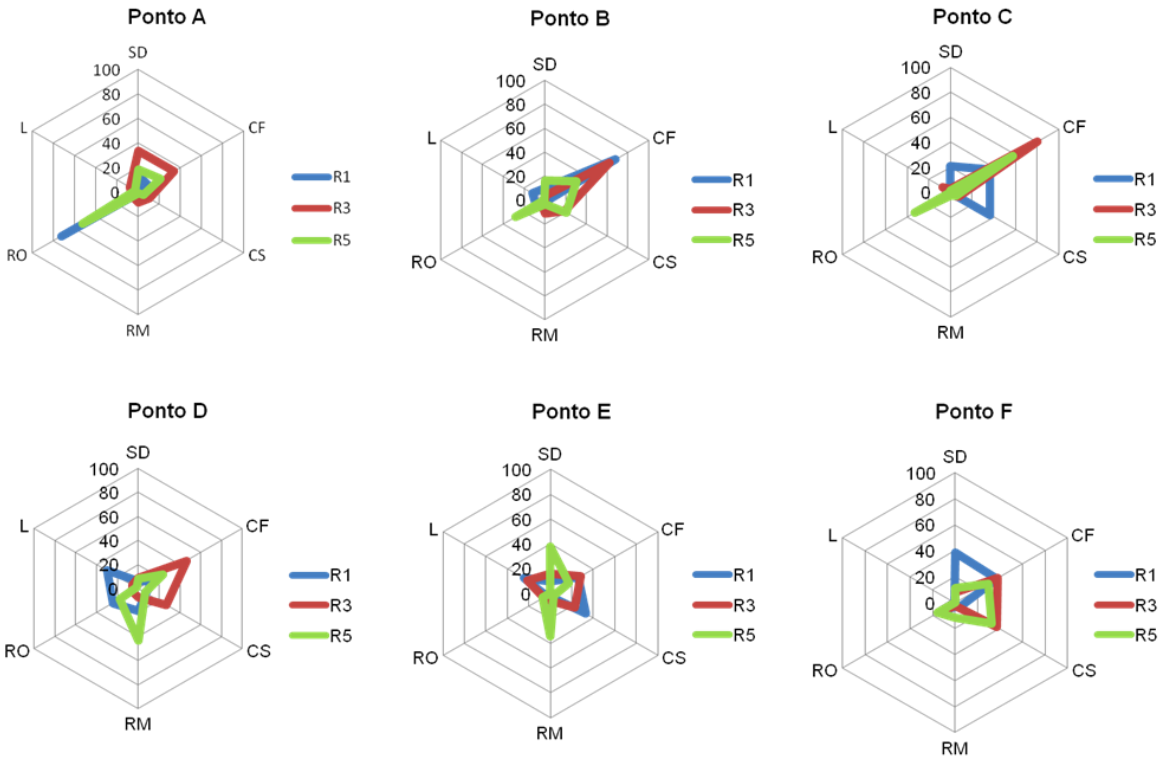


Figura 71: Progressão da distribuição dos grupos funcionais alimentares de macroinvertebrados nas três recolhas por cada ponto.

Anexo II – Tabelas dos valores máximos recomendados para os diversos parâmetros físicos, químicos e microbiológicos**.**

Tabela 22: Valores máximos recomendáveis e máximos admissíveis para águas doces superficiais destinadas à produção de água de consumo humano.

ANEXO I

Qualidade das águas doces superficiais destinadas à produção de água para consumo humano

Parâmetros	Expressão dos resultados	A1		A2		A3	
		VMR	VMA	VMR	VMA	VMR	VMA
pH, 25°C	Escala de Sorensen	6,5-8,5	–	5,5-9,0	–	5,5-9,0	–
Cor (após filtração simples)	mg/l, escala *Pt-Co*	10	(O) 20	50	(O) 100	50	(O) 200
Sólidos suspensos totais	mg/l	25	–	–	–	–	–
Temperatura	°C	22	(O) 25	22	(O) 25	22	(O) 25
Condutividade	µS/cm, 20°C	1 000	–	1 000	–	1 000	–
Cheiro	Factor de diluição, a 25°C	3	–	10	–	20	–
Nitratos (*)	mg/l NO_3	25	(O) 50	–	(O) 50	–	(O) 50
Fluoretos (1)	mg/l *F*	0,7-1,0	1,5	0,7-1,7	–	0,7-1,7	–
Cloro orgânico total extraível	mg/l *Cl*	–	–	–	–	–	–
Ferro dissolvido (*)	mg/l *Fe*	0,1	0,3	1,0	2,0	1,0	–
Manganês (*)	mg/l *Mn*	0,05	–	0,10	–	1,00	–
Cobre	mg/l *Cu*	0,02	(O) 0,05	0,05	–	1,00	–
Zinco	mg/l *Zn*	0,5	3,0	1,0	5,0	1,0	5,0
Boro	mg/l *B*	1,0	–	1,0	–	1,0	–
Berílio	mg/l *Be*	–	–	–	–	–	–
Cobalto	mg/l *Co*	–	–	–	–	–	–
Níquel	mg/l *Ni*	–	–	–	–	–	–
Vanádio	mg/l *V*	–	–	–	–	–	–
Arsénio	mg/l *As*	0,01	0,05	–	0,05	0,05	0,10
Cádmio	mg/l *Cd*	0,001	0,005	0,001	0,005	0,001	0,005
Crómio total	mg/l *Cr*	–	0,05	–	0,05	–	0,05
Chumbo	mg/l *Pb*	–	0,05	–	0,05	–	0,05
Selénio	mg/l *Se*	–	0,01	–	0,01	–	0,01
Mercúrio	mg/l *Hg*	0,0005	0,0010	0,0005	0,0010	0,0005	0,0010
Bário	mg/l *Ba*	–	0,1	–	1,0	–	1,0
Cianetos	mg/l *CN*	–	0,05	–	0,05	–	0,05
Sulfatos	mg/l So_4	150	250	150	(O) 250	150	(O) 250
Cloretos	mg/l *Cl*	200	–	200	–	200	–
Substâncias tensoactivas (que reagem com o azul-de-metileno).	mg/l, sulfato de lauril e sódio	0,2	–	0,2	–	0,5	–
Fosfatos (*) (2)	mg/l P_2O_5	0,4	–	0,7	–	0,7	–
Fenóis	mg/l C_6H_5OH	–	0,001	0,001	0,005	0,010	0,100
Hidrocarbonetos dissolvidos ou emulsionados	mg/l	–	0,05	–	0,20	0,50	1,00
Hidrocarbonetos aromáticos polinucleares	µg/l	–	0,2	–	0,2	–	1,0
Pesticidas totais (paratião, hexaclorociclo-hexano, dieldrina e outros).	µg/l	–	1,0	–	2,5	–	5,0
Carência química de oxigénio (CQO) (*)	mg/l O_2	–	–	–	–	30	–
Oxigénio dissolvido (*) (3)	% saturação de O_2	70	–	50	–	30	–
Carência bioquímica de oxigénio a (CBO_5, 20° C) (*)	mg/l O_2	3	–	5	–	7	–
Azoto Kjeldahl (excluindo o azoto de NO_2 e NO_3)	mg/l *N*	1	–	2	–	3	–
Azoto amoniacal	mg/l NH_4	0,05	–	1,00	1,50	2,00	(O) 4,00
Substâncias extraíveis com clorofórmio	mg/l	0,1	–	0,2	–	0,5	–
Carbono orgânico total (COT)	mg/l *C*	–	–	–	–	–	–
Carbono orgânico residual após floculação e filtração através de membrana (5µm).	mg/l *C*	–	–	–	–	–	–
Coliformes totais	/100 ml	50	–	5 000	–	50 000	–
Coliformes fecais	/100 ml	20	–	2 000	–	20 000	–
Estreptococos fecais	/100 ml	20	–	1 000	–	10 000	–
Salmonelas		Ausência em 5 000 ml	–	Ausência em 1 000 ml	–	–	–

(O) Os limites podem ser excedidos em caso de condições geográficas ou meteorológicas excepcionais (n.º 1 do artigo 10.º).
(*) Os limites podem ser excedidos para os parâmetros marcados com * em lagos de pouca profundidade e baixa taxa de renovação.
(1) Os valores indicados constituem os limites inferior e superior das concentrações, determinados em função da média anual das temperaturas máximas diárias.
(2) Este parâmetro é incluído para satisfazer as exigências ecológicas de certos meios.
(3) Refere-se a um VmR.

VMR — valor máximo recomendado.
VMA — valor máximo admissível.

ANEXO II

Esquemas tipo de tratamento referentes às classes A1, A2 e A3 das águas superficiais

Classe A1 — tratamento físico e desinfecção.
Classe A2 — tratamento físico e químico e desinfecção.
Classe A3 — tratamento físico, químico de afinação e desinfecção.

Tabela 23: Valores máximos recomendados e admissíveis águas destinadas à rega de campos agrícolas

Parâmetro S	Expressão dos resultados	VMR	VMA	Observações
Manganés (*Mn*)	mg/l	0,20	10	Tóxico para um certo número de culturas desde algumas décimas até poucos mg/l, mas normalmente só em solos ácidos.
Molibdénio (*Mo*)	mg/l	0,005	0,05	Não é tóxico em concentrações normais. Em solos ricos em molibdénio livre as forragens podem no entanto ocasionar toxicidade nos animais.
Níquel (*Ni*)	mg/l	0,5	2,0	Tóxico para um certo número de culturas entre 0,5 mg/l e 1 mg/l; reduzida toxicidade para *pH* neutro ou alcalino.
Nitratos (NO_3)	mg/l	50		Concentrações elevadas podem afectar a produção e qualidade das culturas sensíveis. No plano de fertilização da parcela convirá contabilizar o azoto veiculado pela água de rega.
Salinidade: CE ..... SDT	 dS/m mg/l	 1 640		Depende muito da resistência das culturas à salinidade, bem como do clima, do método de rega e da textura do solo.
SAR (1)		8		Depende da salinidade da água, características do solo e do tipo de cultura a ser irrigada.
Selénio (*Se*)	mg/l	0,02	0,05	Tóxico para culturas em concentrações da ordem dos 0,025 mg/l. Em solos com um teor relativamente elevado em selénio absorvido as forragens podem ocasionar toxicidade nos animais.
Sólidos suspensos totais (SST).	mg/l	60		Concentrações elevadas poderão ocasionar colmatagem em solos e assoreamento nas redes de rega, bem como entupimentos nos sistemas de rega gota-a-gota e aspersão, bem como neste último sistema a água poderá provocar depósitos sobre as folhas e frutos.
Sulfatos (SO_4)	mg/l	575		
Vanádio (*V*)	mg/l	0,10	1,0	Tóxico para diversas culturas em concentrações relativamente baixas.
Zinco (*Zn*)	mg/l	2,0	10,0	Tóxico para diversas culturas numa gama ampla, toxicidade reduzida a *pH*>6 e solos de textura fina ou de solos orgânicos.
pH	Escala de Sorensen	6,5-8,4	4,5-9,0	
Coliformes fecais	/100 ml	100		
Ovos de parasitas intestinais	N/l		1	

(1) A relação de adsorção de sódio (SAR) é traduzida pela seguinte equação, onde as concentrações devem estar expressas em meq/l: $SAR = Na/[(Ca+Mg)/2]^{1/2}$.

Anexo III – Equações dos índices

Simpson (1949) $$D = \frac{\sum_{i=1}^{S}(ni-1)}{N\,(N-1)}$$

Shannon (1949) $$H' = -\sum pi \log pi$$

Margalef (1958) $$D = \frac{S-1}{\ln N}$$

Jaccard (1908) $$Cj - j(a + b + j)$$

(Ravera 2001)

Índice Português de invertebrados do Norte (INAG 2009)

IPtIN = Nº Taxa x 0,25 + EPT x 0,15 + Evenness x 0,1 + (IASPT – 2) x 0,3 + Log (Sel. ETD+1) x 0,2

Tabela 24: Valor de referência das métricas para os diferentes tipos de rios de Portugal Continental (INAG 2009)

Tipos de Rios	EPT Taxa	Nb *Taxa*	IASPT-2	Evenness	Log (Sel ETD+1)	Log (Sel EPTCD+1)
Rios Montanhosos do Norte	16.00	29.00	4.48	0.65	1.86	-
Rios do Norte de Pequena Dimensão	16.00	30.00	4.52	0.71	1.95	-
Rios do Norte de Média-Grande Dimensão	13.00	26.00	3.97	0.63	1.68	-
Rios do Alto Douro de Média-Grande Dimensão	14.00	31.50	3.80	0.64	1.48	-
Rios do Alto Douro de Pequena Dimensão	18.00	39.00	4.17	0.61	2.00	-
Rios de Transição Norte-Sul	12.00	30.50	3.67	0.64	1.73	-
Rios do Litoral Centro	8.00	20.00	3.60	-	-	2.57
Rios do Sul de Pequena Dimensão	10.00	27.00	3.29	-	-	2.48
Rios do Sul de Média-Grande Dimensão	9.00	21.00	3.37	-	-	2.57
Rios Montanhosos do Sul	10.50	26.00	3.73	0.56	1.32	-
Depósitos Sedimentares do Tejo e Sado	10.00	22.00	3.48	-	-	2.45
Calcários do Algarve	10.00	27.00	3.29	-	-	2.48

Anexo IV – Tabelas dos índices

Tabela 25: Tabela da distribuição da qualidade da água segundo o IPtIN (INAG 2009)

Tipos de Rios	Índice adoptado	Valor de Referência	Exc./Bom (RQE)	Bom/Raz. (RQE)	Raz./Med. (RQE)	Med./Mau (RQE)
Rios Montanhosos do Norte	$IPtI_N$	0.98	0.86	0.60	0.40	0.20
Rios do Norte de Pequena Dimensão	$IPtI_N$	1.02	0.87	0.65	0.44	0.22
Rios do Norte de Média-Grande Dimensão	$IPtI_N$	1.00	0.88	0.66	0.44	0.22
Rios do Alto Douro de Média-Grande Dimensão	$IPtI_N$	1.01	0.83	0.61	0.41	0.20
Rios do Alto Douro de Pequena Dimensão	$IPtI_N$	1.01	0.85	0.59	0.40	0.20
Rios de Transição Norte-Sul	$IPtI_N$	1.00	0.86	0.64	0.42	0.21
Rios do Litoral Centro	$IPtI_S$	0.98	0.74	0.56	0.37	0.19
Rios do Sul de Pequena Dimensão	$IPtI_S$	0.99	0.95	0.70	0.47	0.23
Rios do Sul de Média-Grande Dimensão	$IPtI_S$	0.98	0.97	0.72	0.48	0.24
Rios Montanhosos do Sul	$IPtI_N$	0.99	0.82	0.56	0.38	0.19
Depósitos Sedimentares do Tejo e Sado	$IPtI_S$	1.05	0.88	0.66	0.44	0.22
Calcários do Algarve	$IPtI_S$	0.99	0.95	0.70	0.47	0.23

Tabela 26: Índice de avaliação visual do habitat em rios de elevado gradiente (EPA, 1999) para avaliação da qualidade do habitat.

Curso de água: Rio Ave
Bacia hidrográfica: Lima, Cávado e Ave
Ponto de amostragem:
Largura média do sector de amostragem:
Comprimento médio do sector de amostragem:
Data:

	Parâmetro do habitat	Categorias			
		Ótimo	**Sub-ótimo**	**Marginal**	**Pobre**
Parâmetros a avaliar	**1. Capacidade do substrato para acolher a epifauna**	Mais de 70% de habitat favorável à colonização pela epifauna e à utilização pelos peixes; mistura de ramos, troncos submersos, blocos ou outros habitats estáveis e com potencial máximo de colonização (ex.: troncos já com um certo tempo de deposição).	40-70% de mistura de habitats estáveis; boas condições para a total colonização; habitat adequado para a manutenção das populações; presença de substrato adicional recentemente depositado no canal e ainda não completamente apto para a colonização.	20-40% de mistura de habitats estáveis; disponibilidade de habitat inferior ao desejável; substrato frequentemente removido ou perturbado.	Menos de 20% de habitats estáveis; evidente falta de habitats; substrato inexistente ou instável.
	Pontuação	20 19 18 17 16	15 14 13 12 11	10 9 8 7 6	5 4 3 2 1 0
	2. Firmeza do substrato (“*embeddedness*”)	25% de cascalho, blocos e calhaus rolados rodeados por sedimentos finos. Bandas de blocos que criam nichos ecológicos diversificados.	25-50% de cascalho, blocos e calhaus rolados rodeados por sedimentos finos.	50-75% de cascalho, blocos e calhaus rolados rodeados por sedimentos finos.	Mais de 75% de cascalho, calhaus rolados e blocos rodeados por sedimentos finos.
	Pontuação	20 19 18 17 16	15 14 13 12 11	10 9 8 7 6	5 4 3 2 1 0
	3.Regimes velocidade/profundidade	Presentes os quatro regimes de velocidade/profundidade (lento-profundo, lento-baixo, rápido-profundo, rápido-baixo). (lento é menor que 0.3 m/s, profundo é maior que 0.5 m/s).	Apenas 3 dos quatro regimes estão presentes (se falta o regime rápido-baixo, a pontuação deve ser inferior do que faltando qualquer dos outros regimes).	Apenas 2 dos quatro regimes estão presentes (se falta o regime rápido-baixo, a pontuação deve ser inferior do que faltando qualquer dos outros regimes).	Prevalência de um único regime (usualmente o regime lento-profundo).
	Pontuação	20 19 18 17 16	15 14 13 12 11	10 9 8 7 6	5 4 3 2 1 0
	4.Deposição de sedimentos	Pouco ou nenhum aumento da superfície de ilhas e menos de 5% de substrato afetado pela deposição de sedimentos.	Algum aumento de formação de barreiras, constituídas, essencialmente, por cascalho, areia ou sedimentos finos; 5-30% do substrato afetado; pequena deposição de sedimentos nas poças.	Deposição moderada de cascalho, areia ou sedimentos finos em faixas novas ou antigas; 30-50% do substrato afetado; deposição de sedimento, nas obstruções e constrições do canal; deposição moderada de sedimento nas poças.	Pesados depósitos de materiais finos aumentam a formação de barreiras; mais de 50% do substrato em mudanças frequentes; quase ausência de poças devido à deposição de sedimentos.
	Pontuação	20 19 18 17 16	15 14 13 12 11	10 9 8 7 6	5 4 3 2 1 0

	5. Homogeneidade do fluxo de água no canal	A água corre pelos dois lados do canal, podendo apenas uma pequena parte do leito do rio não estar coberta por água.					A água corre por mais de 75% do canal; ou menos de 25% do canal não está coberto por água.					A água corre por 25-75% do canal, e /ou o substrato encontra-se exposto nas zonas de rápidos.					Muito pouca água no leito do rio e a maior parte confinada a poças.					
	Pontuação	20	19	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0

Tabela 2 (cont.): Índice de avaliação visual do habitat em rios de elevado gradiente (EPA, 1999) para avaliação da qualidade do habitat.

	Parâmetro do habitat	Categorias			
		Ótimo	**Sub-ótimo**	**Marginal**	**Pobre**
Parâmetros a avaliar	**6. Alteração do canal**	Canalização débil ou ausente; rio com um padrão normal.	Presente alguma canalização, usualmente em áreas de pontes; podem existir evidências de canalização antiga (dragagens, com idade superior a 20 anos), mas não existir canalização recente.	A canalização do rio pode ser extensiva; taludes ou escoras podem estar presentes em ambas as margens; 40-80% do rio corre canalizado ou com interrupções.	Margens limitadas por cimento ou muros; mais de 80% do rio corre canalizado ou com interrupções; os habitats aquáticos estão fortemente alterados ou inteiramente removidos
	Pontuação	20 19 18 17 16	15 14 13 12 11	10 9 8 7 6	5 4 3 2 1 0
	7. Frequência de rápidos	Ocorrência relativamente frequente de rápidos; razão distância entre rápidos/largura do rio inferior a 7:1 (geralmente 5:7); a variedade de habitats é a chave. Em rios onde os rápidos são contínuos a localização de blocos ou outros obstáculos naturais assumem grande importância.	Ocorrência pouco frequente de rápidos; razão distância entre rápidos/largura do rio é de cerca de 7:15.	Rápidos e curvas de rio ocasionais; contorno do leito do rio pode propiciar alguns habitats; razão distância entre rápidos/largura do rio é 15:25	Geralmente águas calmas ou presença de pequenos rápidos; razão distância entre rápidos/largura do rio é superior a 25.
	Pontuação	20 19 18 17 16	15 14 13 12 11	10 9 8 7 6	5 4 3 2 1 0
	8. Estabilidade das margens (pontuação para cada margem)	Margens estáveis; pouca ou nenhuma evidência de erosão ou de derrocada das margens; fraco potencial para problemas futuros; menos de 5% das margens com problemas.	Margens moderadamente estáveis; pouca frequência de pequenas áreas erosionais; 5 – 30% das margens são áreas de erosão.	Margens moderadamente instáveis; 30-60% das margens em risco de erosão; grande potencial de erosão durante um aumento de caudal.	Margens instáveis; muitas zonas erodidas; áreas "feridas " frequentes; 60-100% das margens têm marcas de erosão.
	Pontuação (M.E.)	M. E. 10 9	8 7 6	5 4 3	2 1 0
	Pontuação (M.D.)	M. D. 10 9	8 7 6	5 4 3	2 1 0
	9. Corredor ripário (pontuação para cada margem)	Mais de 90% da superfície da margem e da zona ripária coberta por vegetação autóctone, incluindo árvores, vegetação rasteira ou vegetação herbácea; nudez do solo mínima ou não evidente; praticamente todas as plantas com um crescimento natural.	70-90% da superfície das margens coberta por vegetação autóctone, mas com um dos tipos de plantas mal representado; rutura evidente da vegetação rasteira, mas que não afeta o seu potencial de crescimento.	50-70% da superfície das margens coberta por vegetação; grandes manchas sem vegetação; apenas metade do terreno apresenta potencial de crescimento.	Menos de 50% dos terrenos marginais se encontram com cobertura vegetal; grandes espaços sem vegetação; pouca ou nenhuma capacidade de crescimento de cobertura vegetal.
	Pontuação (M.E.)	M. E. 10 9	8 7 6	5 4 3	2 1 0
	Pontuação (M.D.)	M. D. 10 9	8 7 6	5 4 3	2 1 0

	10. Largura do corredor ripário (pontuação para cada margem)	Largura do corredor ripário maior que 18m; as atividades humanas (parqueamento de automóveis, campismo, campos agrícolas, pastagens) não têm impacto na área.			Largura do corredor ripário entre 12 e 18m. O impacto de atividade humanas é mínimo.			Largura do corredor ripário entre 6 e 12 m. O impacto das atividades humanas e considerável.			Largura do corredor ripário inferior a 6m; pouca ou nenhuma vegetação ripária devido a atividades humanas.		
	Pontuação (M.E.)	M. E.	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0
	Pontuação (M.D.)	M. D.	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0

Tabela 27: Índice de qualidade do bosque de ribeira (QBR) (Munné *et al*., 1998) para avaliação do habitat.

Curso de água: Rio Ave **Bacia hidrográfica: Lima, Cávado Ave**
Ponto de amostragem: **Data:**
Largura média do sector de amostragem: **Comprimento médio do sector de amostragem:**

Grau de cobertura da zona ripária Pontuação entre 0 e 25

Pontuação		
25	>80% de cobertura vegetal na zona ripária (as plantas anuais não são contabilizadas)	
10	50-80% de cobertura vegetal na zona ripária	
5	10-50% de cobertura vegetal na zona ripária	
0	<10% de cobertura vegetal na zona ripária	
+10	se a conectividade entre o bosque de ribeira e o ecossistema florestal adjacente é total	
+5	se a conectividade entre o bosque de ribeira e o ecossistema florestal adjacente é maior que 50%	
-5	se a conectividade entre o bosque de ribeira e o ecossistema florestal adjacente é entre 25 e 50%	
-10	se a conectividade entre o bosque de ribeira e o ecossistema florestal adjacente é menor que 25%	

Estrutura da cobertura vegetal *(contabiliza-se toda a zona de ribeira)* Pontuação entre 0 e 25

Pontuação	
25	cobertura de árvores superior a 75%
10	cobertura de árvores entre 50 e 75%, ou cobertura de árvores entre 25 e 50% e de arbustos superior a 25%
5	cobertura de árvores inferior a 50% e o resto da cobertura efetuada por arbustos entre os 10 e os 25%
0	sem árvores e arbustos abaixo dos 10%
+10	se na zona de inundação a concentração de helófitos ou arbustos é superior a 50%
+5	se na zona de inundação a concentração de helófitos ou arbustos é entre 25 e 50%
+5	se existe uma boa conexão entre a zona de arbustos e árvores com a zona de bosque adjacente
-5	se existe uma distribuição regular dos pés de árvores e o bosque é superior a 50%
-5	se as árvores e os arbustos se distribuem em manchas, sem continuidade
-10	Se existe uma distribuição regular das árvores e dos arbustos e o bosque é inferior a 50%

Qualidade da cobertura vegetal *(depende do tipo geomorfológico da zona de ribeira)* Pontuação entre 0 e 25

Pontuação		***Tipo 1***	***Tipo 2***	***Tipo 3***	
25	número de espécies diferentes de árvores autóctones	>1	>2	>3	
10	número de espécies diferentes de árvores autóctones	1	2	3	
5	número de espécies diferentes de árvores autóctones	-	1	1-2	
0	sem árvores autóctones				
+10	se existe uma continuidade da comunidade ao longo do rio uniforme e ocupando mais de 75% da zona de ribeira				
+5	se existe uma continuidade da comunidade ao longo do rio uniforme e ocupando entre 50 a 75% da zona de ribeira				
+5	se existe uma disposição em galeria das diferentes comunidades				
+5	se o número de espécies diferentes é:	>2	>3	>4	
-5	se existem estruturas construídas pelo homem				
-5	se existe alguma árvore introduzida isolada				
-10	se existem espécies de árvores introduzidas formando comunidades				
-10	se existem descargas de efluentes				

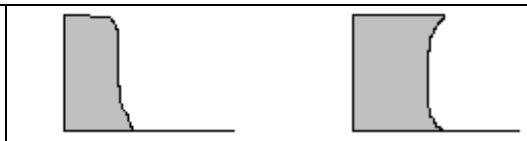
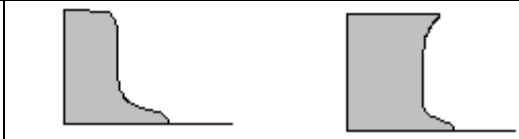
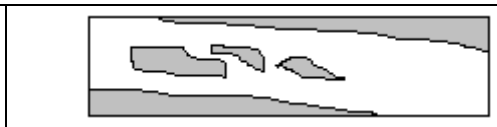
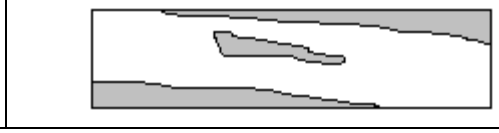
Grau de naturalidade do canal fluvial Pontuação entre 0 e 25

Pontuação		
25	o canal do rio não está modificado	
10	modificações das zonas adjacentes ao rio com redução do canal	

5	sinais de alteração e estruturas rígidas intermitentes que modificam o canal do rio
0	rio canalizado na totalidade do sector
-10	se existe alguma estrutura sólida dentro do leito do rio
-10	se existe alguma represa ou outra infraestrutura transversal no leito do rio

Tabela 3 (cont.): Índice de qualidade do bosque de ribeira (QBR) (Munné *et al*., 1998) para determinação da qualidade do habitat - Determinação do tipo geomorfológico da zona ripária

(Somar o tipo de desnível da direita e da esquerda da zona de inundação e somar ou retirar segundo os outros atributos)

		Pontuação	
Tipos de desnível da zona ripária		**Esquerda**	**Direita**
Vertical/côncavo (declive> 75%), com uma altura não superada pelas maiores cheias		6	6
Igual mas com um pequeno talude ou zona de inundação periódica		5	5
Declive entre 45 e 75º, em escada ou não. O declive conta-se como o ângulo entre a horizontal e a reta entre a zona de inundação e o último ponto da zona de ribeira.		3	3
Declive entre 20 e 45º, em escada ou não.		2	2
Declive menor que 20º, zona de ribeira uniforme ou plana		1	1
Existência de uma ou mais ilhas no meio do leito do rio			
Largura do conjunto superior a 5 m		-2	-2
Largura do conjunto entre 1 e 5 m		-1	-1

Potencialidade de suportar uma massa vegetal de ribeira. Percentagem de substrato duro com incapacidade para enraizar uma massa vegetal permanente.

>80%	Não se pode medir
60-80%	+6
30-60%	+4
20-30%	+2

Pontuação total	

Tipo geomorfológico segundo a pontuação		
>8	**Tipo 1**	Ribeiras fechadas, normalmente de cabeceira, com baixa potencialidade de uma zona ripária extensa
5 a 8	**Tipo 2**	Ribeiras com uma potencialidade intermédia para suportar uma zona de vegetação, zonas médias dos rios
<5	**Tipo 3**	Ribeiras extensas, nas zonas baixas dos rios, com elevada potencialidade para possuir um bosque extenso

Tabela 28: Classes de qualidade da água de acordo com o QBR (MUNNÉ *et al.*, 1998)

Qualidade do bosque de ribeira	QBR	Cor no mapa
Sem alteração, estado natural	95-100	Azul
Ligeiramente perturbado, boa qualidade	75-90	Verde
Início de alterações importantes, qualidade aceitável	55-70	Amarelo
Fortemente alterado, má qualidade	30-50	Laranja
Degradação extrema, péssima qualidade	0-25	Vermelho

Tabela 29:*Standard* usada para o cálculo do índice biótico belga (IBB) (De PAUW & VANHOOREN, 1983)

I	II	III				
Grupos faunísticos	***Número de unidades sistemáticas presentes***	***Número total de unidades sistemáticas presentes***				
		0-1	2-5	6-10	11-15	≥16
		Índice biótico				
1. Plecóptero ou HEPTAGENIIDAE	**1.** várias unidades sistemáticas	-	7	8	9	10
	2. apenas 1 unidade sistemática	5	6	7	8	9
2. Tricópteros com casulo	**1.** várias unidades sistemáticas	-	6	7	8	9
	2. apenas 1 unidade sistemática	5	5	6	7	8
3. ANCYLIDAE e Ephemeroptera exceto HEPTAGENIIDAE	**1.** mais de 2 unidades sistemáticas	-	5	6	7	8
	2. 2 ou menos de 2 unidades sistemáticas	3	4	5	6	7
4. *Aphelocheirus* ou Odonata ou GAMMARIDAE ou Mollusca (exceto SPHAERIDAE)	Todas as unidades sistemáticas anteriores ausentes	3	4	5	6	7
5. *Asellus* ou Hirudinea ou SPHAERIDAE ou Hemíptera (exceto *Aphelocheirus*)	Todas as unidades sistemáticas anteriores ausentes	2	3	4	5	-
6. TUBIFICIDAE ou CHIRONOMIDAE do grupo *thummi-plumosus*	Todas as unidades sistemáticas anteriores ausentes	1	2	3	-	-
7. ERISTALINAE (=SYRPHIDAE)	Todas as unidades sistemáticas anteriores ausentes	0	1	1	-	-

Tabela 30: Classes de qualidade da água definidas de acordo com o índice biótico belga (De PAUW & VANHOOREN, 1983)

Classe	IB	Significado	Cor
I	10-9	Águas não Poluídas	azul
II	8-7	Ligeiramente poluídas	verde
III	6-5	Moderadamente poluídas	amarelo
IV	4-3	Muito poluída	laranja
V	2-1-0	Fortemente poluída	vermelho

Tabela 31: Limites práticos para identificação dos indivíduos para o cálculo do IBB (De PAUW & VANHOOREN, 1983)

Grupo Taxonómico	***Nível de determinação das Unidades Sistemáticas***
Plathelminthes	Género
Oligochaeta	Família
Hirudinea	Género
Mollusca	Género
Crustacea	Família
Plecoptera	Género
Ephemeroptera	Género
Trichoptera	Familia
Odonata	Género
Megaloptera	Género
Hemiptera	Género
Coleoptera	Família
Diptera	Família
	CHIRONOMIDAE *thummi-plumousus*
	CHIRONOMIDAE não *thummi-plumosus*
Hydracarina	Presença

Tabela 32: Cálculo do índice de qualidade biológica da água BMWP' (ALBA-TERCEDOR & SÁNCHEZ-ORTEGA, 1988)

Famílias	Score
SIPHLONURIDAE, HEPTAGENIIDAE, LEPTOPHLEBIIDAE, POTAMANTHIDAE, EPHEMERIDAE *TAENIOPTERYGIDAE, LEUCTRIDAE, CAPNIIDAE, PERLODIDAE, PERLIDAE, CHLOROPERLIDAE* *PHRYGANEIDAE, MOLANNIDAE, BERAEIDAE, ODONTOCERIDAE, LEPTOCERIDAE, GOERIDAE,* *LEPIDOSTOMATIDAE, BRACHYCENTRIDAE, SERICOSTOMATIDAE, THREMMATIDAE* *ATHERICIDAE, BLEPHARICERIDAE* *APHELOCHEIRIDAE*	10
LESTIDAE, CALOPTERYGIDAE, GOMPHIDAE, CORDULEGASTERIDAE, AESHNIDAE, *CORDULIIDAE, LIBELLULIDAE* *PSYCHOMYIIDAE, PHILOPOTAMIDAE, GLOSSOSOMATIDAE* *ASTACIDAE*	8
EPHEMERELLIDAE, PROSOPISTOMATIDAE *NEMOURIDAE* *RHYACOPHILIDAE, POLYCENTROPODIDAE, LIMNEPHILIDAE, ECNOMIDAE*	7
NERITIDAE, VIVIPARIDAE, ANCYLIDAE, THIARIDAE, UNIONIDAE *HYDROPTILIDAE* *GAMMARIDAE, ATYIDAE, COROPHIIDAE* *PLATYCNEMIDIDAE, COENAGRIONIDAE*	6
OLIGONEURIIDAE, POLYMITARCIDAE *DRYOPIDAE, ELMIDAE, HELOPHORIDAE, HYDROCHIDAE, HYDRAENIDAE, CLAMBIDAE* *HYDROPSYCHIDAE, HELYCOPSICHIDAE* *TIPULIIDAE, SIMULIIDAE* *PLANARIIDAE, DUGESIIDAE, DENDROCOELIDAE*	5
BAETIDAE, CAENIDAE *HALIPLIDAE, CURCULIONIDAE, CHRYSOMELIDAE* *TABANIDAE, STRATIOMYIDAE, EMPIDIDAE, DOLICHOPODIDAE, DIXIDAE, CERATOPOGONIDAE,* *ANTHOMYIDAE, LIMONIDAE, PSYCHODIDAE, SCIOMYZIDAE, RHAGIONIDAE* *SIALIDAE, PYRALIDAE* *PISCICOLIDAE* *HYDRACARINA*	4
MESOVELIIDAE, VELIIDAE, HYDROMETRIDAE, GERRIDAE, NEPIDAE, NAUCORIDAE, PLEIDAE, *NOTONECTIDAE, CORIXIDAE* *HELODIDAE, HYDROPHILIDAE, HYGROBIIDAE, DYTISCIDAE, GYRINIDAE* *VALVATIDAE, HYDROBIIDAE, LYMNAEIDAE, PHYSIDAE, PLANORBIDAE, BITHYNIIDAE,* *BYTHINELLIDAE, SPHAERIDAE* *GLOSSIPHONIDAE, HIRUDIDAE, ERPOBDELLIDAE* *ASELLIDAE, Ostracoda*	3
CHIRONOMIDAE, CULICIDAE, THAUMALEIDAE, EPHYDRIDAE, CHAOBORIDAE	2
Oligochaeta (todas as famílias) *SYRPHIDAE*	1

Tabela 33: Classes de qualidade da água definidas para os rios mediterrânicos de acordo com o BMWP' (ALBA-TERCEDOR & SÁNCHEZ-ORTEGA, 1998)

Qualidade biológica da água	IBMWP	Cor no Mapa
Qualidade biológica da água muito boa	> 100	Azul
Eutrofia, água moderadamente poluída	61-100	Verde
Água poluída	36-60	Amarelo
Água muito poluída	16-35	Laranja
Comunidades aquáticas extremamente pobres	<16	Vermelho

Tabela 34: Cálculo do índice de qualidade biológica da água BMWP' (Alba-Tercedor & Sánchez-Ortega, 1988)

Curso de água: **Bacia hidrográfica:**
Ponto de amostragem: **Data:**

Score	Ephem	Plecop	Odonat	Heterop	Trichop	Coleop	Diptera	Crust	Mollus	Outros	Score
10	Siphl Heptg Leptoph Potam Ephem	Taenop Leuctr Capn Perlod Perl Chlorp		Aphel	Phyg Moln Bera Odont Lept Goerd Lepid Brach Seric Thremmt		Ather Blepha				
8			Lest Calopt Gomph Cordg Aesh Cordul Libell		Psych Philop Glosso			Astc			
7	Ephmll Proso	Nemr			Ecn Rhyac Polyc Limnph						
6			Plact Coeng		Hydrtil			Gamm Atyid Coroph	Nerit Vivip Ancyl Union Thiar		
5	Olignr Polym				Hydrops Helycops	Dryp Elm Heloph Hydrch Hydra Clam	Tipul Sumld			Planrd Dendro Duges	
4	Baeti Caen					Halp Curc crys	Taban Straty Empid Dolich Dixd Cerato Anthom Limond Psych Sciom Rhagio			Hydrac Sialid Piscic Pyrald	
3				Velii Mesovl Hydrom Gerrd Nepd Naucr Pleid Notonc Corx		Helod Hydroph Dytisc Gyrnd Hygrob		Asell ostrc	Valvt Hydrob Lymnd Physid Planrb Bithy Bithll Sphaer	Glossi Hird Erpbd	
2							Chirn Culic Thauml Ephydr				
1							Syrph			Oligo	
Total Score											

Anexo V – Water Quality Index (WQI)

Tabela 35: Índice de qualidade da água nos 6 pontos ao longo das 5 recolhas.

Índice de qualidade da água WQI						
	Recolha 1	Recolha 2	Recolha 3	Recolha 4	Recolha 5	Média
Ponto 1	89,83	76,70	83,73	74,68	78,79	80,75
Ponto 2	69,02	77,69	70,75	62,90	71,09	70,29
Ponto 3	55,10	65,44	66,06	61,34	75,23	64,63
Ponto 4	50,43	64,47	60,93	46,50	65,21	57,51
Ponto 5	49,17	60,24	76,00	50,73	60,31	59,29
Ponto 6	45,48	59,39	58,89	48,26	54,84	53,37

Tabela 36: Classes de qualidade da água segundo os valores do WQI (Rocha *et al.*, 2015)

Qualidade do bosque de ribeira	**QBR**	**Cor no mapa**
Sem alteração, estado natural	95-100	Azul
Ligeiramente perturbado, boa qualidade	75-90	Verde
Início de alterações importantes, qualidade aceitável	55-70	Amarelo
Fortemente alterado, má qualidade	30-50	Laranja
Degradação extrema, péssima qualidade	0-25	Vermelho

Anexo VI – Grupos Funcionais Alimentares

Tabela 37: Classificação dos macroinvertebrados tendo em conta a sua fisiologia alimentar (Jesus 2001)

Categoria	Descrição	Grupos Taxonómicos
SH Retalhadores Herbívoros	Alimentam-se de partículas de tecidos vivos de plantas vasculares, com dimensões superiores a 103 mm (CPOM), que cortam e dividem em fragmentos mais pequenos.	Trichoptera: PHRYGANEIDAE, LEPTOCERIDAE (Oecetis,Triaenodes, Leptocerus, Erotesis)
		Lepidoptera (Paraponix, Nymphula)
		Coleoptera: HALIPLIDAE, EUBRIIDAE, HYDROCHIDAE,
		HELOPHORIDAE, CHRYSOMELIDAE
		Diptera: Diamesinae, EPHYDRIDAE
SD Retalhadores Detritívoros	Alimentam-se de partículas em decomposição, com dimensãoes superiores a 103 mm (CPOM), que cortam e dividem em fragmentos mais pequenos.	Plecoptera Filipalpia
		Trichoptera: LIMNEPHILIDAE, LEPIDOSTOMATIDAE,
		SERICOSTOMATIDAE
		Coleoptera: HELODIDAE
		Diptera: TIPULIIDAE, Orthocladiinae
CF Coletores Filtradores	Possuem adaptações (apêndices fortemente modificados, construção de casulos ou teias) que lhes permitem filtrar partículas de restos orgânicos, elementos da microflora e da microfauna, de dimensões inferiores a 103 mm (FPOM e UPOM), que se encontram em suspensão no meio aquático.	Bivalvia
		Crustacea: ATYIDAE
		Ephemeroptera: SIPHLONURIDAE
		Trichoptera: ECNOMIDAE, HYDROPSYCHIDAE (Hydropsiche),
		PSYCHOMYIIDAE, BRACHYCENTRIDAE, PHILOPOTAMIDAE
		Lepidotera: Cataclysta
		Diptera: SIMULIIDAE, Chironomini, SYRPHIDAE, CULICIDAE
CS Coletores Detritívoros	Recolhem material em decomposição com dimensões inferiores a 103 mm, (FPOM e UPOM) que encontram no sedimento ou sobre o substrato.	Crustacea: GAMMARIDAE, ASELLIDAE
		Ephemerotera: BAETIDAE (Baetis), EPHEMERIDAE, CAENIDAE
		(Caenis), LEPTOPHLEBIIDAE (Habroleptoides, Paraleptophlebia,
		Choroterpes), HEPTAGENIIDAE (Electrogena), OLIGONEURIIDAE,
		POLYMITARCIDAE, EPHEMERELLIDAE (Ephemerella),
		POTAMANTHIDAE
		Heteroptera: GERRIDAE
		Coleoptera: HYDROPHILIDAE (A), DRYOPIDAE, LIMNEBIIDAE,
		HYDRAENIDAE
		Trichoptera: BERAEIDAE
		Diptera: Corynoneurinae, CERATOPOGONIDAE
RM Paspadores Minerais	Têm um aparelho bucal, ligeiramente modificado, que lhes permite raspar a microflora	Mollusca Gasteropoda
		Ephemeroptera: HEPTAGENIIDAE (Heptagenia, Rhytrogena,

	(partículas com dimensões inferiores a 103 mm), associada a pedras e a macrófitas.	Ecdyonurus), BAETIDAE (Centroptilum, Pseudocentroptilum),EPHEMERELLIDAE (Torleya)
		Trichoptera: GOERIDAE, THREMMATIDAE, HELICOPSYCHIDAE,GLOSSOSOMATIDAE, MOLANNIDAE, ODONTOCERIDAE,Lepidoptera Acentrix
		Coleoptera: ELMIDAE, EUBRIIDAE
		Diptera: Prodiamesinae, TABANIDAE, DIXIDAE, STRATIOMYIDAE;
		BLEPHARICERIDAE
RO Raspadores Orgânicos	Têm um aparelho bucal, ligeiramente modificado, que lhes permite raspar a microflora (partículas com dimensões inferiores a 103 mm) associada a alagas.	Ephemeroptera: CAENIDAE (Brachycercus), BAETIDAE (Cloeon,
		Procloeon); LEPTOPHLEBIIDAE (Habrophlebia, Thraulus),
		HEPTAGENIIDAE (Epeorus)
		Heteroptera: CORIXIDAE
		Trichoptera: LEPTOCERIDAE (Athripsodes, Mystacides, Setodes,
		Ceraclea, Adicella)
		Diptera: Tanytarsini, PSYCHODIDAE
PM Predadores Mastigadores	Alimentam-se de outros organismos ou de partes de organismos.	Plathelmintes Tricladida: Phagocata
		Plecoptera Setipalpia
		Odonata e Megaloptera
		Trichoptera: RHYACOPHILIDAE, POLYCENTROPODIDAE,HYDROPSYCHIDAE (Diplectrona, Cheumatopsiche)
		Coleoptera: DYTISCIDAE (A), GYRINIDAE, HYGROBIIDAE,HYDROPHILIDAE (L)
		Diptera: LIMONIIDAE, CHAOBORIDAE, Tanypodinae
		Plathelminthe Tricladida exceto Phagocata
		Nematoda e Hirudinea
PS Predadores Sugadores	Têm o aparelho bucal modificado, permitindo-lhes sugar células e fluidos tecidulares de outros organismos.	Heteroptera exceto CORIXIDAE e GERRIDAE
		Hymenoptera e Neuroptera
		Coleoptera: DYTISCIDAE (L)
		Trichoptera: HYDROPTILIDAE
		Diptera: RHAGIONIDAE, DOLICHOPODIDAE, ATHERICIDAE
		ANTHOMYIIDAE, EMPIDIDAE, SCIOMYZIDAE
L Limnívoros	Vivem enterrados no substrato e engolem os sedimentos, aproveitando a matéria orgânica.	Oligochaeta
		Diptera: PTYCHOPTERIDAE